

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

FACOLTÀ DI CHIMICA INDUSTRIALE
Dipartimento di Chimica Fisica ed Inorganica

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE
Ciclo XXII

Settore scientifico-disciplinare di afferenza:
CHIMICA ANALITICA (CHIM/01)

ELETTRODI MODIFICATI PER LO SVILUPPO
DI SENSORI ELETTROCHIMICI

Presentata da: **Dott.ssa Lorella Guadagnini**

Coordinatore

Prof. Giuliano Longoni

Relatore

Prof.ssa Domenica Tonelli

Esame finale anno 2010

INDICE

	Pag.
1. MOTIVAZIONE E SCOPO DELLA RICERCA	1
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	5
2. INTRODUZIONE	9
2.1 ELETTRODI CHIMICAMENTE MODIFICATI (CME)	9
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	14
2.2 ESACIANOFERRATI DEI METALLI DI TRANSIZIONE (MHCF)	17
2.2.1 Struttura	17
2.2.2 Metodi di preparazione	18
2.2.3 Caratterizzazione chimica e morfologica	20
2.2.4 Caratterizzazione elettrochimica	21
2.2.5 Applicazioni analitiche e tecnologiche	24
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	27
2.3 IDROTALCITI	33
2.3.1 Argille	33
2.3.2 Idrotalciti (HT)	34
2.3.3 Composti di tipo idrotalcite (Htlc)	35
2.3.3.1 <i>Struttura</i>	35
2.3.3.2 <i>Metodi di sintesi</i>	37
2.3.3.3 <i>Proprietà e applicazioni</i>	40
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	41
2.4 BIOSENSORI	45
2.4.1 Enzimi	46
2.4.2 Biosensori basati su enzimi	48
2.4.3 Metodi di immobilizzazione enzimatica	49
2.4.3.1 <i>Strategie di immobilizzazione fisica</i>	50
2.4.3.2 <i>Strategie di immobilizzazione chimica</i>	52
2.4.4 Cinetica enzimatica	53
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	54
2.5 MICROSCOPIA A SCANSIONE ELETTROCHIMICA (SECM)	57
2.5.1 Tecnica e stato dell'arte	57
2.5.2 Strumentazione	58
2.5.3 Modalità operative	60
2.5.3.1 <i>Feedback amperometrico</i>	60
2.5.3.2 <i>Generation/collection</i>	63
2.5.3.3 <i>Competizione redox (RC SECM)</i>	63

	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	64
3.	PARTE SPERIMENTALE	67
3.1	FABBRICAZIONE DEGLI ELETTRODI	67
3.1.1	Macro elettrodi	67
3.1.2	Micro elettrodi	68
3.1.3	Elettrodi di riferimento Ag/AgCl “home-made”	71
3.1.4	Mini-elettrodi di riferimento Ag/AgCl/agar	72
3.2	PULIZIA DELLE SUPERFICI ELETTRODICHE E CONTROLLO ELETTROCHIMICO	73
3.2.1	Macro elettrodi	74
3.2.2	Micro elettrodi	74
3.2.3	Lamine di GC per esperimenti SECM	75
3.3	MODIFICA DEGLI ELETTRODI	75
3.3.1	Sensori per H ₂ O ₂ a base di HCF depositati su GC	76
3.3.1.1	<i>CuHCF (GC/CuHCF)</i>	77
3.3.1.2	<i>CuHCF arricchito di Cu²⁺</i>	77
3.3.1.3	<i>PdHCF (GC/PdHCF)</i>	77
3.3.1.4	<i>CuPdHCF (GC/CuPdHCF)</i>	78
3.3.2	Biosensore per il glucosio a base di HCF e GOx (GC)	78
3.3.2.1	<i>BSA + GA (GC/HCF/GOx+BSA+GA)</i>	78
3.3.2.2	<i>Nafion (GC/HCF/GOx+Nafion)</i>	78
3.3.3	Biosensori per il lattato a base di HT e LOx (<i>Pt/HT/LOx/BSA+GA</i> e <i>Pt/HT/LOx/Nafion</i>)	79
3.3.3.1	<i>Pt/HT/LOx/BSA+GA</i>	79
3.3.3.2	<i>Pt/HT/LOx/Nafion</i>	80
3.4	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER ESPERIMENTI SECM	80
3.4.1	Spot di Blu di Prussia (<i>GC/PB</i>)	81
3.4.2	Spot di Blu di Prussia+GOx (<i>GC/PB/GOx+Resydrol</i>)	83
3.5	VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI DEGLI ELETTRODI MODIFICATI	84
3.5.1	Determinazioni cronoamperometriche	84
3.5.2	Studio della risposta agli interferenti nei biosensori per il lattato	85
3.6	VISUALIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ LOCALE DI BLU DI PRUSSIA: TECNICA SECM	85
3.7	TRATTAMENTO DEI DATI	88
3.8	ANALISI SUPERFICIALE CON MICROSCOPIO A SCANSIONE ELETTRONICA (SEM)	89
	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	89

4.	RISULTATI E DISCUSSIONE	91
4.1	PRESTAZIONI ELETTROCATALITICHE DI ESACIANOFERRATI PURI E MISTI DI Cu E Pd PER LA RIDUZIONE DEL PEROSSIDO DI IDROGENO	91
4.1.1	Elettrodi modificati con esacianoferrato di Pd (PdHCF)	91
4.1.1.1	<i>Deposizione</i>	91
4.1.1.2	<i>Caratterizzazione elettrochimica</i>	92
4.1.1.3	<i>Prestazioni elettrocatalitiche</i>	93
4.1.2	Elettrodi modificati con esacianoferrati misti di Cu e Pd (CuPdHCF) e confronto con esacianoferrato di Cu (CuHCF)	94
4.1.2.1	<i>Deposizione</i>	95
4.1.2.2	<i>Caratterizzazione elettrochimica</i>	96
4.1.2.3	<i>Caratterizzazione SEM/EDX</i>	99
4.1.2.4	<i>Prestazioni elettrocatalitiche</i>	103
4.1.3	Evidenze sperimentali del ruolo chiave di Cu nell'attività elettrocatalitica	106
4.1.3.1	<i>Comportamento elettrochimico di CuHCF</i>	106
4.1.3.2	<i>Comportamento elettrochimico di CuHCF arricchito in Cu²⁺</i>	109
4.1.4	Stabilità al pH	114
	BIBLIOGRAFIA	117
4.2	PRESTAZIONI ELETTROCATALITICHE DI ESACIANOFERRATI PURI E MISTI DI Cu E Pd PER LA REALIZZAZIONE DI BIOSENSORI PER IL GLUCOSIO	119
4.2.1	Scelta del sistema di immobilizzazione enzimatica	120
4.2.2	Confronto qualitativo delle prestazioni di elettrodi modificati con CuHCF e CuPdHCF come biosensori per il glucosio	122
4.3	VISUALIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ ELETTROCATALITICA DI ESACIANOFERRATI MICROSTRUTTURATI	125
4.3.1	Caratterizzazione della TIP	125
4.3.2	Deposizione elettrochimica di spot di blu di Prussia	127
4.3.3	Scansioni SECM	131
4.3.3.1	<i>Curve di avvicinamento e correzione del tilt del campione</i>	131
4.3.3.2	<i>Visualizzazione dell'attività elettrocatalitica di Blu di Prussia (GC/PB)</i>	133
4.3.3.3	<i>Visualizzazione dell'attività elettrocatalitica di Blu di Prussia in presenza di enzima GOx (GC/PB/GOx)</i>	135
4.3.3.4	<i>Campione (GC/PB/GOx) con configurazione ottimizzata</i>	140
	BIBLIOGRAFIA	144

4.4	SUPERFICI ELETTRODICHE MODIFICATE CON IDROTALCITI PER LA PROGETTAZIONE DI BIOSENSORI PER IL LATTATO	145
4.4.1	Ottimizzazione della configurazione del biosensore e messa a punto dei parametri operativi	146
4.4.2	Prestazioni del biosensore per il lattato e studio di interferenti	149
4.4.3	Test preliminare di applicazione ad un campione reale	151
	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	153
5.	CONCLUSIONI	155
	ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE	157
	RINGRAZIAMENTI	159

1. MOTIVAZIONE E SCOPO DELLA RICERCA

L'attività sperimentale condotta durante il periodo di Dottorato di Ricerca si inserisce all'interno del problema analitico della determinazione del perossido di idrogeno.

Il perossido di idrogeno (H_2O_2) è un composto fortemente ossidante, che, attualmente, trova impiego in una estesa gamma di **applicazioni in ambito industriale** [1]:

- ***Trattamento di acque di scarico municipali e da processi produttivi [2,3].***

H_2O_2 riveste un ruolo di rilievo nella rimozione di composti solforati, ammine e aldeidi, nell'ambito dei trattamenti per il controllo degli odori, nella eliminazione di residui di cloro, cianuri e composti solforati ossidabili per la prevenzione della corrosione, ed esercita le sue proprietà battericide e disinfettanti nella inibizione della crescita di microorganismi. Il perossido di idrogeno è, inoltre, frequentemente impiegato nel trattamento delle acque in combinazione con altri processi, per aumentarne l'efficacia.

- ***Trattamento di acque di piscina [4].***

Le acque di piscina costituiscono un terreno di coltura preferenziale per la crescita di microorganismi patogeni, a causa degli inquinanti introdotti dall'utenza (saliva, sebo, sudore, urina) e da quelli provenienti dall'ambiente (foglie, polvere, terra), motivo per cui la fase più importante del processo di trattamento dell'acqua è costituita dalla disinfezione.

Il metodo più efficiente è l'applicazione di composti a base di cloro (Cl_2 e ipoclorito di sodio o di calcio, dicloroisocianurato di sodio, acido tricloroisocianurico), ma esso conduce ad alcuni svantaggi, quali irritazione di occhi e mucose, disidratazione della pelle e danneggiamento dei capelli. Un metodo alternativo consiste nell'uso del perossido di idrogeno. La sua azione disinfettante è inferiore a quella del cloro, quindi solo un preciso dosaggio può garantire una disinfezione efficace. Da qui nasce l'esigenza di monitorare accuratamente la concentrazione di perossido di idrogeno in fase di disinfezione dell'acqua di piscina.

– ***Sterilizzazione di materiali*** [5,6].

Grazie alle sue proprietà sporicide e battericide, il perossido di idrogeno è ampiamente utilizzato in campo alimentare, nella sterilizzazione di materiali per imballaggi di cibi e bevande, e in campo medico e farmaceutico, nella produzione di materiali asettici. Poichè, durante la fase di sterilizzazione, residui di H_2O_2 possono rimanere intrappolati nei materiali e generare problemi di incompatibilità con l'uso finale a cui sono destinati, è richiesta una accurata determinazione del perossido di idrogeno per eseguire il controllo di qualità del processo e del prodotto.

– ***Sbiancatura di cellulosa, carta, fibre tessili naturali e sintetiche*** [3,7].

La concentrazione di perossido di idrogeno impiegata nel processo di sbiancatura necessita di essere accuratamente dosata e controllata soprattutto nell'ambito dell'industria tessile, perchè la qualità del prodotto ne risulta fortemente influenzata. Infatti, una concentrazione troppo bassa conduce ad una azione sbiancante insoddisfacente e riduce la qualità e la brillantezza dei colori nel successivo trattamento di tintura, mentre una concentrazione eccessivamente alta causa la degradazione del tessuto, nota come “danneggiamento catalitico”.

– ***Chimica fine.***

Il perossido di idrogeno trova ampio utilizzo come reagente in processi chimici nella produzione di polimeri, cosmetici e detergenti, e nelle formulazioni farmaceutiche [3,8].

Inoltre, il perossido di idrogeno è presente nell'**atmosfera** come prodotto di reazioni fotochimiche di composti organici. Essendo il principale ossidante di S(IV) atmosferico, si ritiene che rivesta un ruolo importante nella formazione delle deposizioni acide, e la sua concentrazione nell'acqua piovana è un indicatore del livello di inquinamento atmosferico [9,10].

Da quanto esposto, è evidente che la determinazione della concentrazione di H_2O_2 risulta di notevole importanza per effettuare il corretto dosaggio nella disinfezione delle acque, per realizzare il controllo di qualità di prodotti e processi, per verificare il rispetto delle norme legislative vigenti in merito alla presenza di residui in acque di scarico, per monitorare l'inquinamento nell'ambito del controllo ambientale. Inoltre, la determinazione di H_2O_2 riveste un ruolo di rilievo nella progettazione di biosensori,

essendo tale analita un co-prodotto della reazione catalizzata, in presenza di ossigeno, dagli enzimi della classe delle ossidasi, impiegata in ambito clinico e alimentare per la quantificazione di substrati enzimatici, quali glucosio e acido lattico [11,12].

La concentrazione di perossido di idrogeno varia da micromolare (residui in cibi, imballaggi e acqua potabile), a millimolare (applicazioni coinvolgenti il processo di sbiancatura), a molare (trattamento di reflui) [13].

Sono stati sviluppati numerosi **metodi per la quantificazione di H₂O₂**.

– La tecnica più comune è la **titolazione** redoximetrica (le classiche permanganometria [14] e iodometria). Può essere impiegata in campioni contenenti perossido di idrogeno in un ampio intervallo di concentrazioni, ma richiede tempi di analisi lunghi e non è applicabile se la concentrazione di analita varia nel tempo.

– **Metodi spettrofotometrici** [15-19] consentono una quantificazione a livelli di concentrazione nell'intervallo micromolare-millimolare.

La determinazione mediante fluorescenza [20-24] e chemiluminescenza [25-29] consente la quantificazione di H₂O₂ persino a concentrazioni nanomolari, grazie alla elevatissima sensibilità di queste due tecniche strumentali.

– **Altre tecniche** di analisi sono la spettroscopia IR in riflettanza totale attenuata [30], la gascromatografia (GC) [31], la cromatografia liquida ad alta efficienza (HPLC) [32].

Nonostante i metodi descritti in letteratura producano risultati soddisfacenti per la rivelazione di H₂O₂, essi richiedono una strumentazione complessa e costosa, e risultano poco adatti ad applicazioni industriali [33].

– Le **tecniche elettrochimiche** presentano numerosi vantaggi che le rendono ideali per la determinazione del perossido di idrogeno a basse concentrazioni (millimolari, micromolari) in ambito industriale: sono versatili, consentono il raggiungimento di bassi limiti di rivelabilità, presentano un esteso intervallo di risposta lineare in funzione della concentrazione di analita, richiedono una strumentazione semplice, poco costosa e maneggevole.

L'amperometria è la tecnica elettrochimica più promettente e consente la determinazione di H₂O₂ in un intervallo di concentrazioni compreso tra 10⁻⁷ e 5·10⁻² M [34]. L'impiego di superfici elettrodiche tal quali (non modificate) è però difficoltoso, perchè i trasferimenti elettrodici sono irreversibili e i responsi non

riproducibili. Questo comportamento è stato riscontrato per numerosi materiali elettrodici, fra cui Pt [35], carbone vetroso, fibra di carbonio [36], Au e Sn. Nonostante alcuni elettrodi mostrino un responso lineare in un ristretto intervallo di concentrazione (1-20 mM), il segnale è instabile e la sensibilità di risposta molto bassa [37].

Nel caso del Pt, la mancanza di linearità di risposta associata alla determinazione di perossido di idrogeno in ossidazione è dovuta sia al meccanismo di trasferimento elettronico (regime misto di controllo cinetico e diffusivo), sia all'avvelenamento della superficie elettrodica per adsorbimento di complessi intermedi, che riducono l'area del Pt disponibile e limitano il decorso della reazione ad alte concentrazioni di perossido, con conseguente soppressione del responso [38-40].

Un altro motivo per cui non è conveniente determinare analiti come H_2O_2 su superfici elettrodiche tal quali è che la misura richiederebbe l'applicazione di potenziali "estremi", a causa della elevata sovratensione necessaria al trasferimento elettronico. Questo problema si riscontra soprattutto nel caso della rivelazione in ossidazione. In queste condizioni sperimentali è alta la probabilità che decorrano reazioni collaterali, coinvolgenti specie più facilmente ossidabili dell'analita, le quali si trovano comunemente nelle matrici reali e si comportano in questo modo da interferenti, riducendo la selettività del sensore. Un esempio è fornito dall'impiego in ossidazione di biosensori basati su ossidasi, i quali, in applicazioni nei campi clinico e alimentare, risentono dell'interferenza di composti facilmente ossidabili, fra cui acido ascorbico, acetaminofene e acido urico [41,42].

Il problema dell'avvelenamento della superficie elettrodica può essere risolto modificandola con opportuni materiali in grado di migliorare il responso analitico.

Nella rivelazione di perossido di idrogeno su Pt in ossidazione, recentemente il nostro gruppo ha proposto la modifica di elettrodi di Pt mediante elettrodeposizione di idrotalciti, nello sviluppo di biosensori per il glucosio a base di glucosio ossidasi. L'*idrotalcite* si è dimostrata un ottimo modificante elettrodico, in grado di garantire, nella ossidazione di H_2O_2 , un segnale di corrente stabile, un rapporto segnale/rumore

più alto e un intervallo di linearità più esteso, rispetto all'impiego di un elettrodo di Pt non modificato [43].

Per ridurre l'interferenza derivante dalla rivelazione all'elettrodo di composti facilmente ossidabili è, invece, opportuno modificarne la superficie con composti elettroattivi in grado di impartire particolari caratteristiche al trasferimento elettronico. Ottimi mediatori redox sono gli *esacianoferrati dei metalli di transizione* [44], composti versatili, dalle numerose proprietà, facilmente sintetizzabili e depositabili su diversi materiali elettrodici. La proprietà più utile, dal punto di vista elettroanalitico, è l'elettrocatalisi, un fenomeno che consente la rivelazione di analiti di interesse a potenziali meno catodici o meno anodici di quelli richiesti su superfici non modificate, riducendo la sovratensione del trasferimento elettronico. Ad esempio, alcuni esacianoferrati sono in grado di rivelare il perossido di idrogeno a potenziali vicini a 0.0 V (vs. SCE), impedendo l'ossidazione degli interferenti.

Il **lavoro di ricerca** che ho condotto riguarda la modifica di materiali elettrodici per lo sviluppo di sensori elettrochimici.

Nella tesi saranno descritti diversi tipi di elettrodi modificati testati:

1. elettrodi di carbone vetroso (GC), modificato con film microstrutturati di Blu di Prussia (PB) e con film sottili di esacianoferrati (HCF) di Cu e Pd, nello studio dell'attività elettrocatalitica verso la riduzione di H_2O_2 , con successiva applicazione allo sviluppo di biosensori per il glucosio basati sull'enzima glucosio ossidasi (GOx);
2. elettrodi di Pt, modificati con una idrotalcite a base di Ni e Al e con l'enzima lattato ossidasi (LOx), nell'impiego come biosensori per il lattato.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C. W. Jones, Applications of hydrogen peroxide and derivatives, The Royal Society of Chemistry, 1999, Cambridge, UK.
- [2] www.H2O2.com;
- [3] J. Kerth, D. Jensen, Journal of Chromatography A 1995, 706, 191.
- [4] A. Schwake, B. Ross, K. Cammann, Sens. Actuators B 1998, 46, 242.

- [5] C.-L. Hsu, H.-D. Jang, M.-S. Su, K.-S. Chang, Y.-S. Huang, *Eur. Food Res. Technol.* 2008, 226, 809.
- [6] S. Corveleyn, G. M. R. Vandenbossche, J. P. Remon, *Pharmaceutical Res.* 1997, 14, 294.
- [7] P. Westbroek, E. Temmerman, P. Kiekens, *Anal. Chim. Acta* 1999, 385, 423.
- [8] L. Campanella, R. Roversi, M. P. Sammartino, M. Tomassetti, *J. of Pharmaceut. Biomed. Anal.* 1998, 18, 105.
- [9] J. H. Lee, I. N. Tang, J. B. Weinstein-Lloyd, *Anal. Chem.* 1990, 62, 2381.
- [10] Y. Wang, J. Huang, C. Zhang, J. Wei, X. Zhou, *Electroanalysis* 1998, 10, 776.
- [11] J. Wang, *Chem. Rev.* 2008, 108, 814.
- [12] S. V. Dzyadevych, V. N. Arkhypova, A. P. Soldatkin, A.V. El'skaya, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *ITBM-RBM* 2008, 29, 171.
- [13] S. A. G. Evans, J. M. Elliott, L. M. Andrews, P. N. Bartlett, P. J. Doyle, G. Denuault, *Anal. Chem.* 2002, 74, 1322.
- [14] International Standards Organization (1996) Hydrogen peroxide for industrial use - Determination of hydrogen peroxide content - Titrimetric method. ISO/DIS 7157.
- [15] P. A. Tanner, A. Y. S. Wong, *Anal. Chim. Acta* 1998, 370, 279.
- [16] I. da Cruz Vieira, O. Fatibello-Filho, *Analyst* 1998, 123, 1809.
- [17] X.-S. Chai, Q. X. Hou, Q. Luo, J. Y. Zhu, *Anal. Chim. Acta* 2004, 507, 281.
- [18] W. Luo, M. E. Abbas, L. Zhu, K. Deng, H. Tang, *Anal. Chim. Acta* 2008, 629, 1.
- [19] K. Sunil, B. Narayana, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2008, 81, 422.
- [20] A. Sakuragawa, T. Taniai, T. Okutani, *Anal. Chim. Acta* 1998, 374, 191.
- [21] A. Dürkop, O. S. Wolfbeis, *J. Fluorescence* 2005, 15, 755.
- [22] M. Onoda, T. Uchiyama, K. Mawatari, K. Kaneko, K. Nakagomi, *Analytical Sciences* 2006, 22, 815.
- [23] Q. Chang, L. Zhu, G. Jiang, H. Tang, *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 395, 2377.
- [24] R. Nakahara, S. Kashitani, K. Hayakawa, Y. Kitani, T. Yamaguchi, Y. Fujita, *J. Fluorescence* 2009, 19, 769.
- [25] O. Nozaki, H. Kawamoto, *Luminescence* 2000, 15, 137.
- [26] S. H. Fan, B. T. Hart, I. D. McKelvie, *Laboratory robotics and automation* 2000, 12, 149.

- [27] L. Marle, G. M. Greenway, *Anal. Chim. Acta* 2005, 548, 20.
- [28] Y. Hu, Z. Zhang, C. Yang, *Anal. Chim. Acta* 2007, 601, 95.
- [29] X. Yang, Y. Guo, Z. Mei, *Anal. Biochem.* 2009, 393, 56.
- [30] H. Voraberger, V. Ribitsch, M. Janotta, B. Mizaikoff, *Appl. Spectrosc.* 2003, 57, 574.
- [31] A. Tanaka, M. Iijima, Y. Kikuchi, *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 2154.
- [32] U. Pinkernell, S. Effkemann, U. Karst, *Anal. Chem.* 1997, 69, 3623.
- [33] C.-L. Hsu, H.-D. Jang, M.-S. Su, K.-S. Chang, Y.-S. Huang, *Eur. Food Res. Technol.* 2008, 226, 809.
- [34] N. A. Stephenson, A. T. Bell, *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 381, 1289.
- [35] P. Westbroek, B. Van Huate, E. Temmerman, *Fresenius J. Anal. Chem.* 1996, 354, 405.
- [36] K. Aoki, M. Ishida, K. Tokuda, K. Hasebe, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 1988, 251, 63.
- [37] W. B. Nowall, W. G. Kuhr, *Electroanalysis* 1997, 9, 102.
- [38] S. B. Hall, E. A. Khudaish, A. L. Hart, *Electrochim. Acta* 1998, 43, 579.
- [39] S. B. Hall, E. A. Khudaish, A. L. Hart, *Electrochim. Acta* 1998, 43, 2015.
- [40] S. B. Hall, E. A. Khudaish, A. L. Hart, *Electrochim. Acta* 1999, 44, 4573.
- [41] T. Tangkuaram, C. Ponchio, T. Kangkasomboon, P. Katikawong, W. Veerasai, *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 2071.
- [42] J. Wang, *Chem. Rev.* 2008, 108, 814.
- [43] A. Mignani, E. Scavetta, D. Tonelli, *Anal. Chim. Acta* 2006, 577, 98.
- [44] N. R. de Tacconi, K. Rajeshwar, R. O. Lezna, *Chem. Mater.* 2003, 15, 3046.

2. INTRODUZIONE

Prima di esporre dettagliatamente i risultati ottenuti durante l'attività di laboratorio, è opportuno tracciare un quadro introduttivo che descriva i materiali con cui si è lavorato e definisca lo stato dell'arte dei campi applicativi oggetto di trattazione.

2.1. ELETTRODI CHIMICAMENTE MODIFICATI (CME)

Gli elettrodi chimicamente modificati (CME) [1,2] si basano sulla modifica di una superficie conduttrice con un materiale in grado di impartirle determinate proprietà di interesse per la risoluzione di problemi elettroanalitici e per l'applicazione al campo della sensoristica. La funzionalizzazione di un supporto elettrodico consente di progettare dispositivi elettrochimici con selettività, sensibilità o stabilità più elevate, mediante meccanismi di elettrocatalisi (aumento della velocità di trasferimento elettronico) [3,4], accumulo preferenziale (preconcentrazione) [5-8] o permeazione selettiva attraverso membrane [9-12]. Anche altre importanti applicazioni, quali elettrosintesi, celle a combustibile e protezione dalla corrosione possono trarre beneficio dalla modifica di superfici elettrodiche [13-15].

La proprietà di **elettrocatalisi** è la più importante caratteristica dei CME dal punto di vista dell'applicazione in elettroanalitica. Una rappresentazione schematica del suo meccanismo è mostrata in Figura 2.1 .

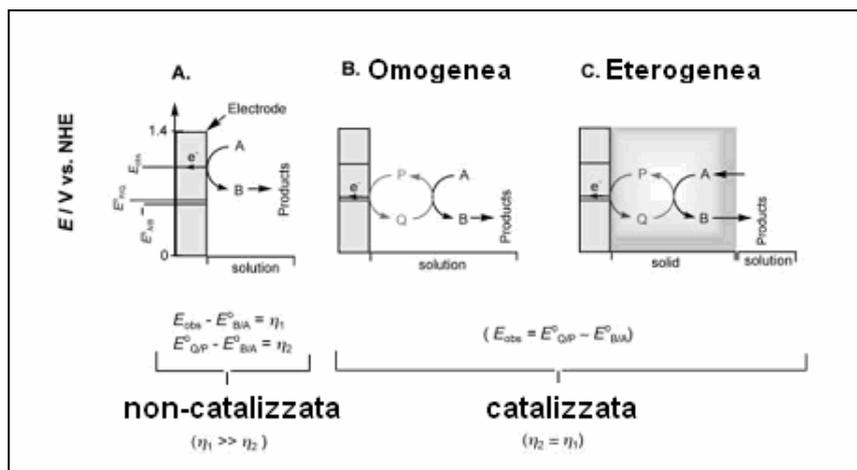


Figura 2.1 – Rappresentazione schematica dei meccanismi coinvolti nella rivelazione di analiti ad una superficie elettrodica non modificata (A) e in presenza di un mediatore in grado di effettuare elettrocatalisi in fase omogenea (B) ed eterogenea (C) [1].

Spesso la reazione redox desiderata decorre, sulla superficie di un elettrodo tal quale, con una cinetica di trasferimento elettronico lenta; affinché si possa ottenere una velocità apprezzabile è necessario applicare potenziali molto maggiori del potenziale redox termodinamico (standard). Si ipotizzi che la reazione oggetto di studio sia l'ossidazione irreversibile del composto A, che viene convertito in B. Il trasferimento elettronico avviene, alla superficie elettrodica non modificata, per applicazione di un potenziale pari a E_{obs} (potenziale "osservato"), il quale differisce dal potenziale standard di riduzione della coppia A/B ($E_{B/A}^{\circ}$) di una quantità pari alla sovratensione η . In questo caso, η assume un valore consistente, così che, per far decorrere la reazione, è necessaria l'applicazione di un potenziale "estremo". Una reazione di questo tipo può essere catalizzata impiegando un mediatore in grado di facilitare il trasferimento elettronico fra analita ed elettrodo. In presenza di un mediatore reversibile redox P/Q, caratterizzato da un potenziale standard $E_{P/Q}^{\circ}$ ($>E_{B/A}^{\circ}$), si verifica il fenomeno dell'elettrocatalisi, in due fasi successive. Nella prima, avviene una reazione chimica fra A e il mediatore nella forma ridotta Q, nella seconda decorre un trasferimento elettronico all'elettrodo, che ripristina la forma ossidata P del mediatore, come tipicamente avviene nei meccanismi catalitici. In conclusione, poichè il trasferimento elettronico avviene fra mediatore ed elettrodo, e non direttamente fra analita ed elettrodo, l'effetto della mediazione da parte della coppia P/Q consiste nella diminuzione della sovratensione η e nell'aumento della densità di corrente. Nella catalisi omogenea, la coppia P/Q è in soluzione, mentre in quella eterogenea si trova

immobilizzata sulla superficie elettrodica. L'ancoraggio del mediatore sull'elettrodo è sicuramente più vantaggioso, sia perchè consente la progettazione di sensori riutilizzabili in più misurazioni analitiche, sia perchè garantisce un responso rapido, visto che l'efficienza del processo elettrocatalitico dipende dalla distanza effettiva fra la superficie e il sito redox attivo.

La **preparazione degli elettrodi modificati** si basa essenzialmente su quattro procedure, mostrate schematicamente in Figura 2.2: l'adsorbimento fisico e chimico, la funzionalizzazione di superfici (in figura, a base di carbonio), l'intrappolamento in un polimero, la formazione di multistrati eterogenei.

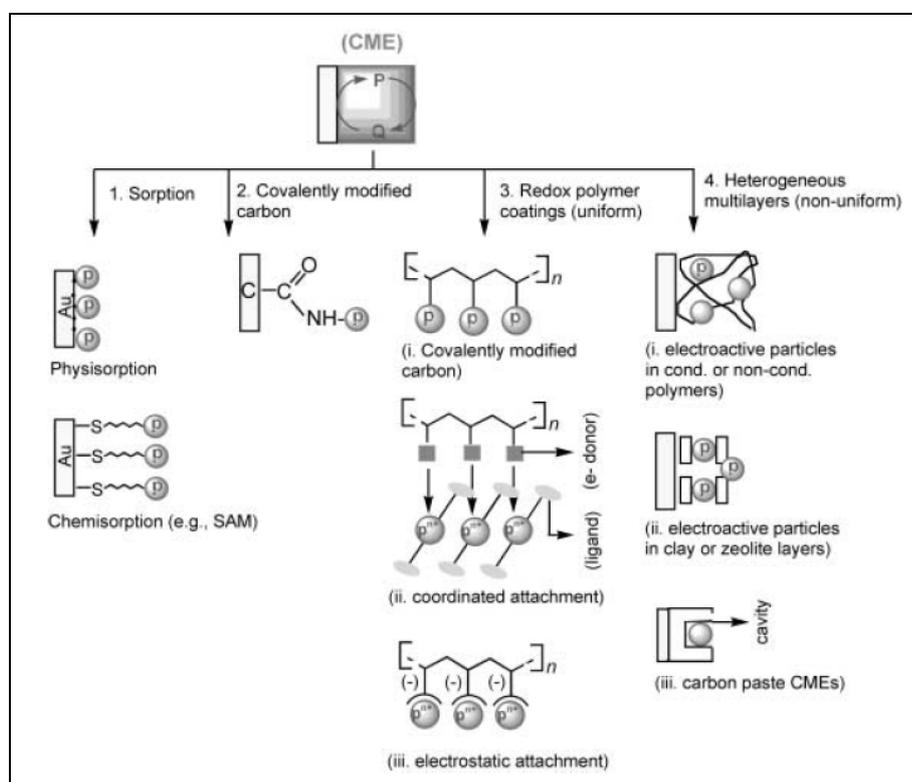


Figura 2.2 – Rappresentazione schematica delle principali modalità di modifica di superfici elettrodiche [1].

- Nel caso dell'**adsorbimento**, si sfruttano proprietà di interazione fisica e chimica per formare strutture a monostrato, ottenendo l'ancoraggio di gruppi funzionali mediante semplici procedure di modifica della superficie. Composti organici od organometallici possono essere depositati per adsorbimento fisico ("casting") su supporti carboniosi porosi, quali carbone vetroso e grafite (pirolitica ordinaria o a

piani basali) per “dip coating” di una goccia di soluzione, seguita dall’evaporazione del solvente [16-18]. Anche la modifica con argille è spesso eseguita mediante questa via, a partire da soluzioni colloidali, ma, per alcuni supporti elettrodici, è richiesta l’applicazione di membrane polimeriche per aumentare la stabilità [19,20].

I nanotubi di carbonio (CNT) sono nanomateriali di recente sviluppo, impiegati nella modifica di superfici elettrodiche, soprattutto carboniose, per adsorbimento fisico, grazie alle loro elevate capacità di adsorbimento. Possiedono proprietà geometriche, meccaniche, elettroniche e chimiche uniche, fra cui la capacità di promuovere la reattività elettrochimica di analiti, la protezione contro i processi di avvelenamento di superfici, l’attività elettrocatalitica caratterizzata da un trasferimento elettronico rapido ed efficiente. Queste caratteristiche li rendono estremamente interessanti nei campi della catalisi e della sensoristica [21-25].

Nonostante siano utili in una grande varietà di applicazioni analitiche, la stabilità di elettrodi modificati mediante adsorbimento fisico è sempre un fattore di criticità. Il problema della stabilità può essere risolto mediante la via dell’adsorbimento chimico. Fra i monostrati formati per chemiadsorbimento si annoverano quelli auto-assemblati (SAM), che si preparano semplicemente immergendo un elettrodo di Au in una soluzione di un tiolo funzionalizzato in etanolo, sfruttando la forte interazione fra S e Au. L’interesse di questi sistemi risiede nella loro abilità di essere ulteriormente modificati con materiali chimicamente o biologicamente reattivi, mediante formazione di un legame con un altro gruppo funzionale presente sulla molecola che ha generato il SAM [26,27].

- Per quanto concerne la modifica di superfici mediante formazione di **legami covalenti**, essa è resa possibile dalla presenza di gruppi funzionali sulla superficie di alcuni materiali, che possono essere derivatizzati per via sintetica o controllando i potenziali di ossidazione/riduzione in un mezzo adatto. Sn, Pt e materiali carboniosi (come il carbone vetroso, GC) si prestano alla trasformazione di gruppi funzionali, per poter essere impiegati in una varietà di applicazioni [28,29].

Lo svantaggio dei monostrati è che consentono di immobilizzare solo piccole quantità di specie attiva sulla superficie elettrodica. I multistrati costituiscono una valida alternativa per risolvere questo. Un primo tipo di multistrato (“omogeneo”) include i polimeri redox, gli ionomeri, i polimeri inorganici, i film di metalli o complessi di metalli che agiscono da mediatori. Un secondo tipo (multistrato “eterogeneo”) comprende argille, zeoliti, sistemi sol-gel (basati sulla idrolisi di alcossidi di Si), pasta di carbone, resine epossidiche [30-35].

- La modifica di superfici elettrodiche con ***multistrati omogenei*** avviene quando tali sistemi sono in grado di incorporare all’interno di cavità strutturali le specie ioniche redox-attive come controioni. I polimeri più comunemente impiegati sono quelli conduttori, quali polipirrolo (PPy), politiofene (PTh), polianilina (PAni) [36]. Essi hanno attratto notevole attenzione grazie alle loro proprietà di conduzione elettrica e alla capacità di incorporare ed espellere specie anioniche (“dopanti”) durante i processi di ossidoriduzione. Possono essere facilmente preparati in situ per elettropolimerizzazione di soluzioni del monomero, metodo che consente un controllo accurato dello spessore del film e, spesso, della sua morfologia, e che è molto apprezzato nella modifica di sensori miniaturizzati. Modificando il monomero con funzionalità chimiche o biologiche, prima della polimerizzazione, se ne possono modulare le proprietà. Infine, è possibile impartire proprietà di riconoscimento molecolare mediante incorporazione dell’analita di interesse nella struttura, in fase di sintesi (polimeri a stampo molecolare) [37] Notevole peso rivestono, inoltre, i polimeri inorganici come gli esacianoferrati di metalli di transizione, grazie alla loro versatilità e alle loro proprietà elettrocatalitiche, che li rendono eccellenti modificanti elettrodici nella progettazione di CME.
- Nei ***multistrati eterogenei***, i supporti solidi sono volontariamente combinati con i mediatori in modo non-uniforme. Come esempio di multistrati eterogenei, le argille sono state variamente impiegate nella progettazione di elettrodi modificati e numerose sono le applicazioni descritte in letteratura [38]. Le argille sono eccellenti scambiatori ionici e la loro selettività è stata sfruttata per realizzare l’accumulo di specie cariche elettroattive (preconcentrazione), con l’obiettivo di eseguire analisi di analiti in tracce [39-42]. Mediatori redox (specie elettroattive reversibili) sono stati immobilizzati per intercalazione negli interstrati di diversi

tipi di argille, e tali elettrodi hanno permesso la determinazione elettrocatalitica di diversi analiti [43]. Infine, idrossidi doppi lamellari (LDH), contenenti, nella struttura, un metallo di transizione in grado di partecipare ad un processo redox, sono stati proposti come modificanti elettrodici nella progettazione di sensori amperometrici, grazie alle loro buone capacità di trasporto di carica [44]. Un'altra via, innovativa e di grande interesse, per modificare le superfici elettrodiche è l'immobilizzazione di specie attive in film di tipo sol-gel. Essi si preparano per idrolisi di un alcossido precursore (come il TMOS, tetrametossisilano) in condizioni acide o basiche, seguita da una policondensazione del monomero idrossilato, per formare una rete polimerica porosa interconnessa, di tipo tridimensionale. Il materiale risultante, di aspetto simile a quello di un vetro, è in grado di trattenere fisicamente il modificante desiderato e permette all'analita di diffondere all'interno della matrice, affinché interagisca con il modificante. Oltre alla possibilità di modulazione delle caratteristiche fisiche (ad esempio, porosità), i processi sol-gel producono un materiale termicamente stabile e meccanicamente rigido [45,46]. Gli elettrodi compositi ceramici a base di carbone (CCE) costituiscono una ulteriore tecnica di preparazione di multistrati stabili [47-52]. La procedura di preparazione consiste nel mescolamento del mediatore con un precursore, quale un metossisilano, nella successiva applicazione di ultrasuoni e quindi nella miscelazione con polvere di carbone. La pasta ottenuta viene, quindi, immobilizzata in un tubo di vetro o su un supporto conduttore fino a che la formazione di legami strutturali non produce un materiale rigido. Infine, è opportuno citare gli elettrodi di pasta di carbone (carbon paste, CPE). Si ottengono per mescolamento della specie elettroattiva con polvere di grafite con "leganti" organici non-conduttori, quali, ad esempio, olio minerale od olio di paraffina. Tali elettrodi hanno una superficie facilmente rinnovabile, sono poco costosi, presentano un buon grado di dispersione della specie elettroattiva, che conduce ad un significativo miglioramento della stabilità e della attività catalitica, consentono la determinazione di analiti con alta sensibilità, grazie ai bassissimi contributi della corrente di bianco [53-56].

BIBLIOGRAFIA

- [1] J.-M. Zen, A. S. Kumar, D.-M. Tsai, *Electroanalysis* 2003, 15, 1073.

- [2] J. Wang, Analytical electrochemistry, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006.
- [3] J. Zak, T. Kuwana, J. Electroanal. Chem. 1983, 150, 645.
- [4] J. Cox, R. Jaworski, P.J. Kulesza, Electroanalysis 1991, 3, 869.
- [5] A. Guadalupe, H. Abruna, Anal. Chem. 1985, 57, 142.
- [6] D.W. Arrigan, Analyst 1994, 119, 1953.
- [7] P. Ugo, L. M. Moreto, Electroanalysis 1995, 7, 1105.
- [8] S. Prabhu, R. Baldwin, L. Kryger, Anal. Chem. 1987, 59, 1074.
- [9] S.V. Sasso, R. Pierce, R. Walla, A. Yacynych, Anal. Chem. 1990, 62, 1111.
- [10] J. Wang, Z. Lu, Anal. Chem. 1990, 62, 826.
- [11] J. Wang, H. Wu, S. Angnes, Anal. Chem. 1993, 65, 1893.
- [12] Q. Cheng, A. Brajter-Toth, Anal. Chem. 1992, 64, 1998.
- [13] R.W. Murray, A. G. Ewing, R. A. Durst, Anal. Chem. 1987, 59, 379A.
- [14] J. Wang, Electroanalysis 1991, 3, 255.
- [15] R. P. Baldwin, K. N. Thomsen, Talanta 1991, 38, 1.
- [16] A. B. Florou, M. I. Prodromidis, S. M. T. Karayanni, M. I. Karayannis, Anal. Chim. Acta 2000, 423, 107.
- [17] M. I. Prodromidis, P. G. Veltsistas, M. I. Karayannis, Anal. Chem. 2000, 72, 3995.
- [18] D. Dicu, L. Muresan, I. C. Popescu, C. Cristea, I. A. Silberg, P. Brouant, Electrochim. Acta 2000, 45, 3951.
- [19] J.-M. Zen, S.-H. Jeng, H.-J. Chen., Anal. Chem. 1996, 68, 498.
- [20] J.-M. Zen, S.-F. Wang, A. Senthil Kumar, Y. Yang, V. Dharuman, Electroanalysis 2002, 14, 99.
- [21] J. Kong, M. G. Chapline, H. Dai, Adv. Mater. 2001, 13, 1384.
- [22] R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, W. A. de Heer, Science 2002, 297, 787.
- [23] R. C. Haddon, Carbon Nanotube, Acc. Chem. Res. 2002, 35, 997.
- [24] Q. Zhao, Z. Gan, Q. Zhang, Electroanalysis 2002, 14, 1609.
- [25] J. Wang, M. Musameh, Anal. Chem. 2003, 75, 2075.
- [26] S. Flink, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, Adv. Mat. 2000, 12, 1315.
- [27] D. Mandler, I. Turyan, Electroanalysis, 1996, 8, 207.
- [28] L. Kavan, Chem. Rev. 1997, 97, 3061.
- [29] A. J. Downard, Electroanalysis 2000, 12, 1085.

- [30] J.-M. Zen, A. Senthil Kumar, *Acc. Chem. Res.* 2001, 34, 772.
- [31] D. R. Rolison, C. A. Bessel, *Acc. Chem. Res.* 2000, 33, 737.
- [32] A. Walcarius, *Chem. Mat.* 2001, 13, 3351.
- [33] M. Sadakane, E. Steckhan, *Chem. Rev.* 1998, 98, 219.
- [34] A. Walcarius, *Anal. Chim. Acta* 1999, 384, 1.
- [35] A. Walcarius, *Electroanalysis* 2001, 13, 701.
- [36] G. Bidan, *Sens. Actuators B* 1992, 6, 45.
- [37] K. Haupt, K. Mosbach, *Chem. Rev.* 2000, 100, 2495.
- [38] C. Mousty, *Appl. Clay Sci.* 2004, 27, 159.
- [39] Z. Navrátilová, P. Kula, *J. Solid State Electrochem.* 2000a, 4, 342.
- [40] Z. Navrátilová, P. Kula, *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000b, 367, 369.
- [41] B. Ballarin, M. Morigi, E. Scavetta, R. Seeber, D. Tonelli, *J. Electroanal. Chem.* 2000a, 492, 7.
- [42] M. Morigi, E. Scavetta, M. Berrettoni, M. Giorgetti, D. Tonelli, *Anal. Chim. Acta* 2001, 439, 265.
- [43] J. Labuda, M. Hudáková, *Electroanalysis* 1997, 9, 239.
- [44] E. Scavetta, M. Berrettoni, M. Giorgetti, D. Tonelli, *Electrochim. Acta* 2002, 47, 2451.
- [45] O. Lev, M. Tsionsky, I. Rabinovich, V. Glezer, S. Sampath, I. Pankratov, J. Gun, *Anal. Chem.* 1999, 67, 22A.
- [46] M. Petit-Dominquez, H. Shen, W. R. Heineman, C. J. Seliskar, *Anal. Chem.* 1997, 69, 703.
- [47] M. Tsionsky, J. Gun, V. Glezer, O. Lev, *Anal. Chem.* 1994, 66, 1747.
- [48] J. Wang, P. V. A. Pamidi, D. S. Park, *Electroanalysis* 1997, 9, 52.
- [49] J. Wang, P. V. A. Pamidi, D. S. Park, *Anal. Chem.* 1996, 68, 2705.
- [50] P. Wang, Y. Yuan, X. Jing, G. Zhu, *Talanta* 2001, 53, 863.
- [51] P. Wang, Y. Yuan, G. Zhu, *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001, 369, 153.
- [52] P. Wang, X. Wang, C. Ren, G. Zhu, *J. Mater. Chem.* 2000, 10, 2863.
- [53] A. Malinauskas, T. Ruzgas, L. Gorton, *J. Coll. Intef. Sci.* 2000, 224, 325.
- [54] F. D. Munteau, L. T. Kubota, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.* 2001, 509, 2.
- [55] B. Nalini, S. S. Narayanan, *Anal. Chim. Acta* 2000, 405, 93.
- [56] P. Kula, Z. Navrátilová, *Electroanalysis* 2001, 13, 795.

2.2. ESACIANOFERRATI DEI METALLI DI TRANSIZIONE (MHCF)

Gli esacianometallati dei metalli di transizione rappresentano una estesa classe di composti inorganici insolubili, a valenza mista.

Possono essere indicati con la formula generale $A_h M_A k [M_B(CN)_6]_l \cdot m H_2O$, dove A è un catione di un metallo alcalino, M_A e M_B sono metalli di transizione con stati di ossidazione formali diversi, e h, k, l e m sono coefficienti stechiometrici.

Quando il ruolo di M_B è assunto da Fe, si parla, in modo più specifico, di esacianoferrati (HCF).

Di seguito saranno presentate le principali caratteristiche degli esacianoferrati, in termini di struttura e proprietà, quindi si descriveranno i metodi impiegabili per effettuarne la sintesi, infine si tratterà una panoramica sulle varie applicazioni analitiche e tecnologiche descritte in letteratura.

2.2.1. STRUTTURA

Il primo esacianoferrato ad essere stato oggetto di studio approfondito è l'esacianoferrato ferrico, detto più comunemente Blu di Prussia (PB). Si tratta di un composto inorganico altamente insolubile e di colore blu intenso, che si presenta come il “prototipo” di questa classe di composti, nonché come il più antico composto di coordinazione riportato nella letteratura scientifica. Gli studi volti a determinare la natura di PB, in termini di formula chimica, stati di ossidazione dei metalli e struttura nello stato solido, cominciarono negli anni '30, quando Keggin e Miles, sulla base di spettri di diffrazione di polveri, discussero la struttura cristallina di questo composto [1], e continuarono con numerosi altri lavori strutturali [2-4], fino alla esaustiva definizione della struttura sulla base di misurazioni spettroscopiche e di diffrazione di elettroni e neutroni su cristalli singoli [5-7].

Solitamente si effettua una distinzione fra due tipi di PB, quello “solubile” ($KFe[Fe(CN)_6]$) e quello “insolubile” ($Fe_4[Fe(CN)_6]_3$). Il Blu di Prussia solubile possiede una struttura cubica di base, consistente in ioni Fe(II) e Fe(III), posizionati su un reticolo cristallino cubico a facce centrate, separati da ponti $-C\equiv N-$ e $-N\equiv C-$. Gli ioni Fe(III) sono coordinati agli atomi di azoto, quelli Fe(II) agli atomi di carbonio

(Figura 2.3). La dimensione della cella unitaria è 10.2 Å. All'interno delle cavità interstiziali sono contenuti cationi dei metalli alcalini, che compensano la carica elettrica e garantiscono il rispetto della elettroneutralità, e molecole di acqua di coordinazione. Il Blu di Prussia insolubile è invece caratterizzato da un maggior disordine strutturale, con presenza di vacanze nel reticolo, causate dal fatto che un quarto degli ioni esacianoferrato non è coordinato.

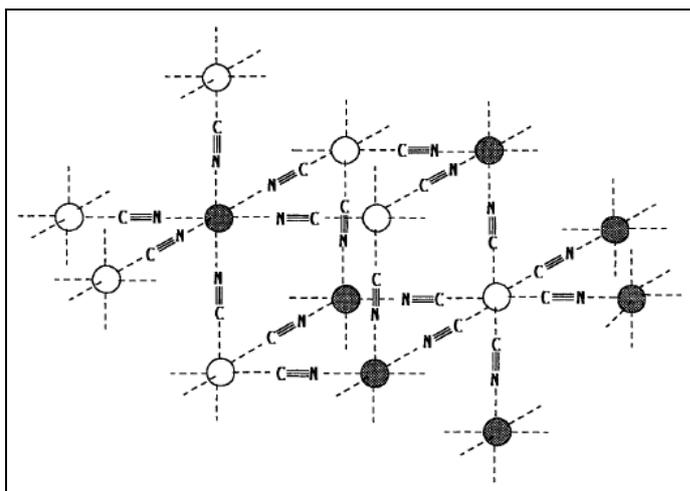


Figura 2.3 – Reticolo cristallino del Blu di Prussia. Le sfere scure e chiare rappresentano, rispettivamente, centri Fe^{3+} e Fe^{2+} . Non sono mostrati gli ioni e le molecole di H_2O interstiziali [8].

La struttura cubica tridimensionale polimerica descritta per PB è comune anche agli altri esacianoferrati di metalli di transizione, che si caratterizzano come materiali complessi, dalla struttura aperta (“zeolitica”), più o meno disordinata, in grado di incorporare cationi e molecole di solvente, e con stechiometrie variabili [9]. La possibilità di sistemare cationi all’interno delle cavità zeolitiche e di scambiarli in soluzione acquosa costituisce una delle principali proprietà degli esacianoferrati (scambio ionico) ed è alla base di numerose applicazioni analitiche e tecnologiche.

2.2.2. METODI DI PREPARAZIONE

Gli esacianoferrati possono essere sintetizzati per via chimica, inducendo una precipitazione “di bulk”, oppure per via elettrochimica, per ottenere film sottili su supporti di materiali conduttori.

- Il **Blu di Prussia** è sintetizzabile *chimicamente* [10,11] per reazione in acqua tra ioni ferro e ioni esacianoferrato con diversi stati di ossidazione degli atomi di Fe, ossia $Fe^{3+} + [Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$ (ferrocianuro) o $Fe^{2+} + [Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$ (ferricianuro),

mentre il mescolamento di soluzioni di ioni con lo stesso numero di ossidazione porta a sistemi apparentemente stabili, che non conducono a formazione di precipitato.

L'*elettrosintesi* [12,13] su supporti conduttori, cioè su elettrodi, è invece condotta a partire da soluzioni acquose contenenti ioni Fe^{3+} e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a circuito aperto (a OCP, il cui valore dipende dal supporto elettrodico) o per applicazione di una driving force elettrochimica di riduzione. Dal punto di vista della tecnica strumentale, si può impiegare la voltammetria ciclica (deposizione per via potenziodinamica) [14], effettuando scansioni successive di potenziale in un range conveniente, oppure la cronoamperometria (deposizione per via potenziostatica), applicando un potenziale costante [15].

- Similmente a quanto accade per PB, anche gli **altri MHCF** possono essere sintetizzati per *via chimica* [16].

Per quanto concerne l'*elettrosintesi* di esacianoferrati, i metodi più comunemente impiegati sono i seguenti [17]:

– ***Via potenziodinamica, da soluzione diluita dei sali di partenza:***

gli ioni dei metalli, come sali solubili, sono aggiunti alla soluzione dell'elettrolita di supporto già contenente anioni $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. L'applicazione di cicli voltammetrici, in un intervallo di potenziale opportuno, induce la precipitazione in situ dell'esacianoferrato insolubile sulla superficie elettrodica, normalmente costituita da materiali inerti, quali carbone vetroso, grafite, Pt o Au, oppure ITO (vetro conduttore, costituito da ossido di indio, drogato con stagno), nel caso di applicazioni spettroelettrochimiche, in cui sia richiesta la proprietà di trasparenza [18-22].

– ***Elettrodeposizione o anodizzazione del metallo, in presenza di $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$:***

il metallo di interesse viene depositato come M^0 su un supporto conduttore inerte, per riduzione di un suo sale in soluzione acquosa ("electroplating"), quindi, similmente a quanto descritto sopra, si applicano cicli voltammetrici in soluzione contenente l'elettrolita di supporto e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Ad ogni scansione anodica, il metallo si ossida e reagisce con l'anione ferricianuro, determinando la

precipitazione dell'esacianoferrato. Alternativamente, lo ione del metallo può essere dosato in situ ("anodizzazione") da un anodo di metallo [9-27].

Nell'elettrosintesi è necessario effettuare un rigido controllo delle variabili operative, perchè la stechiometria del composto ottenuto non dipende solo dalle concentrazioni relative dei precursori, ma anche dal numero di cicli di crescita applicati [28] e, talvolta, persino dall'ampiezza della finestra di potenziale scelta [29,30]. Anche la morfologia è dipendente dalle condizioni sperimentali adottate in fase di elettrosintesi, in particolare dal tempo trascorso fra il mescolamento dei reagenti di partenza e l'applicazione dei cicli di potenziale [28]. Infatti questo "tempo morto" risulta in realtà un tempo di "coagulazione" in cui, sulla superficie conduttrice da modificare, immersa in soluzione, sta già avvenendo la precipitazione di esacianoferrato al potenziale di OCP, anche se a velocità più ridotta rispetto a quando la precipitazione è indotta elettrochimicamente.

Oltre ai più comuni metodi di sintesi di esacianoferrati appena descritti, in letteratura sono riportate anche altre varianti, con procedure ottimizzate specificamente per il tipo di composto desiderato e la natura del supporto elettrodico impiegato. Un esempio è fornito dalla elettrodeposizione di NiHCF e PdHCF su alluminio [31,32].

Nella sintesi di esacianoferrati stati impiegati numerosi metalli di transizione, quali V [33], In [34], Pt [35], Zn [36], Co [37], Pd [32], Ni [38], Cr [39], Mn [40], Ga [41]. La letteratura riporta, inoltre, alcuni esempi di esacianoferrati misti, quali NiPdHCF [42], CuCoHCF [43], FeRuHCF [44], NiCoHCF [45], CuPdHCF [46].

Recentemente sono stati, infine, sintetizzati e caratterizzati composti basati su terre rare [47-49].

2.2.3. CARATTERIZZAZIONE CHIMICA E MORFOLOGICA

Numerose sono le tecniche strumentali idonee alla caratterizzazione degli esacianoferrati di metalli di transizione da un punto di vista chimico e morfologico.

Di seguito se ne riporta una breve panoramica, corredata dai riferimenti di letteratura che ne descrivono l'applicazione.

- ***Morfologia***

Le microscopie a scansione elettronica (SEM) e a forza atomica (AFM) sono state applicate nella caratterizzazione della morfologia di film sottili depositati su materiali conduttori, per ottenere informazioni sull'aspetto dei film e sulla rugosità superficiale [28,50].

- ***Composizione elementare***

L'analisi elementare fornisce conferma dell'identità dello specifico composto depositato, mediante la determinazione del parametro M:Fe (rapporto atomico fra metallo e ferro strutturali). Le tecniche più adatte allo scopo sono la spettroscopia atomica [42] e la spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) [51]. La prima consente di risalire accuratamente alla formula elementare dell'esacianoferrato, visto che l'intero campione è portato in soluzione ed inviato all'analizzatore, mentre la seconda permette la determinazione della composizione elementare superficiale. Meno probante è l'analisi di dispersione di energia a raggi X (EDX), in grado di fornire solamente una informazione qualitativa su uno spessore limitato della superficie del materiale [52].

- ***Struttura, intorno chimico dei metalli, natura e forza dei legami chimici***

La diffrazione a raggi X (XRD) può essere utilmente impiegata per caratterizzare la struttura di esacianoferrati, quando la sintesi abbia prodotto un materiale altamente cristallino [53]. Oltre alla già citata XPS, le spettroscopie a raggi X in generale rappresentano tecniche di elezione per studiare la natura dei legami chimici degli esacianoferrati: numerosi lavori riportano l'impiego delle spettroscopie di assorbimento X, quali XANES e EXAFS, per sondare l'intorno chimico dei metalli di transizione strutturali degli HCF [54,55]. Le più classiche spettroscopie infrarossa (IR) e Raman rappresentano, invece, sonde sensibili e versatili per studiare il gruppo $C\equiv N$ e, indirettamente, per ottenere informazioni sugli ioni strutturali del metallo e del ferro, coordinati rispettivamente a N e a C.

2.2.4. CARATTERIZZAZIONE ELETTROCHIMICA

Per poter essere caratterizzato da un punto di vista elettrochimico, un esacianoferrato deve essere immobilizzato su un supporto conduttore, ossia un

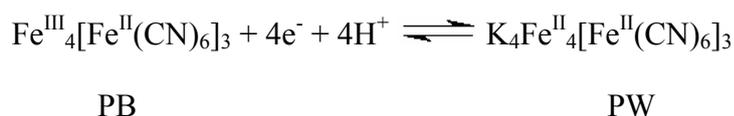
elettrodo. Questo avviene agevolmente nel caso della elettrosintesi, in cui l'esacianoferrato è depositato come film sottile aderente alla superficie dell'elettrodo. Nel caso della sintesi chimica, alcuni granuli del precipitato possono essere immobilizzati meccanicamente, per abrasione, sulla superficie elettrodica (è il caso dei PIGE, gli elettrodi di grafite impregnati con paraffina) [56,57], oppure possono essere mescolati con polvere di grafite e con un "legante" ("binder") nella fabbricazione di un elettrodo di tipo "carbon paste" [58].

- ***Processi redox coinvolgenti il film***

L'elettrodo, così modificato, viene trasferito in una soluzione contenente solo l'elettrolita di supporto e sottoposto a cicli voltammetrici di caratterizzazione. I voltammogrammi presentano una o più coppie di picchi reversibili, attribuibili a processi redox che coinvolgono il film. La complessità del voltammogramma dipende dal particolare sistema esaminato e da quanti composti a stechiometria variabile sono contenuti nel film depositato. Nella maggioranza dei casi, la separazione fra i potenziali di picco di una coppia tende a 0 (< 20 mV), caratteristica tipica dei processi di ossidoriduzione confinati in superficie (comportamento di strato sottile, TLC) [59]. Talvolta, a velocità di scansione più elevate, compaiono limitazioni cinetiche al trasferimento di carica e il comportamento diventa diffusivo [32]. In alcuni casi, il comportamento è diffusivo per tutte le velocità di scansione [49].

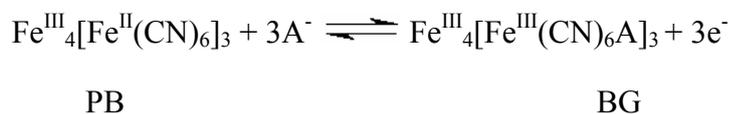
I processi redox sono accompagnati da un flusso di cationi di metalli alcalini dentro e fuori la struttura aperta del composto, per mantenere la condizione di elettroneutralità del film: i cationi entrano in fase di riduzione ed escono in fase di ossidazione. L'aspetto del profilo voltammetrico è fortemente influenzato dalla natura del catione dell'elettrolita di supporto e non risente di effetti memoria nel passare da un catione ad un altro [60,61]. Addirittura, cationi troppo voluminosi, incapaci di penetrare nel reticolo cristallino, inibiscono completamente l'attività elettrochimica. Non è ancora ben chiaro se e quando tali cationi si intercalino come ioni idratati [62], disidratati o parzialmente idratati [43]. Per alcuni esacianoferrati si è anche ipotizzato che il bilanciamento di carica avvenga per intrappolamento di anioni, piuttosto che di cationi [63].

Particolarmente interessante è il caso del Blu di Prussia [64], il cui voltammogramma di caratterizzazione (in elettrolita di supporto contenente ioni K^+) rivela due sistemi di picchi, il primo centrato attorno a +0.1 V, il secondo attorno a +0.8 V (vs SCE). Il primo sistema rappresenta la conversione del Blu di Prussia nella sua forma ridotta, il Bianco di Prussia (PW), secondo la reazione :



Quando questi picchi sono stretti, il film di PB depositato possiede una struttura regolare, caratterizzata da una distribuzione di carica e da velocità omogenee di movimento degli ioni all'interno del film. La transizione PB – PW è promossa solo da K^+ , NH_4^+ , Rb^+ e Cs^+ , mentre gli altri cationi inibiscono l'attività elettrochimica (cationi “bloccanti”).

Il secondo sistema di picchi, a potenziali più positivi, rappresenta la conversione del Blu di Prussia nella sua forma ossidata, il Verde di Berlino (BG). Si è ipotizzata la seguente equazione per il processo di ossidazione, probabilmente coinvolgente l'intrappolamento di anioni per bilanciare la carica:



- ***Flussi ionici***

Il flusso di cationi dentro e fuori la struttura può essere monitorato mediante spettroscopia di impedenza in corrente alternata (ACIS) [65] e mediante l'impiego della bilancia elettrochimica a cristallo di quarzo (EQCM) [66].

- ***Proprietà di elettrocromismo***

Alcuni esacianoferrati assumono colorazioni diverse a seconda che si trovino nello stato ridotto, oppure ossidato (proprietà di elettrocromismo). La spettroelettrochimica è una tecnica versatile, che consente di studiare i fenomeni di elettrocromismo combinando spettroscopia ed elettrochimica. Mentre l'esacianoferrato, depositato come film su di un supporto, viene ridotto od

ossidato, si effettuano simultaneamente misurazioni spettroscopiche sulla superficie elettrodica, o sullo strato di soluzione immediatamente adiacente all'elettrodo (misura "in situ"). Le misurazioni possono essere effettuate anche "ex-situ" su film nello stato ossidato o ridotto. La spettroelettrochimica consente di determinare quante specie sono coinvolte durante le reazioni redox a cui partecipa il film di esacianoferrato. Le tecniche maggiormente impiegate per la rivelazione in spettroelettrochimica sono la spettroscopia UV-visibile (in trasmissione o in riflettanza) e le spettroscopie IR e Raman. [67,68].

2.2.5. APPLICAZIONI ANALITICHE E TECNOLOGICHE

Gli esacianoferrati dei metalli di transizione sono caratterizzati da una chimica di stato solido interessante e da proprietà strutturali uniche e versatili, motivo per cui, negli ultimi anni, sono stati oggetto di intenso studio, volto all'impiego in numerosi campi di applicazione analitici e tecnologici.

Di seguito si fornisce un quadro generale dello stato dell'arte delle principali applicazioni.

- ***Sensoristica***

Poichè gli esacianoferrati sono in grado di scambiare gli ioni contenuti in soluzione con quelli intercalati nelle loro cavità, sono stati impiegati come modificanti della superficie elettrodica nello sviluppo di sensori potenziometrici selettivi per diversi cationi [69-73].

Gli HCF possono, inoltre, manifestare proprietà elettrocatalitiche per la rivelazione di numerosi analiti. In pratica, questi composti, depositati come film, fungono da derivatizzanti della superficie elettrodica e impartiscono elevata velocità di trasferimento elettronico al supporto sottostante [41,74,75], consentendo la rivelazione dell'analita di interesse a potenziali meno "estremi" di quelli richiesti in assenza di mediatore. Grazie alla proprietà di elettrocatalisi, sono stati progettati sensori amperometrici, ad esempio, per H₂O₂ [58], dopamina [76,20,32], idrazina [77,78], acido ascorbico [79-81], SO₃²⁻, S₂O₃²⁻ [82].

- ***Dispositivi elettrocromici***

Come già accennato, l'elettrocromismo è un fenomeno consistente nella variazione di colore di un materiale quando acquista o cede elettroni [83]. Molti esacianoferrati possiedono questa proprietà, che li rende notevolmente promettenti per applicazioni ottiche quali i dispositivi elettrocromici (display). Le caratteristiche che un materiale deve possedere per la progettazione di buon display sono bassi potenziali richiesti per passare da un colore all'altro, basso consumo di potenza, buon contrasto fra le colorazioni delle forme ossidata e ridotta, alta stabilità all'applicazione di un elevato numero di cicli di potenziale [84]. Il Blu di Prussia, depositato su SnO₂ [85,86] e TiO₂ [84], è stato ampiamente impiegato nella costruzione di dispositivi in grado di rispondere velocemente all'applicazione di un potenziale, passando da blu intenso a trasparente. Altri esacianoferrati si sono dimostrati promettenti come materiali elettrocromici, anche se il contrasto di colore massimo ottenibile è molto minore di quello garantito dal PB.

Un modo per migliorare il contrasto nei dispositivi elettrocromici è quello di combinare due componenti attivi complementari con l'esacianoferrato. Ad esempio, sono stati impiegati ossidi inorganici o polimeri conduttori, come il già citato TiO₂, SrTiO₃ [87] e il polipirrolo [88]. Sono stati preparati materiali compositi, combinando PB con polimeri conduttori, quali politiofene e polianilina [89-91]. Un nuovo dispositivo, impiegante PB su WO₃ e un gel a base di PAN (poliacrilonitrile), ha mostrato ottime prestazioni, quali rapidità di responso, alta efficienza di colorazione, reversibilità per oltre 10⁵ cicli. Il polimero ionico conduttore PAN migliora i tempi di risposta, mentre PB intensifica la colorazione blu [92]. Un importante vantaggio aggiuntivo, legato all'impiego di TiO₂, è la possibilità di sfruttare effetti fotoelettrocromici, quando la variazione di colore nel materiale elettrocromico è indotta da un trasferimento di carica foto-eccitato dalle particelle dell'ossido semiconduttore accoppiato [93,94].

- ***Rimozione di cationi***

Grazie alla proprietà di scambio ionico, gli esacianoferrati sono in grado di fungere da setacci ionici. I cationi (ad esempio K⁺) intercalati nella struttura possono essere scambiati con cationi più pesanti, fino al raggiungimento di un

certo limite, dopo il quale un ulteriore scambio è sfavorito dalle interazioni repulsive tra gli ioni carichi positivamente. Questa strategia assume particolare importanza nella rimozione di ^{137}Cs da reflui di processi nucleari da parte di NiHCF [95-97].

- **Batterie**

Grazie alla capacità, mostrata dagli HCF, di intercalare ioni all'interno delle loro cavità, si è studiata la possibilità di impiegare questi materiali come componenti attivi di batterie. Una delle prime applicazioni riguarda il Blu di Prussia e si basa sul decorso della ossidazione e della riduzione a Verde di Berlino e Bianco di Prussia, rispettivamente, come semi-reazioni [98]. I vantaggi di usare PB per la progettazione di celle elettrochimiche consistono nell'alta reversibilità delle reazioni coinvolte, nella elevata densità di energia ottenibile, nella stabilità del materiale in soluzioni acide, nell'assenza di un separatore fra le semicelle. Si è impiegato il Nafion come membrana per l'impregnazione di PB o come matrice per compositi nella costruzione di celle elettrochimiche a stato solido. Il posizionamento di sistemi PB-Nafion fra elettrodi di ITO ha consentito di ottenere, oltre ad un'alta stabilità operativa del dispositivo, il controllo visuale delle condizioni durante la carica [99].

Altri esacianoferrati sono stati studiati per potenziali applicazioni nelle batterie [100-103]. Tuttavia, la stabilità ad un alto numero di cicli successivi di carica-scarica e la cinetica di trasferimento di carica sono due parametri chiave che ancora necessitano di ulteriore ottimizzazione, per poter effettivamente competere con altre alternative già disponibili.

- **Dispositivi magneto-ottici e foto-magnetici**

La progettazione di composti che presentano una magnetizzazione spontanea ad "alte" (temperatura ambiente) temperature di Curie (T_c) rappresenta una delle sfide più interessanti nella scienza dei materiali molecolari. Recentemente, sono stati intensamente studiati anche nuovi materiali magnetici in cui le proprietà magnetiche sono combinate con proprietà ottiche ed elettriche. Un altro obiettivo di grande interesse è il controllo delle proprietà magnetiche mediante uno stimolo esterno, quale la luce. L'impiego di fotoni consente la progettazione di un'ampia

varietà di materiali con prestazioni superiori, quali alta velocità di risposta ed elevata risoluzione.

Gli effetti di foto-magnetismo rendono gli HCF potenzialmente applicabili nella costruzione di memorie ottiche e di isolanti ottici, e nella memorizzazione di dati [104,105].

- *Dispositivi foto-elettrochimici e foto-catalitici* [17,92,106].

BIBLIOGRAFIA

- [1] J.F. Keggin, F.D. Miles, *Nature* 1936, 137, 577.
- [2] D. Davidson, *J. Chem. Educ.* 1937, 14, 277.
- [3] W. Prandtl, S. Mohr, *Z. Anorg. Allgem. Chem.* 1938, 236, 243.
- [4] H. Holtzman, *Ind. Eng. Chem.* 1945, 37, 855.
- [5] F. Herren, P. Fischer, A. Ludi, W. Hälg, *Inorg. Chem.* 1980, 19, 956.
- [6] M.B. Robin, P. Day, *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* 1967, 10, 247.
- [7] J.F. Duncan, P.W.R. Wrigley, *J. Chem. Soc.* 1963, 1120.
- [8] M. Hermes, F. Scholz, *J. Solid State Electrochem.* 1997, 1, 215.
- [9] K. Itaya, I. Uchida, V.D. Neff, *Acc. Chem. Res.* 1986, 19, 162.
- [10] V.D. Neff, *J. Electrochem. Soc.* 1978, 125, 886
- [11] D. Ellis, M. Eckhoff, V.D. Neff, *J. Phys. Chem.* 1981, 85, 1225.
- [12] K. Itaya, H. Akahoshi, S. Toshima, *J. Electrochem. Soc.* 1982, 129, 1498.
- [13] H. Kellawi, D.R. Rosseinski, *J. Electroanal. Chem.* 1982, 131, 373.
- [14] L. Guadagnini, A. Maljusch, X. Chen, S. Neugebauer, D. Tonelli, W. Schuhmann, *Electrochim. Acta* 2009, 54, 3753.
- [15] I.L. de Mattos, L. Gorton, T. Ruzgas, A.A. Karyakin, *Anal. Sci.* 2000, 16, 795.
- [16] S. Ayrault, C. Loos-Neskovic, M. Fedoroff, E. Garnier, *Talanta* 1994, 41, 1435.
- [17] N.R. de Tacconi, K. Rajeshwar, R.O. Lezna, *Chem. Mater.* 2003, 15, 3046.
- [18] P.J. Kulesza, Z. Galus, *J. Electroanal. Chem.* 1989, 267, 117.
- [19] S.-M. Chen, *J. Electroanal. Chem.* 1996, 417, 145.
- [20] D.M. Zhou, H.X. Ju, H.Y. Chen, *J. Electroanal. Chem.* 1996, 408, 219.
- [21] J. Joseph, H. Gomathi, G.P. Rao, *J. Electroanal. Chem.* 1997, 431, 231.

- [22] J. Kukulka-Walkiewicz, J. Stroka, M. A. Malik, P. J. Kulesza, Z. Galus, *Electrochim. Acta* 2001, 46, 4057.
- [23] A.B. Bocarsly, S. Sinha, *J. Electroanal. Chem.* 1982, 137, 157.
- [24] S. Sinha, B.D. Humphrey, E. Fu, A.B. Bocarsly, *J. Electroanal. Chem.* 1984, 162, 351.
- [25] S. Sinha, B.D. Humphrey, A.B. Bocarsly, *Inorg. Chem.* 1984, 23, 203.
- [26] A.K. Jain, R.P. Singh, C. Bala, *Anal. Lett.* 1982, 15, 1557.
- [27] L.M. Siperko, T. Kuwana, *J. Electrochem. Soc.* 1983, 130, 396.
- [28] R.O. Lezna, R. Romagnoli, N.R. de Tacconi, K. Rajeshwar, *J. Phys. Chem. B* 2002, 106, 3612.
- [29] E. Cziráok, J. Bácskai, P.J. Kulesza, G. Inzelt, A. Wolkiewicz, K. Mielcznikowski, M.A. Malik, *J. Electroanal. Chem.* 1996, 405, 205.
- [30] N.R. de Tacconi, K. Rajeshwar, R.O. Lezna, *J. Electroanal. Chem.* 2001, 500, 270.
- [31] H. Razmi, K. Heidari, *Electrochim. Acta* 2006, 51, 1293.
- [32] H. Razmi, A. Azadbakht, *Electrochim. Acta* 2005, 50, 2193.
- [33] C. G. Tsiafoulis, P. N. Trikalitis, M. I. Prodromidis, *Electrochem. Commun.* 2005, 7, 1398.
- [34] V. Malev, V. Kurdakova, V. Kondratiev, V. Zigel, *Solid State Ionics* 2004, 169, 95.
- [35] S. Liu, H. Li, M. Jiang, P. Li, *J. Electroanal. Chem.* 1997, 426, 27.
- [36] J. Joseph, H. Gomathi, G.P. Rao, *J. Electroanal. Chem.* 1997, 431, 231.
- [37] Z. Xun, C. Cai, W. Xing, T. Lu, *J. Electroanal. Chem.* 2003, 545, 19.
- [38] A.V. Krylov, F. Lisdat, *Electroanalysis* 2007, 19, 23.
- [39] G. Lopez de Lara Gonzalez, H. Kahlert, F. Scholz, *Electrochim. Acta* 2007, 52, 1968.
- [40] D. Jayasri, S. S. Narayanan, *Food Chem.* 2007, 101, 607.
- [41] H. Yu, Q.L. Sheng, J.B. Zheng, *Electrochim. Acta* 2007, 52, 4403.
- [42] P.J. Kulesza, M.A. Malik, R. Schmidt, A. Smolinska, K. Mielcznikowski, S. Zamponi, A. Czerwinski, M. Berrettoni, R. Marassi, *J. Electroanal. Chem.* 2000, 487, 57.
- [43] X. Cui, L. Hong, X. Lin, *J. Electroanal. Chem.* 2002, 526, 115.

- [44] R. Pauliukaite, S.B. Hočevvar, E.A. Hutton, B. Ogorevc, *Electroanalysis* 2008, 20, 47.
- [45] P. J. Kulesza, M. A. Malik, J. Skorek, K. Miecznikowski, S. Zamponi, M. Berrettoni, M. Giorgetti, R. Marassi, *J. Electrochem. Soc.* 1999, 146, 3757.
- [46] L. Guadagnini, M. Giorgetti, F. Tarterini, D. Tonelli, *Electroanalysis* 2010, accettato.
- [47] P.Wu, C. Cai, *Chin. J. Chem.* 2005, 23, 127.
- [48] P.Wu, Y. Shi, C. Cai, *J. Solid State Electrochem.* 2006, 10, 270.
- [49] Q.L. Sheng, H. Yu, J.B. Zheng, *Electrochim. Acta* 2007, 52, 4506.
- [50] P. Wu, S. Lu, C. Cai, *J. Electroanal. Chem.* 2004, 569, 143.
- [51] P. Wu, C. Cai, *J. Solid State Electrochem.* 2004, 8, 538.
- [52] A. Lisowska-Oleksiak, A. P. Nowak, *J. Power Sources* 2007, 173, 829.
- [53] W. A. Steen, S.-W. Han, Q. Yu, R. A. Gordon, J. Olmsted Cross, E. A. Stern, G. T. Seidler, K. M. Jeerage, D. T. Schwartz, *Langmuir* 2002, 18, 7714.
- [54] M. Giorgetti, M. Berrettoni, *Inorg. Chem.* 2008, 47, 6001.
- [55] M. Giorgetti, S. Della Longa, M. Benfatto, *J. Phys.: Conf. Ser.* 2009, 190.
- [56] N.F. Zakharchuk, N. Naumov, R. Stosser, F. Scholz, H. Mehner, *J. Solid State Electrochem.* 1999, 3, 264.
- [57] A. Dostal, B. Meyer, F. Scholtz, U. Schroder, M.A. Bond, F. Marken, S.J. Shaw, *J. Phys. Chem.* 1995, 99, 2096.
- [58] R. Garjonyte, A. Malinauskas, *Sens. Actuat. B* 1998, 46, 236.
- [59] S.-M. Chen, C.-J. Liao, *Electrochim. Acta* 2004, 50, 115.
- [60] A.B. Bocarsly, S. Sinha, *J. Electroanal. Chem.* 1982, 140, 167.
- [61] S. – M. Chen, *J. Electroanal. Chem.* 2002, 521, 29.
- [62] P.J. Kulesza, M.A. Malik, M. Berrettoni, M. Giorgetti, S. Zamponi, R. Schmidt, R. Marassi, *J. Phys. Chem. B* 1998, 102, 1870.
- [63] M.A. Malik, G. Horanyi, P.J. Kulesza, G. Inzelt, V. Kertesz, R. Schmidt, E. Czirok, *J. Electroanal. Chem.* 1998, 452, 57.
- [64] A.A. Karyakin, *Electroanalysis* 2001, 13, 813.
- [65] N.R. de Tacconi, K. Rajeshwar, R.O. Lezna, *J. Electroanal. Chem.* 2006, 587, 42.
- [66] J. Bácskai, K. Martinusz, E. Czirók, G. Inzelt, P.J. Kulesza, M.A. Malik, *J. Electroanal. Chem.* 1995, 385, 241.

- [67] R.O. Lezna, R. Romagnoli, N. R. de Tacconi, K. Rajeshwar, J. Electroanal. Chem. 2003, 544, 101.
- [68] W.A. Steen, K.M. Jeerage, D.T. Schuartz, Appl. Spectrosc. 2002, 56, 1021.
- [69] L. F. Schneemeyer, S. E. Splengler, D. W. Murphy, Inorg. Chem. 1985, 24, 3044.
- [70] K. N. Thomsen, R. P. Baldwin, Anal. Chem. 1989, 61, 2594.
- [71] Y. Tani, H. Eun, Y. Umezawa, Electrochim. Acta 1998, 43, 3431.
- [72] M. Zadronecki, I. A. Linek, J. Stroka, P. K. Wrona, Z. Galus, J. Electrochem. Soc. 2001, 148, E348.
- [73] A. R. Coon, L. J. Amos, A. B. Bocarsly, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, Anal. Chem. 1998, 70, 3137.
- [74] R. W. Murray, in Electroanalytical Chemistry, Ed. A. J. Bard, Marcel Dekker, New York, 1984, vol. 13, pag. 191.
- [75] M. Florescu, C.M.A. Brett, Anal. Lett. 2004, 37, 871.
- [76] S. – M. Chen, K. – T. Peng, J. Electroanal. Chem. 2003, 547, 179.
- [77] C. Lin, A. B. Bocarsly, J. Electroanal. Chem. 1991, 300, 325.
- [78] H. Razmi, A. Azadbakht, M. H. Sadr, Anal. Sci. 2005, 21, 1317.
- [79] D. R. Shankaran, S. S. Narayanan, Fresenius J. Anal. Chem. 1999, 364, 686.
- [80] C. –X. Cai, K. –H. Xue, S. – M. Xu, J. Electroanal. Chem. 2000, 486, 111.
- [81] B. D. Humphrey, S. Sinha, A. B. Bocarsly, J. Phys. Chem. 1987, 91, 586.
- [82] S. – M. Chen, J. Electroanal. Chem. 1996, 417, 145, 61.
- [83] P.M.S. Monk, R.J. Mortimer, D.R. Rosseinsky, Electrochromism: Fundamentals and Applications, VCH, Weinheim, 1995.
- [84] D.W. DeBerry, A. Viehbeck, J. Electrochem. Soc. 1983, 130, 249.
- [85] K. Itaya, K. Shibayama, H. Akahoshi, S. Toshima, J. Appl. Phys. 1982, 53, 804.
- [86] M. K. Carpenter, R. S. Conell, J. Electrochem. Soc. 1990, 137, 2464.
- [87] J. P. Ziegler, J. C. Hemminger, J. Electrochem. Soc. 1987, 134, 358.
- [88] N. Leventis, Y. C. Chung, Chem. Mater. 1992, 4, 1415.
- [89] M. Kaneko, K. Takahashi, E. Tsuchida, J. Electroanal. Chem. 1987, 227, 255.
- [90] N. Leventis, Y. C. Chung, J. Electrochem. Soc. 1990, 137, 3321.
- [91] M. Morita, J. Appl. Polym. Sci. 1994, 52, 711.

- [92] K. R. Dunbar, R. H. Heintz, Chemistry of Transition Metal Cyanide Compounds: Modern Perspectives, in Progress in Inorganic Chemistry, vol. 45, editore K. D. Karlin, John Wiley & sons, Inc., 1997.
- [93] N. R. de Tacconi, J. Carmona, K. Rajeshwar, J. Phys. Chem. B 1997, 101, 10151.
- [94] N. R. de Tacconi, J. Carmona, W. L. Balsam, K. Rajeshwar, Chem. Mater. 1998, 10, 25.
- [95] W. E. Prout, E. R. Russell, H. J. Groh, J. Inorg. Nucl. Chem. 1965, 27, 473.
- [96] M. A. Lilga, R. J. Orth, J. P. H. Sukamto, S. M. Haight, D. T. Schwartz, Sep. Purif. Technol. 1997, 11, 147.
- [97] S. D. Rassat, J. P. H. Sukamto, R. J. Orth, M. A. Lilga, R. T. Hallen, Sep. Purif. Technol. 1999, 15, 207.
- [98] V. D. Neff, J. Electrochem. Soc. 1985, 132, 1382.
- [99] K. Honda, H. Hayashi, J. Electrochem. Soc. 1987, 134, 1330.
- [100] E. W. Grabner, S. Kalwellis-Mohn, J. Appl. Elettrochem. 1987, 17, 653.
- [101] S. Kalwellis-Mohn, E. W. Grabner, Electrochim. Acta 1989, 34, 1265.
- [102] M. Jayalakshmi, F. Scholz, J. Power Sources 2000, 91, 217.
- [103] K. Honda, J. Ochiai, H. Hayashi, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1986, 168.
- [104] H. J. Buser, D. Schwarzenbach, W. Petter, A. Ludi, Inorg. Chem. 1977, 16, 2704.
- [105] S.-Ii. Ohkoshi, K. Hashimoto, J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev. 2001, 2, 71.
- [106] A. B. Bocarsly, Chem. Ind. 1992, 1, 813.

2.3. IDROTALCITI

Negli anni '80 si è iniziata a studiare la possibilità di modificare le superfici elettrodiche con materiali inorganici cristallini, quali zeoliti, argille o solidi microporosi [1].

Tali rivestimenti possiedono interessanti caratteristiche:

- sono stabili e resistenti, per cui possono essere impiegati anche a temperature molto elevate e in ambienti fortemente ossidanti;
- possono incorporare ioni al loro interno ed essere utilizzati come matrici di supporto;
- possiedono una struttura cristallina ben definita, che conferisce loro selettività sterica, cioè la capacità di riconoscere, con un certo grado di specificità, una determinata specie in relazione alla sua forma, carica elettrica e struttura. Le argille, in particolare, possedendo una struttura a strati legati tra loro da interazioni deboli, possono rigonfiare in ambiente acquoso e ospitare molecole.

Recentemente, è stato riportato in letteratura l'utilizzo di argille nella fabbricazione di biosensori [2]. Tali materiali sono promettenti come matrici per l'immobilizzazione enzimatica, poichè possiedono un alto contenuto di acqua, che crea un ambiente biocompatibile per le molecole supportate, hanno una struttura porosa che permette l'elevata mobilità dell'analita e dei prodotti di reazione, non sono tossici, presentano elevata stabilità chimica e idrolitica [3].

2.3.1. ARGILLE

Le argille costituiscono una serie di composti molto diffusi in natura e sono sintetizzabili in laboratorio mediante procedure non eccessivamente complesse. Presentano una struttura a strati carichi, sovrapposti e paralleli, legati tra loro da deboli interazioni elettrostatiche [4]. La larghezza dell'interstrato dipende da fattori quali il grado di idratazione dell'argilla e le dimensioni dello ione intercalato fra gli strati. Vari ioni possono essere inseriti negli interstrati delle argille, compresi composti organici polari che, a causa dell'elevata dimensione, provocano un aumento della distanza d'interstrato.

Una delle caratteristiche principali delle argille è la loro capacità di scambiare gli ioni presenti negli interstrati, proprietà che le rende idonee ad una varietà di applicazioni.

Le argille possono essere divise in due gruppi:

1. **Argille cationiche:** largamente diffuse in natura, sono costituite da strati, carichi negativamente, formati da idrossidi di alluminio e di silicio. L'eccesso di carica negativa è bilanciata da cationi situati negli interstrati. La maggior parte delle argille cationiche è costituita da alluminosilicati, minerali costituiti da $\text{Si}(\text{O},\text{OH})$, a coordinazione tetraedrica, e $\text{M}(\text{O},\text{OH})$ (con $\text{M} = \text{Al}^{3+}$, Mg^{2+} , Fe^{3+} o Fe^{2+}), a coordinazione ottaedrica. Si possono distinguere i minerali 1:1, in cui si alternano strati tetraedrici ed ottaedrici, e 1:2, in cui uno strato ottaedrico è situato tra due strati tetraedrici.

Quando un atomo di Si o del metallo M viene sostituito da un catione con valenza inferiore, gli strati dell'argilla risultano carichi negativamente e l'eccesso di carica viene bilanciato con l'introduzione di cationi bivalenti o monovalenti, di piccole dimensioni, nell'interstrato. Fra gli strati sono anche presenti molecole di acqua, che determinano il grado di idratazione. In condizioni di elevata umidità alcune argille cationiche rigonfiano fino ad assumere la consistenza di gel.

Le argille cationiche vengono impiegate industrialmente come catalizzatori in numerosi processi, quali l'isomerizzazione e l'alchilazione di Friedel-Crafts [5].

2. **Argille anioniche:** meno diffuse in natura, sono costituite da strati idrossidici carichi positivamente. Gli interstrati contengono specie anioniche e molecole d'acqua [6]. Sono conosciute con nomi diversi a seconda della composizione chimica e del tipo di struttura.

2.3.2. IDROTALCITI (HT)

L'idrotalcite è un idrossicarbonato di magnesio e alluminio, presente in natura in forma lamellare distorta. La sua formula molecolare, $\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}(\text{CO}_3)\times 4\text{H}_2\text{O}$, è stata determinata da Manasse [7]. Nel 1942 Feitknecht sintetizzò numerosi composti con struttura idrotalcitica, che chiamò "composti a doppio strato". Ipotizzò che fossero costituiti da strati di idrossido dei due cationi intercalati [8,9]. Tale ipotesi fu però confutata da Allmann e Taylor che, utilizzando tecniche diffrattografiche, dimostrarono che i cationi sono localizzati nello stesso strato e gli anioni carbonato sono disposti

negli interstrati, insieme a molecole di acqua [10-12]. In Figura 2.4 è rappresentata schematicamente la struttura dell'idrotalcite.

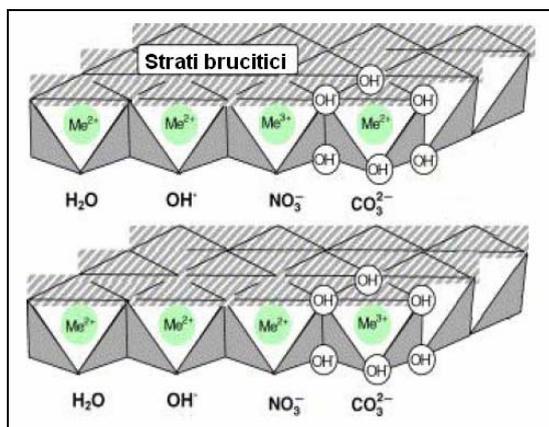


Figura 2.4 - Rappresentazione schematica della struttura di una idrotalcite.

La struttura della idrotalcite [13] può essere compresa prendendo in considerazione quella della brucite, ossia $Mg(OH)_2$, in cui ogni ione Mg^{2+} è legato a sei ioni OH^- con coordinazione ottaedrica. Gli ottaedri condividono uno spigolo, formando strati impilati l'uno sull'altro e legati tra loro da legami a idrogeno. Se una parte degli ioni Mg^{2+} viene sostituita da ioni trivalenti di dimensione opportuna, come Al^{3+} per l'idrotalcite, gli strati diventano carichi positivamente e tale eccesso di carica è bilanciato da anioni (il più comune dei quali è il carbonato), i quali vengono intercalati fra gli strati idrossidici. Negli interstrati si trovano anche molecole d'acqua, che si legano agli strati idrossidici e agli anioni mediante legami a idrogeno.

2.3.3. COMPOSTI DI TIPO IDROTALCITE (Htlc)

2.3.3.1. Struttura

È possibile preparare per via sintetica un grande numero di composti detti “di tipo idrotalcite” (*Htlc*) o “idrossidi doppi a strato” (LDH) che sono descritti dalla seguente formula generale:

$[M_1(II)_{1-x}M_2(III)_x(OH)_2]^{x+}(A^{n-})_{x/n} \cdot mH_2O$ [14-17]. Più brevemente, una HT a base di metalli $M_1(II)$ e $M_2(III)$, con l'anione A^{n-} intercalato negli interstrati, viene indicata come $M_1(II)/M_2(III)-A$.

Le principali variabili compositive sono le seguenti:

- natura dello ione $M(II)$, che può rappresentare 1 o 2 metalli bivalenti diversi;
- ione $M(III)$, il quale può, similmente, essere di 1 o 2 metalli trivalenti differenti;

- valore di x , cioè rapporto stechiometrico tra i due ioni metallici;
- anione intercalato A^{n-} , con carica e proprietà variabili;
- numero di molecole d'acqua;
- morfologia e dimensioni del cristallo.

Con un così ampio numero di variabili, diventa possibile sintetizzare un vasto numero di HT, dalle proprietà e caratteristiche molto differenti.

Vi sono, però, alcuni limiti nella scelta del catione metallico. Tale ione deve avere una dimensione tale da poter assumere una coordinazione ottaedrica con 6 ossidrili all'interno di una struttura a strati brucitici. Per questo possono essere sintetizzati composti di tipo HT solamente impiegando ioni con valori di raggio ionico molto simili a quelli di Mg^{2+} e ad Al^{3+} , aventi caratteristiche elettroniche compatibili con la simmetria ottaedrica [15,18-21].

In Tabella 1 sono riportati i raggi degli ioni bivalenti e trivalenti di alcuni metalli:

M(II)	Be	Mg	Cu	Ni	Co	Zn	Fe	Mn	Cd	Ca
	0.30	0.65	0.69	0.72	0.74	0.74	0.76	0.80	0.97	0.98
M(III)	Al	Ga	Ni	Co	Fe	Mn	Cr	V	Ti	In
	0.5	0.62	0.62	0.63	0.64	0.66	0.69	0.74	0.76	0.81

Tabella 1 - Raggi ionici, in Å, di alcuni ioni metallici.

Per quanto detto precedentemente, possono essere sintetizzati con successo composti di tipo idrotalcite con ioni trivalenti di raggio compreso tra 0.50 e 0.80 Å e con ioni bivalenti di raggio compreso tra 0.65 e 0.80 Å, ad eccezione di Cu^{2+} , il quale, a causa della sua configurazione elettronica, non assume una simmetria ottaedrica, ma forma composti caratterizzati da distorsione tetragonale, per effetto Jahn-Teller [17,22].

È però possibile sintetizzare HT con “miscele” di metalli, anche con raggio ionico elevato o configurazione elettronica non coerente con la simmetria ottaedrica, purché in percentuali ridotte. In questo modo sono state sintetizzate HT contenenti Cu^{2+} in basse percentuali, insieme ad un metallo bivalente con le caratteristiche idonee per la struttura idrotalcitica.

Il rapporto M(II)/M(III) (cioè x) non è strettamente fissato, ma può variare in un intervallo relativamente ampio, poiché i due ioni assumono, negli strati

idrotalcitici, una distribuzione casuale. Al fine, però, di ottenere una fase idrotalcitica pura, occorre che x sia compreso tra 0.20 e 0.33, altrimenti avviene la segregazione, accanto alla fase idrotalcitica, dell'idrossido dello ione in eccesso [14,20].

Per quanto riguarda la scelta dell'anione intercalato, non esistono limitazioni, visto che esso stesso, con il suo ingombro sterico, determina la distanza fra gli strati. L'anione più comune, presente nella idrotalcite naturale, è CO_3^{2-} . Esso stabilisce forti interazioni con gli strati brucitici e, quindi, nella preparazione di HT contenenti anioni diversi, si verifica con facilità una contaminazione da carbonato, presente nell'atmosfera o nelle soluzioni acquose di sintesi.

In letteratura [23,24] è riportata la preparazione di un gran numero di idrotalciti contenenti anioni differenti:

- anioni inorganici: F^- , Cl^- , Br^- , I^- , ClO_4^- , NO_3^- , ClO_3^- , IO_3^- , OH^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, WO_4^{2-} , CrO_4^{2-} , $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$;
- iso o eteropolianioni, come $[\text{PMo}_2\text{O}_{40}]^{3-}$, $[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$;
- anioni di acidi organici, quali ossalato, succinato, malonato;
- composti metallorganici anionici.

Modificando l'anione intercalato è possibile sintetizzare HT con diversa ampiezza dell'interstrato, il cui valore è fortemente dipendente da numero, dimensione, orientamento e forza dei legami tra l'anione stesso e gli ossidrili dello strato brucitico [14,19,20,25].

Solidi composti da strati inorganici e organici alternati hanno ricevuto considerevole attenzione per un'ampia varietà di applicazioni, ad esempio come catalizzatori [26-28], materiali funzionalizzati [29-31], nanocompositi [20], e questo campo di ricerca è tuttora in rapida espansione. Possono inoltre fungere da "templanti" per la formazione di strutture supramolecolari [20] ed essere impiegati in processi chimici per ottenere un migliore controllo della stereochimica, della velocità di reazione e della distribuzione dei prodotti [32].

2.3.3.2. *Metodi di sintesi*

Diverse tecniche sono state impiegate con successo nella preparazione di composti di tipo idrotalcite. I più usati sono basati sulla *coprecipitazione*, ma vasto impiego trovano anche quelli basati sul processo di *scambio ionico* e sulla

ricostruzione della struttura, quest'ultima collegata al cosiddetto "effetto memoria". Possono inoltre essere usati altri metodi meno convenzionali.

Ad ogni modo, la scelta del metodo dipende dall'applicazione a cui l'idrotalcite è destinata. Se è richiesta la determinazione di parametri strutturali accurati, occorre sintetizzare fasi pure altamente cristalline. Al contrario, se l'impiego finale è come catalizzatore o precursore di un catalizzatore, è meglio evitare un elevato grado di cristallinità, associato ad una bassa area superficiale e all'assenza di difetti strutturali o composizionali [17,32].

– Coprecipitazione

Nel metodo della coprecipitazione, sono impiegate come precursori soluzioni acquose dei cationi metallici $M_1(II)$ e $M_2(III)$, contenenti l'anione da intercalare nella HT. Per reazione fra gli aquocomplessi dei metalli bivalenti e trivalenti, avviene la formazione di strati di tipo brucitico aventi una distribuzione uniforme sia dei cationi metallici, sia degli anioni interlamellari [15]. Per assicurare la precipitazione simultanea di due o più cationi, è necessario condurre la sintesi in condizioni di sovrasaturazione. Questa condizione è generalmente raggiunta mediante un accurato controllo del pH della soluzione, dato che la formazione di HT sottrae ioni OH^- alla soluzione. Il valore di pH deve essere mantenuto ad un valore inferiore a quello di precipitazione dell'idrossido meno solubile, ma non deve essere troppo basso, poiché un ambiente eccessivamente acido determina la formazione di un prodotto amorfo. Solitamente si utilizza un valore di pH compreso tra 8 e 10. Alla fase di sintesi si può far seguire un trattamento termico mirato, che conduce ad un aumento della cristallinità di materiali amorfi o poco cristallini.

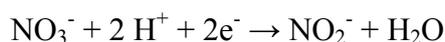
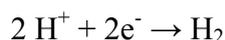
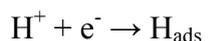
La coprecipitazione è il metodo più utilizzato, perché consente la produzione di grandi quantità di HT (facilità di scale-up) e una grande flessibilità nell'impostazione dei parametri sperimentali. In questo modo si ottengono facilmente HT con una composizione ben definita e si può intercalare una grande varietà di anioni [33].

Un metodo di deposizione su superfici elettrodeiche che sfrutta il principio della coprecipitazione è l'*elettrosintesi*: il meccanismo responsabile dell'elettrodeposizione dell'idrotalcite [34] prevede la sua precipitazione per

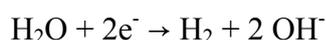
aumento locale di pH in prossimità della superficie elettrodica, causato dalla riduzione elettrochimica dell'anione nitrato.

In funzione del potenziale di deposizione, del tipo di anione presente nella soluzione elettrolitica, del pH della soluzione, si verificano al catodo molte reazioni, quali:

- reazioni di consumo di ioni H^+ :



- elettrolisi di H_2O :



- riduzione dei nitrati:



L'aumento di pH è causato dal consumo di ioni H^+ e dalla produzione di ioni OH^- .

Le reazioni di riduzione dei nitrati sono caratterizzate da valori di potenziale di riduzione inferiori a quelle caratteristici della maggior parte delle reazioni di riduzione di ioni metallici (eccetto Cu^{2+} , Ag^+ , Bi^{3+}), pertanto la deposizione del metallo ($M^{n+} + n e^- \rightarrow M^0 \downarrow$) non si verifica. Lo ione metallico si deposita, invece,

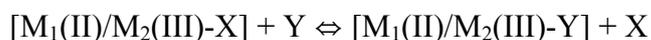
come idrossido, secondo la reazione: $M^{n+} + n OH^- \rightarrow M(OH)_n \downarrow$.

Complessivamente, la coprecipitazione di idrossidi di ioni trivalenti e bivalenti di metalli conduce alla formazione dell'idrotalcite.

– Scambio ionico

La sintesi per scambio ionico è di solito utilizzata quando non sono applicabili metodi diretti, ad esempio quando il catione metallico divalente o trivalente o gli anioni coinvolti sono instabili in soluzione alcalina, o quando la reazione diretta tra gli ioni metallici e gli anioni è più favorita. L'HT desiderata è ottenuta per

mescolamento della HT preformata, scelta come precursore, con una soluzione contenente l'anione da intercalare, presente in eccesso per favorire lo scambio. La capacità delle argille anioniche di scambiare un anione intercalato, X, con un secondo anione, Y, può essere così rappresentata:



Questo equilibrio, dove per semplicità non compaiono esplicitamente le cariche, è tanto più spostato verso destra quanto maggiore è l'affinità dell'anione Y per gli strati brucitici. I fattori principali che influiscono sull'andamento della reazione sono la natura degli anioni uscente ed entrante, il solvente, il pH della soluzione, a cui l'HT deve essere stabile.

– Ricostruzione della struttura

Questo metodo si basa sull' "effetto memoria", ovvero sulla capacità degli ossidi misti, ottenuti per calcinazione dell'HT precursore a temperature di 500-600° C, di ricostituire la struttura originaria a strati, per contatto con soluzioni acquose contenenti anioni [35-38]. La reazione viene condotta mescolando una soluzione degli ossidi misti con una soluzione del sale dell'anione, in assenza di CO₂. L'acqua viene assorbita per riformare gli strati idrossidici, e molecole d'acqua e anioni sono incorporati negli interstrati. Tale metodo è particolarmente utilizzato nella sintesi di HT intercalate con anioni inorganici diversi da quelli originariamente contenuti nella HT di partenza. Il parametro fondamentale è la temperatura di calcinazione dell'idrotalcite iniziale, che deve essere tale da assicurare la completa decomposizione della stessa ad ossidi misti, ma non permettere la formazione di altre fasi.

2.3.3.3. Proprietà e applicazioni

I composti di tipo idrotalcite rappresentano uno dei materiali più promettenti dal punto di vista tecnologico, grazie al loro basso costo, alla facilità di preparazione, al gran numero di variabili impiegabili nella sintesi per raggiungere composizioni diverse.

Diverse sono le applicazioni a cui vengono destinate le HT, sfruttando le loro molteplici proprietà:

– *Catalisi*

Le HT sono state variamente impiegate come supporti, precursori di catalizzatori o catalizzatori veri e propri in campi di alta rilevanza industriale e scientifica, quali la chimica organica [39-41], la catalisi ambientale [42,43] e la conversione del gas naturale [44,45].

– *Scambio ionico e adsorbimento*

Le HT possono rimuovere specie cariche negativamente mediante processi di adsorbimento superficiale o scambio ionico [46-48]. La grande affinità per gli anioni è causata dall'alta area superficiale, dalla elevata capacità di scambio ionico e dalla distanza interstrato variabile, che consente l'intrappolamento di specie, sia organiche sia inorganiche, molto diverse fra loro, quali contaminanti del suolo, sedimenti e acqua.

– *Campo farmaceutico*

Oltre ai classici impieghi come antiacidi, le HT sono state proposte come eccipienti in formulazioni farmaceutiche [49].

– *Fotochimica*

L'interstrato delle HT fornisce un ambiente idoneo per il decorso di reazioni fotochimiche di molecole intercalate [50,51].

– *Elettrochimica*

Le applicazioni più promettenti comprendono la preparazione di elettrodi modificati [52] e la fabbricazione di batterie [53].

– *Polimeri*

Una applicazione in via di sviluppo delle HT è come additivi nelle formulazioni di materiali polimerici funzionali, per migliorarne le prestazioni [54].

BIBLIOGRAFIA

- [1] S. Therias, C. Mousty, *Appl. Clay Sci.* 1995, 10, 147.
- [2] C. Mousty, *Appl. Clay Sci.* 2004, 27, 159.
- [3] D. Shan, S. Cosnier, C. Mousty, *Anal. Chem.* 2003, 75, 3872.
- [4] A. J. Bard, T. Mallouk, *Tecn. Chem.* 1992, 271, 312.
- [5] A. Vaccari, *Catal. Today* 1998, 41, 53.
- [6] W. T. Reichle, *Solid State Ionics* 1986, 221, 35.
- [7] E. Manasse, *Atti Soc. Toscana Sc. Nat., Proc. Verb.* 1915, 24, 92.
- [8] W. Feitknecht, *Helv. Chim. Acta* 1942, 25, 131.
- [9] W. Feitknecht, *Helv. Chim. Acta* 1942, 25, 555.
- [10] R. Allmann, *Acta Crystallogr.* 1968, B24, 972.
- [11] H.F.W. Taylor, *Miner. Mag.* 1969, 37, 338.
- [12] H.F.W. Taylor, *Miner. Mag.* 1973, 39, 377.
- [13] M. Catti, G. Ferraris, S. Hull, A. Pavese, *Phys. Chem. Miner.* 1995, 22, 200.
- [14] F. Cavani, F. Trifirò, A. Vaccari, *Catal. Today* 1991, 11, 173.
- [15] V. Rives (ed.), *Layered Double Hydroxides: Present and Future*. Nova Science Publishers, New York, 2001.
- [16] A.I. Khan, D. O'Hare, *J. Mater. Chem.* 2002, 12, 3191.
- [17] F. Trifirò, A. Vaccari, *Hydrotalcite-like anionic Clays (Layered Double Hydroxides)* in: J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vgtle (Eds), "Comprehensive Supramolecular Chemistry", Vol. 7, Pergamon, Oxford, 1996.
- [18] A.I. Khan, D. O'Hare, *J. Mater. Chem.* 2002, 12, 3191.
- [19] G. Alberti, U. Costantino in: G. Alberti, T. Bein (eds.), *Solid State Supramolecular Chemistry: Two- and Three-Dimensional Inorganic Networks*. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, vol. 7, cap. 1, Pergamon and Elsevier Science, Oxford, UK, 1996.
- [20] S.P. Newman, W. Jones in: W. Jones, C.N.R. Rao (eds.), *Supramolecular Organization and Materials Design*. Cambridge University Press, Cambridge, 2001.
- [21] A.S. Prakash, P.V. Kamath, M.S. Hegde, *Mater. Res. Bull.* 2000, 35, 2189.
- [22] A. H. Iglesias, O.P. Ferreira, D.X. Gouveia, A. G. Souza Filho, J.A.C. de Paiva, J.M. Filho, O.L. Alves, *J. Solid State Chem.* 2005, 178, 142.

- [23] Gardner E.A., Yun S.K., Kwon T., Pinnavaia T.J., *Appl. Clay Sci.* 1998, 13, 479.
- [24] J.J. Bravo-Suárez, E.A. Páez-Mozo, S.T. Oyama, *Chem. Mater.* 2004, 16, 1214.
- [25] M. Bellotto, B. Rebours, O. Clause, J. Lynch, D. Bazin, E. Elkaïm, *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 8527.
- [26] B. Sels, D. de Vos, M. Buntinx, F. Pierard, A. Kirsch-De Mesmaeker, P. Jacobs, *Nature* 1999, 400, 855.
- [27] A. Vaccari, *Appl. Clay Sci.* 1999, 14, 161.
- [28] I. Rousselot, C. Taviot-Guého, J.P. Besse, *Int. J. Inorg. Mater.* 1999, 1, 165.
- [29] M. Ogawa, K. Kuroda, *Chem. Rev.* 1995, 95, 399.
- [30] S. P. Newman, W. Jones, *New J. Chem.* 1998, 105.
- [31] H. Tagaya, S. Sato, T. Kuwahara, J. Kadokawa, K. Masa, K. Chiba, *J. Mater. Chem.* 2002, 4, 1907.
- [32] X. Duan, D.G. Evans (eds.), *Layered Double Hydroxides – Structure and bonding*, vol. 119, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006.
- [33] E.L. Crepaldi, P.C. Pavan, J.B. Valim, *J. Braz. Chem. Soc.* 2000, 11, 64.
- [34] E. Scavetta, B. Ballarin, M. Giorgetti, I. Carpani, F. Cogo, D. Tonelli, *J. New Mat. Electrochem. Syst.* 2004, 7, 43.
- [35] K.L. Erickson, T.E. Bostrom, R.L. Frost *Mater. Lett.* 2005, 59, 226.
- [36] T.S. Stanimirova, G. Kirov, *J. Mater. Sci. Lett.* 2001, 20, 453.
- [37] A.J. Marchi, C.R. Apesteguía, *Appl. Clay Sci.* 1998, 13, 35.
- [38] J. Rocha, M. del Arco, V. Rives, M.A. Ulibarri, *J. Mater. Chem.* 1999, 9, 2499.
- [39] I. Kirm, F. Medina, X. Rodriguez, Y. Cesteros, P. Salagre, J. Sueiras, *Appl. Catal.* 2004, 272, 175.
- [40] U. Costantino, M. Curini, F. Montanari, M. Nocchetti, O. Rosati, *J. Mol. Catal. A: Chem* 2003, 195, 245.
- [41] V. Rives, O. Prieto, A. Dubey, S. Kannan, *J. Catal.* 2003, 220, 161.
- [42] J.S. Yoo, A.A. Bhattacharyya, C.A. Rodlowski, J.A. Karch, *Ind. Eng. Chem. Res.* 1991, 30, 1444.
- [43] A. Corma, A.E. Palomares, F. Rey, *Appl. Catal. B* 1994, 4, 29.
- [44] F. Basile, G. Fornasari, E. Poluzzi, A. Vaccari, *Appl. Clay Sci.* 1998, 13, 329.
- [45] M.M. Gunter, T. Ressler, R.E. Jentoft, B. Bems, *J. Catal.* 2001, 203, 133.
- [46] R.L. Goswamee, P. Sengupta, K.G. Bhattacharyya, D.K. Dutta, *Appl. Clay Sci.* 1998, 13, 21.

- [47] B. Dousova, V. Machovi, D. Kolousek, F. Kovanda, V. Dornicak, *Water Air Soil Pollut.* 2003, 149, 251.
- [48] T. Toraishi, S. Nagasaki, S. Tanaka, *Appl Clay Sci.* 2002, 22, 17.
- [49] V. Ambrogi, G. Fardella, G. Grandolini, L. Perioli, *Int. J. Pharm.* 2001, 220, 23.
- [50] M. Ogawa, K. Kuroda, *Chem. Rev.* 1995, 95, 399.
- [51] T. Shichi, K. Takagi, Y. Sawaki, *Chem. Comm.* 1996, 17, 2027.
- [52] C. Mousty, S. Therias, C. Forano, J.P. Besse, *J. Electroanal. Chem.* 1994, 63, 374.
- [53] R.S. Jayashree, P.V. Kamath, *J. Power Sources* 2002, 107, 120.
- [54] X.D. Wang, Q. Zhang, *Polym. Int.* 2004, 53, 698.

2.4. BIOSENSORI

Un biosensore [1] è un dispositivo analitico che incorpora un elemento di riconoscimento biologico (o di derivazione biologica) integrato o intimamente associato ad un trasduttore di un segnale chimico-fisico (Figura 2.5). A seconda del tipo di trasduzione del segnale è possibile differenziare i biosensori in ottici, bioluminescenti, elettrochimici, calorimetrici e piezoelettrici.

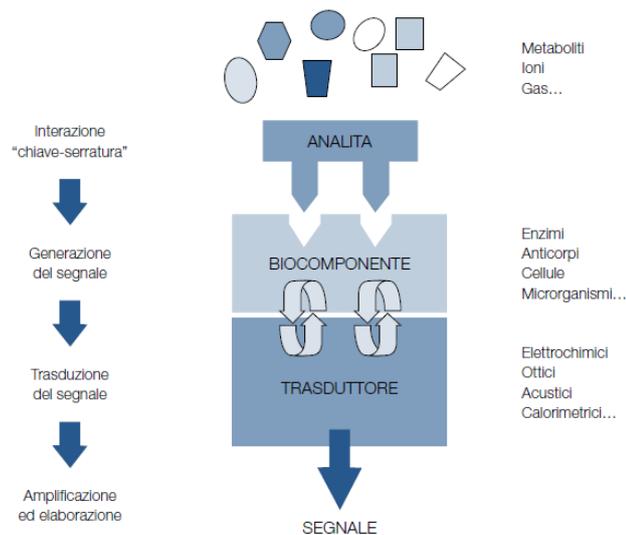


Figura 2.5 – Schema del funzionamento di un biosensore [2].

I biosensori elettrochimici combinano il potere analitico delle tecniche elettrochimiche con la specificità dei processi di riconoscimento biologico. In questi dispositivi un reagente biospecifico viene immobilizzato o trattenuto sulla superficie di un elettrodo, il quale converte l'evento di riconoscimento biologico in un segnale quantitativo elettrico, proporzionale alla concentrazione di un singolo analita o gruppo di analiti. Sono i più adatti ad essere miniaturizzati, possono operare anche in mezzi torbidi (a differenza di quelli ottici), hanno brevi tempi di risposta (rispetto ai bioluminescenti), presentano un limite di rivelabilità solitamente inferiore e costi inferiori in confronto agli altri tipi di biosensori. Per questo motivo, risultano i più utilizzati nel controllo di bioprocessi industriali e ambientali, nella diagnostica clinica e in campo forense. Una seconda classificazione dei biosensori elettrochimici distingue, a seconda della natura del processo di riconoscimento biologico, tra

dispositivi biocatalitici (basati su enzimi, cellule o tessuti) e sensori di affinità (basati su anticorpi, recettori di membrana o acidi nucleici). I biosensori elettrochimici possono essere ulteriormente classificati, in dipendenza dal segnale misurato, in conduttimetrici, potenziometrici ed amperometrici. Questi ultimi sono i più economici, rapidi e presentano la più alta sensibilità [3].

2.4.1. ENZIMI

Un enzima è una proteina (sequenza di amminoacidi organizzati in una struttura terziaria e quaternaria definita) in grado di accelerare una specifica reazione chimica senza intervenire sui processi energetici che ne regolano la spontaneità. Chimicamente si parla di “catalizzatore biologico”.

L'enzima partecipa attivamente alla reazione: il substrato (la molecola su cui agisce l'enzima) si lega al sito attivo (la zona dell'enzima in cui avvengono le reazioni), formando un complesso attivato. Avvenuta la reazione, il prodotto viene allontanato dall'enzima, che rimane disponibile per reagire nuovamente (Figura 2.6). Una singola molecola enzimatica è in grado di catalizzare in un secondo le reazioni di decine di migliaia di molecole identiche, rendendo gli enzimi efficaci anche in quantità minime.

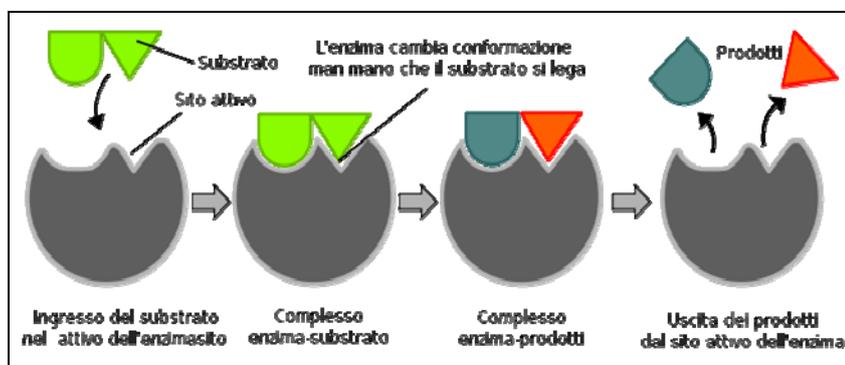


Figura 2.6 – Rappresentazione schematica dei meccanismi coinvolti nella catalisi enzimatica.

A differenza dei catalizzatori inorganici, gli enzimi presentano una elevatissima stereospecificità, regioselettività e chemoselettività, catalizzando solo una reazione o pochissime reazioni simili. Tale specificità è legata a diversi fattori che caratterizzano l'associazione tra il substrato ed il sito attivo, come la complementarità dal punto di vista strutturale, le cariche elettriche, la natura idrofilica o idrofobica.

Molti enzimi contengono molecole non proteiche che partecipano alla funzione catalitica. Queste molecole, che si legano spesso all'enzima nelle vicinanze del sito attivo, vengono chiamate cofattori e sono divise in due categorie in base al loro legame con l'enzima: gruppi prostetici e coenzimi. I gruppi prostetici sono strettamente legati agli enzimi, generalmente in modo permanente. I coenzimi, invece, sono legati agli enzimi piuttosto debolmente, permettendo così ad una singola molecola di coenzima di associarsi con enzimi diversi e di fungere, talvolta, da ponte da un enzima a un altro per piccole molecole.

Gli enzimi vengono classificati in base alla reazione che catalizzano:

1. *Ossidoriduttasi*: ossido-riduzioni;
2. *Trasferasi*: trasferimento di un gruppo;
3. *Idrolasi*: idrolisi;
4. *Liasi*: addizioni ai doppi legami;
5. *Isomerasi*: riarrangiamenti strutturali;
6. *Ligasi*: formazione di legami con acquisto di energia per rottura di un legame fosfato dell'ATP.

Ogni classe di appartenenza è poi suddivisa in sottoclassi in base al substrato che prende parte alla reazione e al prodotto formato.

Tra i biocomponenti più studiati figurano gli enzimi ossidoriduttasi, e, in particolare, la glucosio ossidasi (GOx) e la lattato ossidasi (LOx). La GOx è una glicoproteina costituita da 2 sub-unità identiche di circa 80.000 Dalton (583 residui amminoacidici) ciascuna. Ogni subunità contiene un gruppo prostetico FAD (flavin-adenina dinucleotide) [4]. La GOx, in presenza di ossigeno, catalizza la reazione di ossidazione del β -D-glucosio a D-glucono-1,5-lattone, che successivamente idrolizza spontaneamente ad acido gluconico (Figura 2.7).

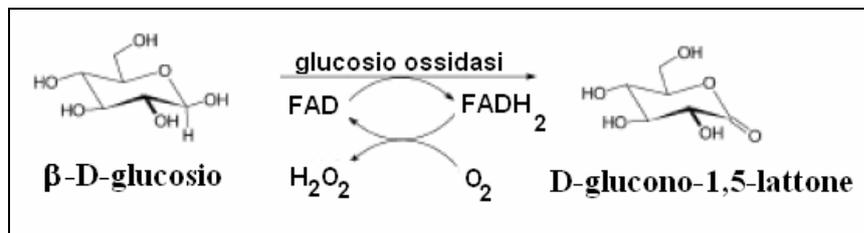


Figura 2.7 – Schema della reazione di ossidazione del β -D-glucosio a D-glucono-1,5-lattone, catalizzata dall'enzima glucosio ossidasi.

La LOx è una flavoproteina in grado di catalizzare l'ossidazione di L-lattato a piruvato, in presenza di O₂ [5].

2.4.2. BIOSENSORI BASATI SU ENZIMI

I biosensori enzimatici, i quali si basano sull'accoppiamento di un sistema enzimatico con un elettrodo appropriato, combinano la specificità dell'enzima per il suo substrato con la potenza dei dispositivi elettrochimici. Queste caratteristiche li rendono utili per applicazioni sensoristiche al fine di monitorare un'ampia gamma di substrati negli ambiti clinico, ambientale ed alimentare.

La sfida più difficile nella realizzazione di biosensori enzimatici amperometrici è quella di stabilire una comunicazione elettrica soddisfacente tra il sito attivo dell'enzima e la superficie dell'elettrodo. A seconda del meccanismo di trasferimento elettronico coinvolto (Figura 2.8), è possibile distinguere fra biosensori di prima, seconda e terza generazione [6]. Di seguito se ne riporta una breve descrizione, prendendo come esempio i biosensori a base di ossidasi.

- ***Biosensori di prima generazione***

L'enzima ossida il substrato in presenza di ossigeno. Il sito attivo, che si trova a questo punto in forma ridotta, viene riossidato dall'ossigeno, il quale funge da accettare ultimo di elettroni, riducendosi a perossido di idrogeno. Il perossido di idrogeno viene, poi, rivelato direttamente all'elettrodo e fornisce il responso analitico.

In presenza, nel sistema, di un mediatore redox (in soluzione, oppure immobilizzato sulla superficie elettrodica) e di ossigeno, il mediatore reagisce chimicamente con il perossido di idrogeno (co-prodotto della catalisi enzimatica) e poi si rigenera all'elettrodo, fornendo una risposta direttamente proporzionale alla concentrazione di substrato da determinare. In questo secondo caso si parla di "***prima generazione mediata***".

- **Biosensori di seconda generazione**

Questi biosensori lavorano con un mediatore redox e in assenza di ossigeno. La riossidazione del sito attivo è compiuta dal mediatore, il quale è infine coinvolto nel trasferimento elettronico con la superficie dell'elettrodo.

- **Biosensori di terza generazione**

Nei biosensori di terza generazione il sito attivo dell'enzima viene direttamente ossidato o ridotto mediante un trasferimento elettronico diretto (DET) fra il sito attivo stesso e l'elettrodo, secondo uno schema definito "a spira molecolare". Questo meccanismo può attuarsi anche in assenza di ossigeno, permette una efficiente trasduzione dell'evento di bioriconoscimento ed elimina la necessità di avere co-substrati o mediatori, aprendo le porte alla progettazione di dispositivi con prestazioni più performanti. Nonostante diversi lavori in letteratura riportino il trasferimento elettronico diretto fra il sito attivo enzimatico e l'elettrodo, solo per alcuni sistemi sono stati forniti risultati sufficientemente probanti di DET.

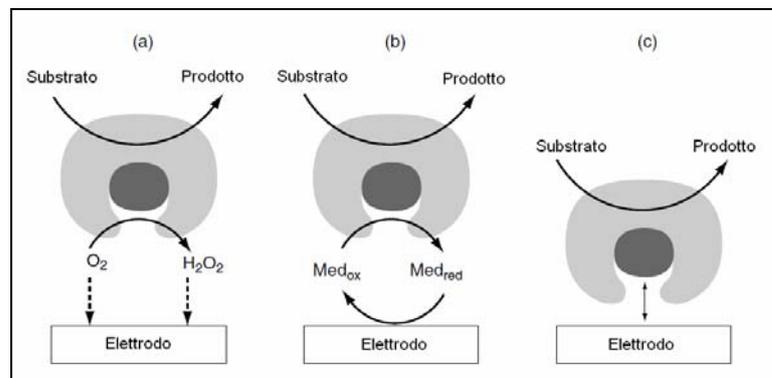


Figura 2.8 – Rappresentazione schematica dei meccanismi alla base dei biosensori amperometrici classificati di I (a), II (b) e III (c) generazione [7].

2.4.3. METODI DI IMMOBILIZZAZIONE ENZIMATICA

Le prestazioni di un biosensore enzimatico, quali la sua sensibilità e stabilità, dipendono in gran parte dalla fase di immobilizzazione dell'enzima [8]. I sistemi di immobilizzazione enzimatica hanno l'obiettivo di trattenere la biomolecola sulla superficie elettrodica, rendendone trascurabile il rilascio in soluzione, garantire l'accessibilità del substrato al sito attivo, senza causare, allo stesso tempo, drastici cambiamenti conformazionali delle strutture terziaria e quaternaria dell'enzima.

Esiste una grande varietà di metodi utilizzabili per l'immobilizzazione enzimatica, riportati schematicamente in Figura 2.9. Si possono generalmente suddividere in due categorie: sistemi di immobilizzazione fisica e chimica.

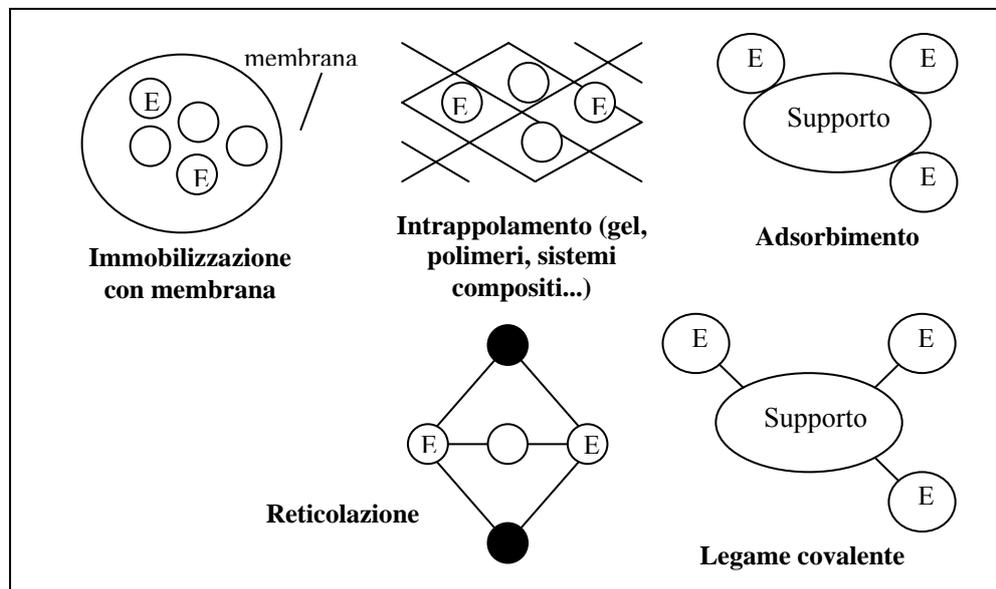


Figura 2.9 – Rappresentazione schematica di strategie di immobilizzazione enzimatica.

2.4.3.1. Strategie di immobilizzazione fisica

L'immobilizzazione fisica è operativamente più semplice da eseguire, preserva con maggiore efficienza le caratteristiche dell'enzima, ma lo protegge meno dagli agenti denaturanti, quali, ad esempio, pH aggressivo ed elevata temperatura.

Uno degli approcci più semplici consiste nell'impiego di membrane come acetato di cellulosa [9], collagene e policarbonato, che impediscono efficacemente il rilascio dell'enzima e presentano il vantaggio addizionale di estendere il range di risposta lineare del biosensore.

In alternativa, si possono utilizzare film polimerici. Polimeri quali polipirrolo, polianilina e politiofene consentono l'intrappolamento dell'enzima in modo altamente controllabile e riproducibile, se direttamente elettropolimerizzati sulla superficie elettrodica per ossidazione del monomero, contribuendo anche a ridurre il "fouling" (avvelenamento) della superficie dell'elettrodo. La via dell'elettropolimerizzazione può essere attuata intrappolando l'enzima all'interno di un film in crescita [10]. Altri polimeri possono essere depositati tal quali per "casting": in seguito all'evaporazione del solvente, ad esempio, nel Resydrol si stabiliscono interazioni di reticolazione

(“self-curing”) che gli conferiscono le proprietà finali di una membrana [11]. Un polimero ampiamente impiegato nello sviluppo di biosensori è il Nafion [12], ottenuto per copolimerizzazione di tetrafluoroetilene e perfluoro-2-(fluorosolfoniletossi)propil vinil etere. La sua struttura è riportata in Figura 2.10:

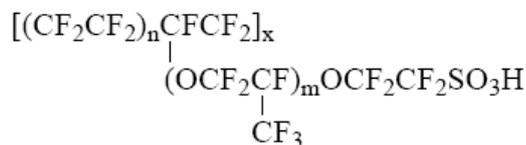


Figura 2.10 – Struttura del Nafion.

Il modello spaziale proposto per questo polimero, chiamato “cluster channel” o “cluster network” (Figura 2.11), consiste in una distribuzione di cluster ionici solfonati con un diametro di circa 4 nm. Canali del diametro di circa 1 nm collegano i cluster e consentono il movimento di cationi, ma non quello di anioni, i quali vengono allontanati per repulsione elettrostatica da parte dei gruppi solfonati, carichi negativamente. In seguito ad idratazione, il diametro dei cluster aumenta (“swelling”).

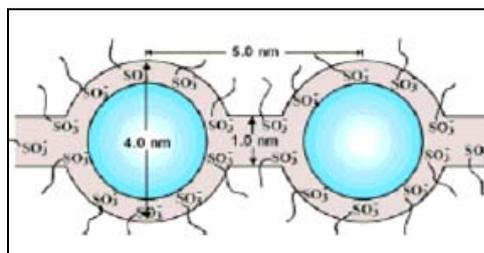


Figura 2.11 – Disegno schematico della morfologia del Nafion idratato.

Speciale menzione meritano le cosiddette “electrodeposition paints”, polimeri che vengono depositati da sospensioni acquose mediante variazioni di pH elettrochimicamente indotte. Di recente sviluppo, sono in grado di immobilizzare enzimi con alta riproducibilità e garantire elevata attività enzimatica e straordinaria stabilità, utilizzando un protocollo di deposizione estendibile ad altri enzimi, ad architetture multi-strato e a strutture miniaturizzate [13].

L’enzima può essere immobilizzato sulla superficie dell’elettrodo anche mediante chemiadsorbimento (interazione non-specifica), fisiadsorbimento o interazione elettrostatica. L’enzima è legato al supporto tramite interazioni dipolo-dipolo e ponti a idrogeno, che rendono l’ancoraggio debole e la probabilità di rilascio in soluzione dell’enzima alta.

Altre tecniche di immobilizzazione fisica si basano sulla realizzazione di sistemi compositi, ed includono l'intrappolamento all'interno di film sol-gel a bassa temperatura e l'incorporazione in sistemi pasta di carbone. Attraenti per molte applicazioni di routine, queste tecniche uniscono versatilità, velocità, facilità di fabbricazione e rinnovabilità della superficie attiva [14].

2.4.3.2. Strategie di immobilizzazione chimica

L'impiego di metodi di immobilizzazione chimica consente la fabbricazione di biosensori con un tempo di vita più lungo e una maggiore stabilità nei confronti di condizioni sperimentali aggressive e agenti denaturanti.

In un tipo di configurazione, l'enzima è immobilizzato sulla superficie elettrodica mediante reticolazione attraverso coupling covalente con reagenti bifunzionali e macromolecole naturali o sintetiche [15]. Un esempio è fornito dal classico sistema albumina di siero bovino + glutaraldeide (BSA+GA). La GA è responsabile della reticolazione tra l'enzima e la BSA: la sua struttura presenta due gruppi aldeidici terminali, di cui uno reagisce con il gruppo amminico della BSA, l'altro con il gruppo amminico dell'enzima, formando, in questo modo, un ponte tra la BSA e l'enzima (Figura 2.12).

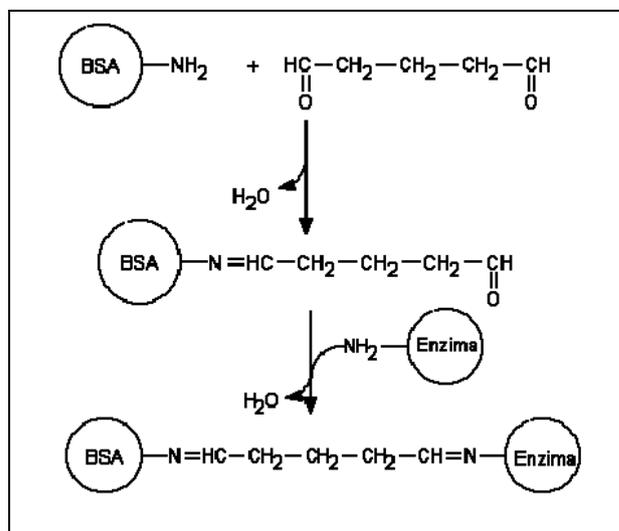


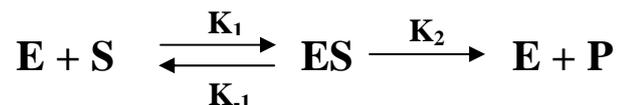
Figura 2.12 – Reazioni di reticolazione associate al sistema di immobilizzazione chimica BSA+GA.

In un secondo tipo di configurazione, l'enzima e il supporto si legano mediante un legame covalente, direttamente o tramite una molecola spaziatrice. Una

importante interazione covalente specifica è quella biotina-avidina, sfruttabile per immobilizzare enzimi biotinilati su superfici ricoperte di streptavidina [16].

2.4.4. CINETICA ENZIMATICA

Focalizzando l'attenzione sulla cinetica enzimatica, il meccanismo più semplice è stato discusso da Michaelis e Menten nel 1913 [17], secondo il seguente schema di reazione:



dove E è il sito attivo enzimatico, S il substrato, ES il complesso enzima-substrato, P il prodotto della reazione catalizzata dall'enzima, K_i ($i = 1, 2, -1$) sono costanti cinetiche.

Partendo da un modello basato su alcune assunzioni iniziali e sulla definizione di equazioni cinetiche, successivamente elaborabili mediante semplici passaggi matematici, si è giunti alla definizione della seguente equazione, detta di Michaelis - Menten (non valida, però, per tutte le cinetiche enzimatiche):

$$v_0 = \frac{v_{MAX} \cdot [S]}{[S] + k_M}$$

dove v_0 è la "velocità iniziale" (velocità di reazione valutata per un periodo di tempo durante il quale la reazione inversa è fisicamente trascurabile), $[S]$ è la concentrazione di substrato, v_{MAX} è la velocità massima di reazione (quando $[S] \gg k_M$). k_M , la costante di Michaelis-Menten, rappresenta la concentrazione di substrato quando v_0 è la metà di v_{MAX} . È una grandezza tipica di ogni enzima e indica l'affinità dell'enzima verso il substrato: minore è il valore della costante, maggiore è l'affinità dell'enzima per il substrato.

La velocità di reazione in funzione della concentrazione di substrato ha un andamento ad iperbole (Figura 2.13). La velocità iniziale aumenta con la concentrazione di substrato, finché non viene raggiunto un valore di $[S]$ oltre il quale non si ha più aumento della velocità, la quale tende asintoticamente a v_{MAX} . Questo punto, in cui si verifica la perdita di linearità della curva, rappresenta il raggiungimento della condizione di saturazione dell'enzima.

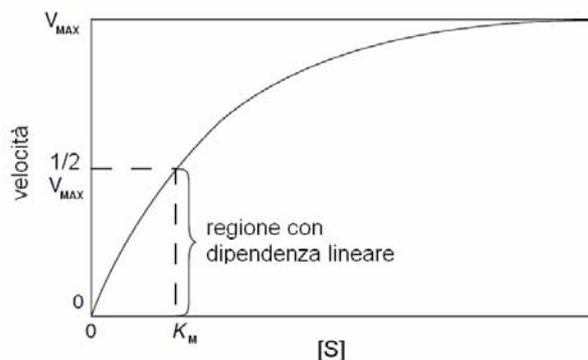


Figura 2.13 – Grafico della velocità di reazione in funzione della concentrazione di substrato secondo l'equazione di Michaelis-Menten.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, *Biosens. Bioelectron.* 2001, 16, 121.
- [2] D. Centonze, M. Quinto, D. Carelli, S. Di Paolo, E. Montemurno, L. Gesualdo, *G. It. Diabetol. Metab.* 2006, 26, 160.
- [3] S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, *Anal. Chim. Acta* 2002, 33, 459.
- [4] J.H. Pazur, *Methods Enzymol.* 1966, 9, 82.
- [5] Y. Umena, K. Yorita, T. Matsuoka, A. Kita, K. Fukui, Y. Morimoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, 350, 249.
- [6] K. Habermüller, M. Mosbach, W. Schuhmann, *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 366, 560.
- [7] J. Wang, *Chem. Rev.* 2008, 108, 814.
- [8] J. Wang, *Analytical electrochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006.
- [9] M. Portaccio, D. Durante, A. Viggiano, S. Di Martino, P. De Luca, D. Di Tuoro, U. Bencivenga, S. Rossi, P. Canciglia, B. De Luca, D.G. Mita, *Electroanalysis* 2007, 19, 1787.
- [10] P.N. Bartlett, J.M. Cooper, *J. Electroanal. Chem.* 1993, 362, 1.
- [11] M. Maciejewska, D. Schäfer, W. Schuhmann, *Electrochem. Commun.* 2006, 8, 1119.
- [12] Q. Chi, S. Dong, *Anal. Chim. Acta* 1995, 310, 429.
- [13] C. Kurzawa, A. Hengstenberg, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* 2002, 74, 355.

- [14] R. Garjonytė, A. Malinauskas, *Sens. Actuators B* 1998, 46, 236.
- [15] M.E. Ghica, C.M.A. Brett, *Anal. Chim. Acta* 2005, 532, 145.
- [16] N. Dontha, W.B. Nowall, W.G. Kuhr, *Anal. Chem.* 1997, 69, 2619.
- [17] L. Michaelis, M. Menten, *Biochem. Z.* 1913, 49, 333.

2.5. MICROSCOPIA A SCANSIONE ELETTROCHIMICA (SECM)

2.5.1. TECNICA E STATO DELL'ARTE

La microscopia a scansione elettrochimica (SECM) è una tecnica potente e versatile, sviluppatasi all'inizio degli anni novanta, che combina i principi base delle tecniche a scansione di sonda (quali la microscopia ad effetto tunnel, STM, e la microscopia a forza atomica, AFM) con quelli dell'elettrochimica. L'impiego di elettrodi di dimensioni microscopiche ("tip") consente di studiare la topografia e le proprietà peculiari di reattività di sistemi, su scala micrometrica e submicrometrica, con alta sensibilità e risoluzione spaziale. La tip viene fatta avvicinare alla superficie di interesse ("substrato"), fino a posizionarsi a piccola distanza (dell'ordine di alcuni μm) da essa, mediante un dispositivo di posizionamento ad alta risoluzione, ed è impiegata per scansionare un'area del campione: il segnale raccolto dalla sonda, generato dal decorso di processi elettrochimici in soluzione, è rappresentato graficamente in funzione della sua posizione e fornisce una "mappa" della porzione di campione esaminata. Le caratteristiche della tip e il modo in cui essa interagisce con il substrato determinano il tipo di informazione ottenibile in un esperimento SECM [1-3].

La versatilità della tecnica consente lo studio di una ampia gamma di processi. La letteratura al riguardo è vastissima e riporta, in generale, lo studio di cinetiche e meccanismi di reazione [4,5], l'analisi di fenomeni superficiali quali corrosione e passivazione [6], il controllo del trasferimento di molecole e ioni attraverso membrane o coatings [7,8], lo screening dell'attività catalitica/elettrocatalitica di campioni [9,10], l'indagine su sistemi biologici, quali cellule, enzimi, proteine, DNA [11-14], il "patterning" di superfici [15,16], il trasferimento di ioni o molecole attraverso interfacce tra liquidi immiscibili [17].

Campi di ricerca paralleli sono, inoltre, orientati alla fabbricazione di tip con geometrie particolari, adatte a specifici esperimenti, allo sviluppo di modelli teorici robusti e rigorosi che consentano l'applicazione a misurazioni quantitative, al perfezionamento di tecnologie di posizionamento della tip sempre più sofisticate [18].

2.5.2. STRUMENTAZIONE

L'apparato strumentale SECM (Figura 2.14) consiste di quattro componenti di base: un sistema di posizionamento della tip, una cella elettrochimica a quattro elettrodi, un bipotenziostato, un sistema di acquisizione/elaborazione dati (PC interfacciato al bipotenziostato).

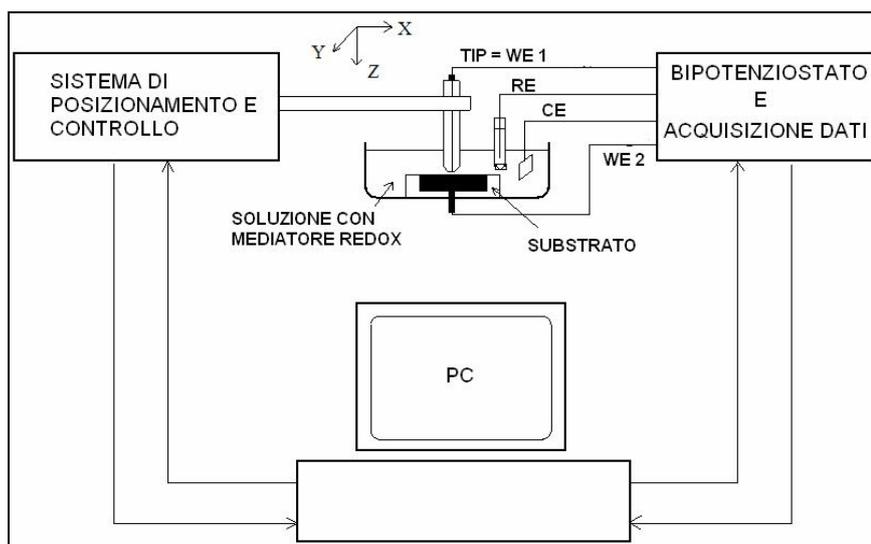


Figura 2.14 – Schema a blocchi dell'apparato strumentale SECM.

La strumentazione SECM è spesso posizionata su un tavolo anti-vibrazioni e inserita in una gabbia di Faraday (Figura 2.15), per isolare il sistema dalle vibrazioni dell'ambiente e dal rumore elettromagnetico quando si conducono misurazioni con risoluzione spaziale dell'ordine del nm e con correnti dell'ordine dei pA.

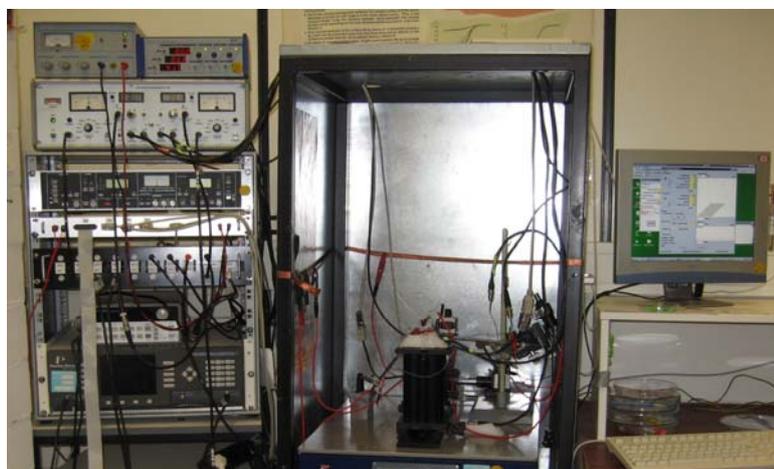


Figura 2.15 – Apparato strumentale SECM, inserito in una gabbia di Faraday.

Per ottenere un posizionamento preciso della tip sui 3 assi x-y-z, si impiegano motori passo-passo (“motori stepper”), che consentono spostamenti di alcuni mm con risoluzione spaziale dell’ordine dei 100 nm, e motori a base di cristalli piezoelettrici, che coprono distanze più limitate (100 μm , tipicamente), con risoluzioni dell’ordine del nm.

La cella elettrochimica contiene, immersi in una soluzione elettrolitica, la tip, che funge da elettrodo di lavoro, il substrato (campione), il quale può essere a sua volta polarizzato, diventando così un secondo elettrodo di lavoro, l’elettrodo di riferimento e il controlettrodo.

Come tip si possono impiegare microelettrodi, ossia elettrodi in cui una dimensione (“dimensione critica”) è dell’ordine di alcune decine di μm , oppure nanoelettrodi, in cui le dimensioni assumono valori pari a poche decine di nm. La loro versatilità di impiego deriva dal fatto che i microelettrodi sono caratterizzati da bassa corrente di elettrolisi (proporzionale all’area elettrodica), piccola capacità del doppio strato elettrico, ridotta caduta ohmica in soluzione e alta velocità di trasporto di massa, che rendono possibili misurazioni in regime di stato stazionario o transiente con alta sensibilità, ossia alto rapporto segnale/rumore, ed elevata risoluzione spaziale. Le tip più comuni sono quelle in cui un filo di materiale conduttore (più comunemente, Pt) o una fibra di carbone sono sigillate all’interno di un involucro di vetro, e sono impiegate per misure amperometriche, ma esistono anche tip ionoselettive, ossia ISE miniaturizzati, per l’esecuzione di misure potenziometriche. Sono state fabbricate tip con differenti geometrie, quali a disco, ad anello, emisferica, sferica, conica, a banda, talvolta con varianti costruttive adatte alla realizzazione di specifici esperimenti, anche se quella classicamente più impiegata è la geometria a disco (“microdisco”). La caratteristica più importante di una tip è il parametro RG, definito come il rapporto fra il diametro totale r_g della tip (comprendente il materiale elettrodico e l’involucro isolante di vetro) e il diametro a del materiale elettrodico. Per una tip con geometria microdisco, le dimensioni che definiscono RG sono indicate in Figura 2.16. Alte risoluzioni spaziali sono raggiungibili solo per valori di $RG \leq 10$.

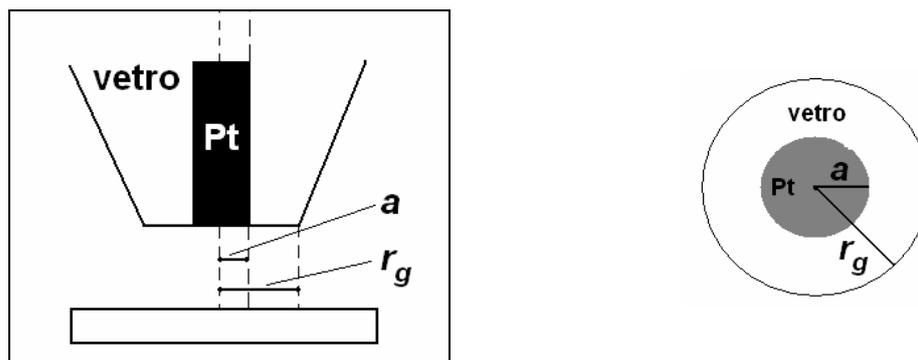


Figura 2.16 – Parametri geometrici caratteristici di una tip con geometria microdisco.

Per una tip con geometria microdisco, in cui il trasporto di massa avviene per diffusione emisferica, la corrente di stato stazionario $i_{T,\infty}$, è espressa, in funzione del numero di elettroni trasferiti nella reazione redox (n), della costante di Faraday (F), del coefficiente di diffusione (D), della concentrazione di specie elettroattiva nel bulk (C) e del raggio elettrodico (a), dalla seguente equazione: $i_{T,\infty} = 4 n F D C a$.

2.5.3. MODALITÀ OPERATIVE

Si possono condurre esperimenti SECM in diverse modalità operative [19]. Le principali sono il “feedback amperometrico” (FB), la “generation/collection” (nelle varianti SG/TC e TG/SC) e la “competizione redox” (RC), ma vengono impiegate anche le meno comuni “penetrazione” e “trasferimento elettronico con feedback”.

Vengono di seguito descritte solo le prime tre modalità.

2.5.3.1. Feedback amperometrico

La tip è immersa nel bulk di una soluzione elettrolitica contenente una specie di una coppia redox reversibile, detta “mediatore”, ad esempio la sua forma ridotta (R). Applicando alla tip un potenziale sufficientemente positivo, decorre la reazione di ossidazione del mediatore, secondo la reazione $R \rightarrow O + ne^-$ (1), ad una velocità governata dalla diffusione di R verso la superficie elettrodica. Se la tip è lontana dal substrato, ossia ad una distanza pari ad almeno alcuni diametri elettrodici, la corrente registrata è pari a $i_{T,\infty}$.

Quando la tip è fatta avvicinare lentamente al substrato, fino ad una distanza di pochi raggi elettrodici, la specie O formata nella reazione (1) diffonde verso il substrato. Si possono distinguere due casi: substrato conduttore e isolante.

Quando il substrato è elettricamente *conduttore*, all'OCP, o ad un potenziale sufficientemente negativo, la forma ossidata del mediatore può essere ridotta nuovamente secondo la reazione $O + ne^- \rightarrow R$ (2), secondo un meccanismo a "loop". Questo processo dà origine ad un flusso aggiuntivo di R alla tip e ad un incremento di corrente tanto maggiore, quanto minore è la distanza tip-substrato, d : l'effetto, detto "feedback positivo", è tale per cui $i_T > i_{T,\infty}$ per $d \rightarrow 0$, se la reazione di rigenerazione (2) è rapida. Viceversa, quando il substrato è elettricamente isolante, la forma ossidata O prodotta alla tip non può reagire sulla sua superficie secondo la reazione (2). Più la tip si avvicina al substrato, più è limitato lo strato di soluzione in cui decorre la reazione (1), perchè il substrato costituisce un ostacolo alla diffusione di R verso la tip e il vetro stesso che circonda la superficie elettrodica esercita un effetto di schermo. In questo caso, si verifica l'effetto detto "feedback negativo", secondo cui $i_T < i_{T,\infty}$ per $d \rightarrow 0$.

Il feedback positivo e negativo rappresentano casi estremi, in cui la rigenerazione del mediatore al substrato procede con velocità infinita o nulla, rispettivamente. Nei sistemi in cui la reazione procede con cinetica "finita" il comportamento è intermedio, e il feedback passa gradualmente da positivo a negativo, al diminuire della velocità di rigenerazione del mediatore.

L'andamento della corrente registrata alla tip, quando essa si avvicina alla superficie del campione, in funzione della distanza percorsa prende il nome di "curva di avvicinamento" (PAC). In Figura 2.17 sono riportate due curve di avvicinamento, una nel caso del feedback positivo e una in quello del feedback negativo, evidenziando il parallelismo fra posizione della tip e responso amperometrico registrato.

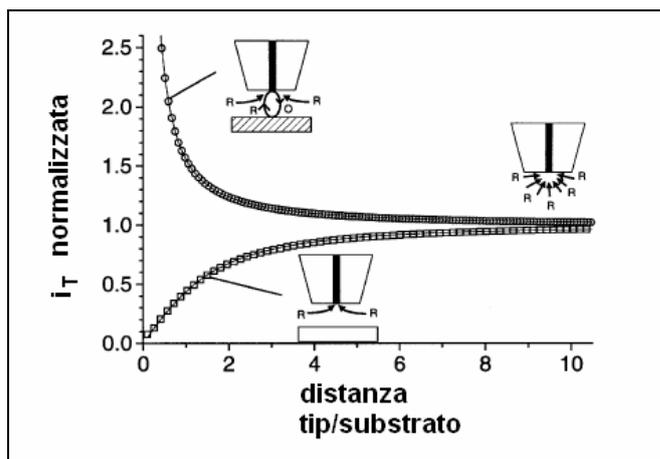


Figura 2.17 – Parallelismo fra la posizione della tip durante una curva di avvicinamento, e il responso amperometrico, per i casi di feedback positivo e negativo.

È stata elaborata una teoria SECM applicabile a diversi processi eterogenei ed omogenei e a differenti geometrie di tip e substrato. In generale, si descrive il sistema mediante un modello matematico, si imposta un problema alle derivate parziali e lo si risolve imponendo le opportune condizioni al contorno. Ad esempio, nel caso della geometria a disco è stata risolta la seconda equazione di Fick in coordinate cilindriche, modellando opportunamente il sistema, e si sono ottenute delle curve di avvicinamento teoriche nei casi di feedback positivo e negativo, per diversi valori del parametro RG (Figura 2.18).

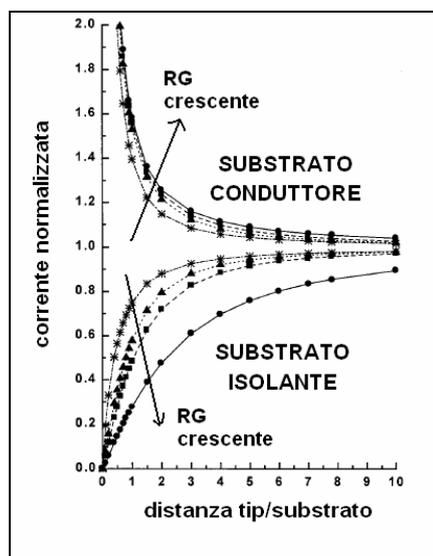


Figura 2.18 – Curve di avvicinamento teoriche per tip con geometria microdisco nel caso di substrato conduttore e isolante, per diversi valori di RG [20].

2.5.3.2. Generation/collection

In questa modalità un elettrodo genera delle specie, che vengono successivamente rivelate al secondo elettrodo di lavoro (Figura 2.19). Non è prevista l'aggiunta di mediatore in soluzione, come invece accade negli esperimenti di feedback.

Nella versione tip generation / substrate collection (TG/SC), impiegata per studiare cinetiche di reazione, la tip genera una specie elettroattiva che diffonde verso la superficie del substrato. Nella substrate generation / tip collection (SG/TC), invece, il substrato genera un profilo di concentrazione e la tip, viaggiando attraverso lo spesso strato di diffusione prodotto, registra correnti che riflettono la concentrazione locale delle specie redox di interesse. Quest'ultima modalità operativa può essere utilizzata per monitorare profili di concentrazione in processi di corrosione e catalisi eterogenea e in reazioni enzimatiche e metaboliche.

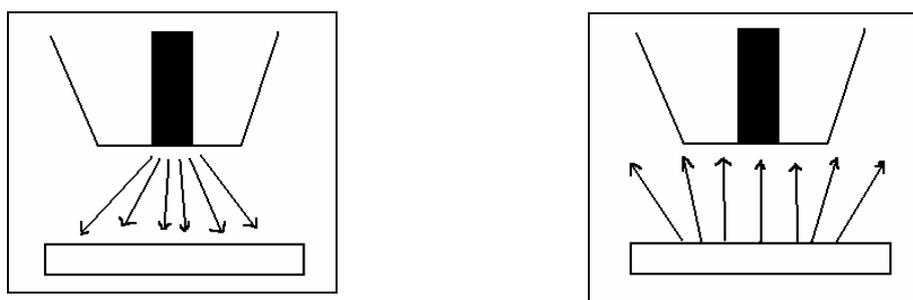


Figura 2.19 – Rappresentazione schematica delle modalità di lavoro TG/SC (sinistra) e SG/TC (destra).

2.5.3.3. Competizione redox (RC SECM)

La modalità competizione redox della SECM è stata sviluppata molto recentemente e applicata alla valutazione della reazione di riduzione dell'ossigeno (ORR) per la quantificazione dell'attività superficiale di catalizzatori, impiegati in celle a combustibile [21,22].

Si basa su un esperimento bi-potenziostatico in cui il substrato e la tip competono per lo stesso analita in soluzione. In Figura 2.20 è riportata una rappresentazione schematica del principio su cui si basa la competizione redox, prendendo come esempio la reazione di riduzione dell'ossigeno.

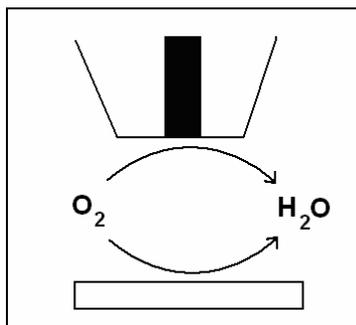


Figura 2.20 – Rappresentazione schematica della modalità operativa “competizione redox”.

Normalmente, il campione è mantenuto ad un potenziale costante, mentre alla tip viene applicato un profilo di potenziale a impulsi. Il profilo comprende:

- potenziale di base (E_{base}), a cui la reazione di interesse non decorre: applicato durante il movimento della tip, consente di evitare l’effetto della convezione, di eventuali variazioni locali di pH e del contributo capacitivo.;
- potenziale di iniezione reagente (E_{inj}): durante questo brevissimo impulso, l’analita è generato localmente nel gap tip-substrato;
- potenziale di rivelazione (E_{det}): fase di acquisizione dati, nella quale l’analita, la cui concentrazione locale è molto alta in seguito all’impulso di potenziale precedente, viene rivelato con alta sensibilità di risposta.

BIBLIOGRAFIA

- [1] P. Sun, F.O. Laforge, M.V. Mirkin, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2007, 9, 802.
- [2] G. Wittstock, M. Burchardt, S.E. Pust, Y. Shen, C. Zhao, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 1584.
- [3] M.V. Mirkin, B.R. Horrocks, *Anal. Chim. Acta* 2000, 406, 119.
- [4] M.V. Mirkin, T.C. Richards, A.J. Bard, *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 7672.
- [5] B. Liu, A.J. Bard, M.V. Mirkin, S.E. Creager, *J. Am. chem. Soc.* 2004, 126, 1485.
- [6] S.B. Basame, H.S. White, *Langmuir* 1999, 15, 819; K. Fushimi, T. Okawa, M. Seo, *Electrochemistry* 2000, 68, 950.
- [7] M. Tsionsky, J. Zhou, S. Amemiya, F.-R. F. Fan, A.J. Bard, R.A.W. Dryfe, *Anal. Chem.* 1999, 71, 4300.

- [8] C. Lee, F.C. Anson, *Anal. Chem.* 1992, 64, 528.
- [9] J. Fernández, D.A. Walsh, A.J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 357.
- [10] S. Jayaraman, A.C. Hillier, *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 5221.
- [11] C. Lee, J. Kwak, A.J. Bard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990, 87, 1740.
- [12] J.L. Fernández, N. Mano, A. Heller, A.J. Bard, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 6355.
- [13] M. Carano, N. Lion, J. Abid, H.H. Girault, *Electrochem. Commun.* 2004, 6, 1217.
- [14] J. Wang, F.M. Zhou, *J. Electroanal. Chem.* 2002, 537, 95.
- [15] O.E. Hüsser, D.H. Craston, A.J. Bard, *J. Vac. Sci. Technol. B* 1988, 6, 1873.
- [16] I. Shohat, D. Mandler, *J. Electrochem. Soc.* 1994, 141, 995.
- [17] Y. Shao, M.V. Mirkin, *J. Electroanal. Chem.* 1997, 439, 137.
- [18] B. Ballesteros Katemann, A. Schulte, W. Schuhmann, *Chem. Eur. J.* 2003, 9, 2025.
- [19] A.J. Bard (Ed.), M.V. Mirkin (Ed.), *Scanning Electrochemical Microscopy*, Marcel Dekker, New York, 2001.
- [20] J.L. Amphlett, G. Denuault, *J. Phys. Chem. B* 1998, 102, 9946.
- [21] K. Eckhard, X. Chen, F. Turcu, W. Schuhmann, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2006, 8, 5359.
- [22] K. Eckhard, W. Schuhmann, *Electrochim. Acta* 2007, 53, 1164.

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1. FABBRICAZIONE DEGLI ELETTRODI

3.1.1. Macroelettrodi

- *Materiali e strumentazione*

	CARATTERISTICHE	CASA PRODUTTRICE
Teflon	barre cilindriche; Ø 1.0 cm	
GC	barre cilindriche; Ø 3.0 mm	Tokai Carbon
	barre cilindriche; Ø 1.0 mm	
Capillari	vetro borosilicato; Ø _{est.} : 1.5 mm; Ø _{int.} : 0.225 mm	Hilgenberg
Pt	barre cilindriche; Ø 3.0 mm	GoodFellow
Carta abrasiva	al SiC; P1000, P2000, P4000	Remet
Al ₂ O ₃	polvere deagglomerata; granulometria 0.05 µm	Buehler

- *Procedure operative*

Gli elettrodi di Pt e GC con geometria a disco e diametro elettrodo pari a 3.0 mm, impiegati per la realizzazione dei sensori e biosensori a base di HT, HCF, LOx e GOx, sono stati fabbricati per assemblaggio di diverse parti.

Una barra di Teflon cilindrica è stata tagliata per ricavarne supporti di altezza 1.5 cm. In ogni supporto si è incapsulato, a caldo, un cilindretto del materiale elettrodo desiderato (Pt o GC), lasciandone esposta una faccia, in modo da realizzare una geometria a disco.

La superficie elettrodo è stata quindi livellata e pulita a specchio per abrasione su carta vetrata a granulometria decrescente (P1000, P2000, P4000) e successivo trattamento con sospensione acquosa di Al₂O₃, depositata su un panno per lucidatura. L'uso della carta vetrata è indicato per gli elettrodi di GC, mentre è sconsigliato per quelli di Pt, nei quali una abrasione troppo energica provoca graffi, oltre alla perdita di metallo prezioso.

All'interno del supporto viene eseguita una filettatura per consentire l'avvitamento di una barra di rame (inserita a sua volta in un corpo di Teflon per rendere l'elettrodo più facilmente maneggiabile), la quale permette di realizzare il contatto elettrico fra il materiale elettrodo e il connettore del potenziostato. Le parti costitutive di un macroelettrodo di GC sono mostrate in Figura 3.1.



Figura 3.1 – Parti costitutive di un macroelettrodo di GC.

3.1.2. Microelettrodi

- *Materiali e strumentazione*

	<i>CARATTERISTICHE</i>	<i>CASA PRODUTTRICE</i>
Capillari di vetro	vetro borosilicato; $\varnothing_{est} = 1.5 \text{ mm}$, $\varnothing_{int} = 0.750 \text{ mm}$, spessore = 0.375 mm	Hilgenberg
Fili di Pt	$\varnothing = 25 \text{ }\mu\text{m}$	GoodFellow
Alimentatore DC		Voltcraft

- *Procedure operative*

La tecnica SECM richiede l'impiego, come elettrodi di lavoro, di microelettrodi, ossia di elettrodi il cui diametro è normalmente compreso fra 2 e 50 μm . La procedura di fabbricazione dei microelettrodi è complessa, tanto più quanto minore è il diametro elettrodo, e sono necessarie esperienza e competenza per ottenere elettrodi che forniscano un responso elettrochimico soddisfacente.

Di seguito è descritto il metodo impiegato per produrre un microelettrodo di Pt. Si è fuso un capillare di vetro borosilicato nella sua parte centrale, per ottenere una porzione con estremità appuntita. Per eseguire questa operazione, si è immobilizzato il capillare di vetro in posizione verticale, facendolo passare attraverso una spira metallica, che funge da resistenza, collegata ad un generatore di corrente costante. All'estremità inferiore del capillare è stato applicato un peso (Figura 3.2). Si è applicata una corrente costante pari a 18.0 A, che ha riscaldato la spira al calor rosso: il calore fonde il capillare, il quale è "tirato" verso il basso dal peso e si assottiglia, fino a dividersi in due parti.



Figura 3.2 – Apparato strumentale per la fabbricazione di microelettrodi di Pt.

Con l'ausilio di apposite pinzette, si è posizionato all'interno del capillare una porzione, non più lunga di 5 mm, di filo di Pt ($\varnothing = 25 \mu\text{m}$), e lo si è fatto scivolare verso la punta del capillare, quindi si è pre-sigillato il Pt applicando una corrente di 18.0 A alla spira metallica, posizionata in corrispondenza della punta del capillare, che è in grado di fondere il vetro e immobilizzare, in questo modo, il filo. A questo punto, si è collegata l'estremità non appuntita del capillare alla pompa da vuoto e si è sigillata una ulteriore porzione di filo di Pt con la spira ("sealing"), sempre partendo dalla punta e via via allontanandosi (Figura 3.3).

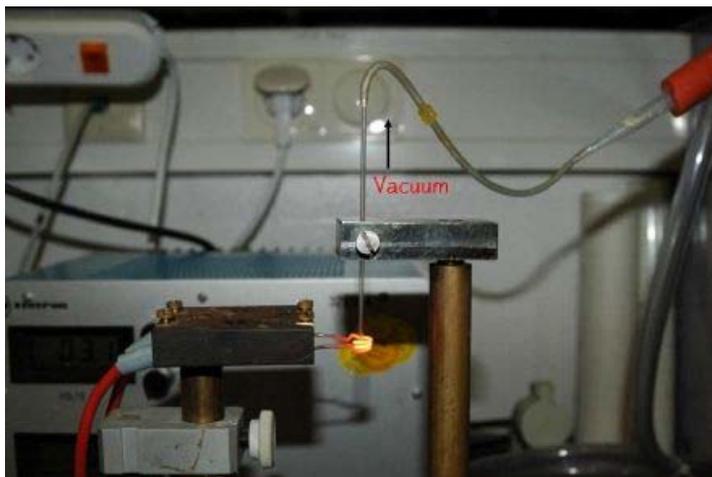


Figura 3.3 – Procedura di “sealing” di un filo di Pt in un capillare di vetro.

L'applicazione del vuoto impedisce che si formino bolle d'aria o “sacche” attorno al filo di Pt, che renderebbero scadenti le prestazioni dell'elettrodo (Figura 3.4).

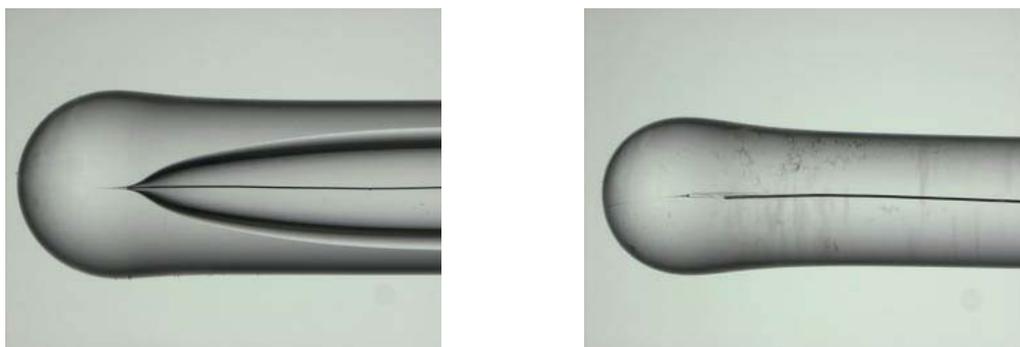


Figura 3.4 – Filo di Pt inserito nel capillare di vetro. Nell'immagine di sinistra è presente una sacca d'aria, mentre in quella di destra il filo è stato correttamente sigillato.

Per realizzare il contatto elettrico, si è posta una piccola quantità di polvere di Zn e un pezzetto di filo di Sn (lungo 4-5 mm) all'interno del capillare, dove si trova il filo di Pt, quindi si è inserito un filo di Cu. La fusione dello Sn solido, già citata precedentemente, è stata indotta mediante applicazione di una corrente di 14.0 A per qualche secondo alla spira metallica.

La punta dell'elettrodo è stata sottoposta a delicata abrasione su carta vetrata per rimuovere il vetro in eccesso ed esporre la superficie di Pt. Si è potuto ottenere, in questo modo, un microelettrodo con geometria di tipo “micro-disco” (Figura 3.5). È importante che in ogni fase della fabbricazione si esegua una attenta ispezione della qualità dell'elettrodo al microscopio ottico.

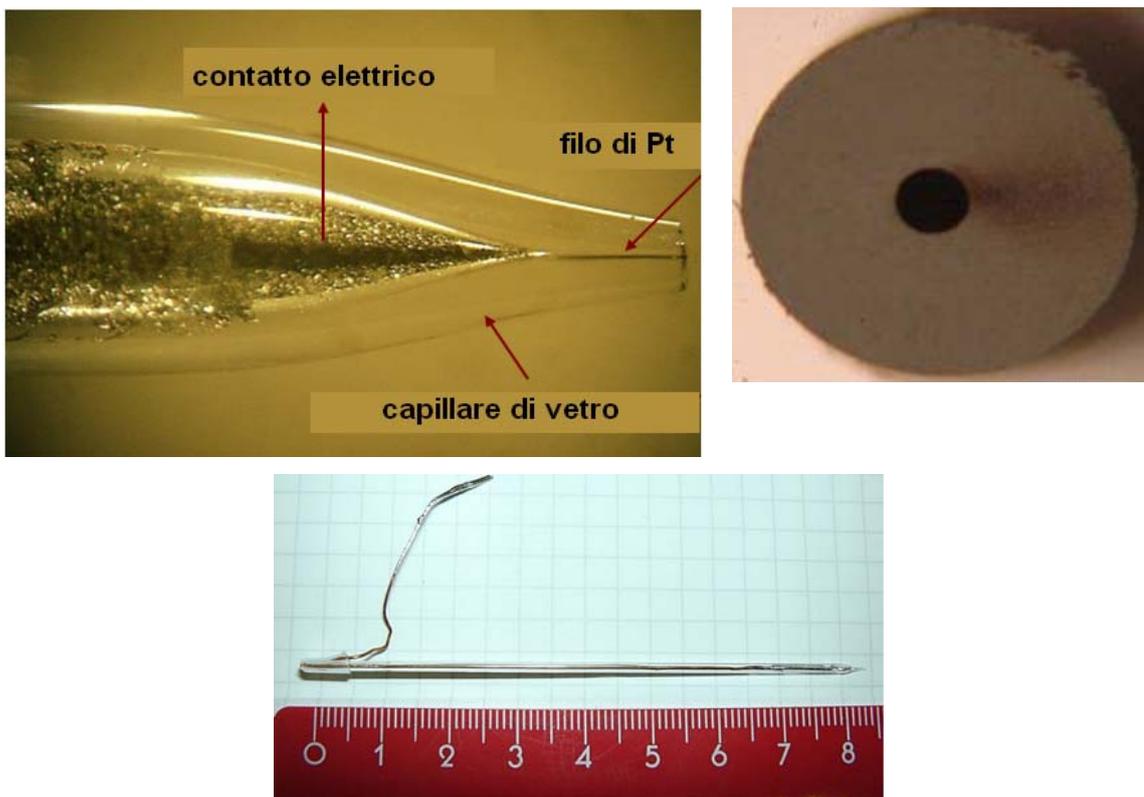


Figura 3.5 – Porzione estrema di un microelettrodo di Pt (in alto, a sinistra); ingrandimento di un microelettrodo di Pt con geometria a disco (in alto, a destra); dimensioni e aspetto di un microelettrodo di Pt (in basso).

3.1.3. Elettrodi di riferimento Ag/AgCl “home-made”

- *Materiali e strumentazione*

	CASA PRODUTTRICE
Fili di Ag	GoodFellow
Alimentatore DC	Volcraft

- *Reagenti*

DENOMINAZIONE	FORMULA CHIMICA / SIGLA	CASA PRODUTTRICE
Cloruro di potassio	KCl	J.T. Baker
Acido cloridrico	HCl	Waldeck

- *Procedure operative*

La procedura seguita per fabbricare elettrodi di riferimento Ag/AgCl viene descritta.

Si è preso un filo di Ag e lo si è abraso leggermente con carta vetrata, per aumentarne la superficie di contatto, quindi lo si avvolge a spirale. Si è

depositato AgCl sul filo, usando un generatore di tensione e una cella a 2 elettrodi (filo di Ag come WE, filo di Pt come CE) da una soluzione contenente KCl 3 M e HCl 0.1 M, applicando un potenziale di 5 V per 1 minuto, seguito da 10 V per 10 minuti: si è osservata chiaramente la formazione di un deposito bianco/rosa di AgCl. La spirale di filo è stata lasciata ad asciugare per 1 notte, perchè il film si stabilizzasse.

Il corpo dell'elettrodo, costituito da una pipetta Pasteur alla cui estremità era stato inserito e sigillato un setto poroso, è stato riempito con KCl 3 M, facendo attenzione a rimuovere le eventuali bolle d'aria. Al filo di Ag è stato collegato un filo di Cu per realizzare il contatto elettrico, infine è stato inserito nel corpo di vetro e immobilizzato con manicotti termorestringenti (Figura 3.6). L'elettrodo così costituito è stato lasciato alcune ore in soluzione di KCl, per riempire il setto di soluzione.



Figura 3.6 – Elettrodo di riferimento Ag/AgCl “home-made”.

3.1.4. Mini-elettrodi di riferimento Ag/AgCl/agar

- *Materiali e strumentazione*

	<i>CARATTERISTICHE</i>	<i>CASA PRODUTTRICE</i>
Fili di Ag	$\varnothing = 250 \mu\text{m}$	GoodFellow
Capillari	vetro borosilicato, $\varnothing_{\text{est}} = 1 \text{ mm}$, $\varnothing_{\text{int}} = 0.875 \text{ mm}$	Hilgenberg
Alimentatore DC		Voltcraft

- *Reagenti*

<i>DENOMINAZIONE</i>	<i>FORMULA CHIMICA / SIGLA</i>	<i>CASA PRODUTTRICE</i>
Cloruro di potassio	KCl	J.T. Baker

Acido cloridrico	HCl	Waldeck
Agar		Applichem

- *Procedure operative*

Per poter essere inserito nell'alloggiamento della droplet cell, l'elettrodo di riferimento deve essere di piccole dimensioni.

AgCl è stato depositato su un filo di Ag in modo simile a quanto descritto precedentemente per la preparazione di elettrodi di riferimento Ag/AgCl, applicando un potenziale di 2 V per 40 minuti.

Il filo di Ag è stato inserito in un capillare di vetro "tirato" a caldo, in modo da ottenere una estremità appuntita, ed è stato immobilizzato all'estremità superiore con un manicotto di materiale elastico. La soluzione di riempimento scelta, KCl 3 M, non è stata preparata in acqua, ma in gel di agar, per limitare la fuoriuscita della soluzione ed aumentare la vita dell'elettrodo stesso. Il gel di agar è stato preparato ponendo una punta di spatola di agar in polvere in un beaker contenente una soluzione acquosa di KCl 3 M + HCl 0.1 M, quindi riscaldando la miscela a 350 °C, fino ad ebollizione. Gli elettrodi sono stati immersi nella sospensione bollente perchè si la soluzione di riempimento risalisse attraverso l'estremità inferiore, quindi il riscaldamento è stato disabilitato. La miscela, raffreddandosi all'interno degli elettrodi, ha fornito infine un gel. I mini Ag/AgCl sono stati lasciati a condizionare per 24 ore, in modo che il loro potenziale si potesse stabilizzare al corretto valore.

3.2. PULIZIA DELLE SUPERFICI ELETTRODICHE E CONTROLLO ELETTROCHIMICO

Prima di eseguire qualsiasi misura elettrochimica, è opportuno attuare una procedura di pulizia della superficie elettrodica per evitare la presenza di specie estranee. La registrazione di una CV in elettrolita di supporto consente di verificare facilmente il grado di pulizia della superficie: in presenza di contaminanti elettroattivi, si osserva la comparsa di picchi di ossidazione e riduzione, rappresentativi delle specie inquinanti.

3.2.1. Macro elettrodi

- *Materiali e strumentazione*

	<i>CARATTERISTICHE</i>	<i>CASA PRODUTTRICE</i>
Fili di Ag	Ø = 250 µm	GoodFellow
Al ₂ O ₃	polvere deagglomerata; granulometria 0.05 µm	Buehler
Potenziostato	CHI 660C	CHInstruments
Elettrodo di riferimento	SCE	AMEL
Controelettrodo	Filo di Pt	GoodFellow

- *Procedure operative*

Gli elettrodi di Pt e GC vengono puliti su un panno da lucidatura con una sospensione acquosa di Al₂O₃ (granulometria 0.05 µm), quindi lavati con abbondante acqua distillata per rimuovere il più possibile l'eventuale allumina adsorbita sulla superficie. Si può proseguire la pulizia con un trattamento consistente nell'applicazione di cicli voltammetrici, in H₂SO₄ 0.1 M, fra 0.0 e +1.05 V vs. SCE.

3.2.2. Micro elettrodi

- *Reagenti*

<i>DENOMINAZIONE</i>	<i>FORMULA CHIMICA / SIGLA</i>	<i>CASA PRODUTTRICE</i>
Rutenio(III) esaammino cloruro	[Ru(NH ₃) ₆]Cl ₃	Sigma-Aldrich
Cloruro di potassio	KCl	J.T. Baker

- *Materiali e strumentazione*

	<i>CARATTERISTICHE</i>	<i>CASA PRODUTTRICE</i>
Potenziostato	bipotenziostato Jaissle PG100	Jaissle Electronics
Elettrodo di riferimento	Ag/AgCl	
Controelettrodo	Filo di Pt	

- *Procedure operative*

Anche i micro elettrodi vengono puliti con Al₂O₃.

Una volta fabbricato, è necessario verificare che l'elettrodo presenti il comportamento elettrochimico tipico di un micro elettrodo. A questo scopo si

registra una CV in una soluzione contenente $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 5 mM e KCl 0.1 M, e ci si attende che la corrente di riduzione di stato stazionario sia pari a 25 nA per microelettrodi con diametro di 25 μm (Figura 3.7).

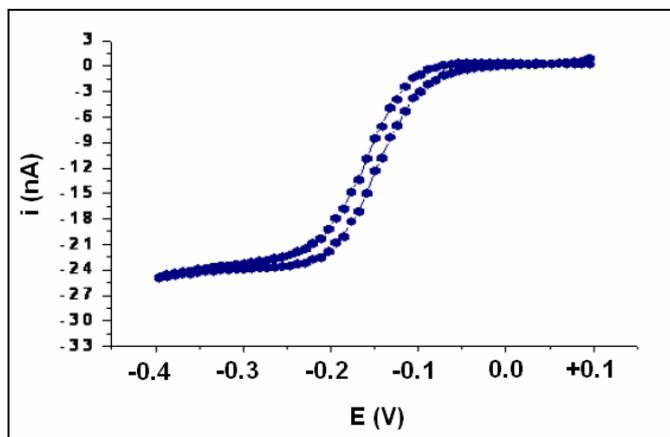


Figura 3.7 – CV di caratterizzazione attesa per un microelettrodo di diametro 25 μm in soluzione contenente $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 5 mM e KCl 0.1 M.

3.2.3. Lamine di GC per esperimenti SECM

- *Materiali e strumentazione*

	CARATTERISTICHE	CASA PRODUTTRICE
Lamine GC	Sigradur [®] - G	HTW Hochtemperatur Werkstoffe
Al ₂ O ₃	sospensione acquosa; granulometrie 1, 0.2, 0.05 μm	LECO

- *Procedure operative*

Le lamine di GC sono pulite sequenzialmente con tre sospensioni acquose di Al₂O₃ a granulometrie decrescenti, pari a 1, 0.3 e 0.05 μm , quindi sono poste in bagno a ultrasuoni in acqua distillata per 20 minuti, allo scopo di rimuovere le tracce di Al₂O₃ adsorbite sulla superficie.

3.3. MODIFICA DEGLI ELETTRODI

Nel corso del lavoro sperimentale sono stati impiegati diversi tipi di elettrodi modificati, al fine di sviluppare sensori e biosensori.

• *Reagenti*

<i>DENOMINAZIONE</i>	<i>FORMULA CHIMICA / SIGLA</i>	<i>SPECIFICHE</i>	<i>CASA PRODUTTRICE</i>
Nitrato di nichel (esaidrato)	$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$		Fluka
Nitrato di alluminio (nonaidrato)	$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$		Carlo Erba
Nitrato di potassio	KNO_3		Fluka
Cloruro di potassio	KCl		Fluka
Acido cloridrico	HCl		Sigma-Aldrich
Cloruro di rame(II) (biidrato)	$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$		Sigma-Aldrich
Esacianoferrato di ferro(III), o ferricianuro	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$		Riedel-de Haën
Nitrato di rame(II) triidrato	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$		Merck
Acido nitrico	HNO_3		BDH
Cloruro di palladio	PdCl_2		Sigma-Aldrich
Glucosio ossidasi	GOx	tipo VII da <i>Aspergillus niger</i> , 192000 unità/g di solido	Sigma-Aldrich
Lattato ossidasi	LOx	da <i>Pediococcus</i> , 50000 unità/g di solido	Sigma-Aldrich
Albumina di siero bovino	BSA	contenuto di proteina minimo: 96%	Sigma-Aldrich
Glutaraldeide	GA	25% w/w in H_2O	Sigma-Aldrich
Nafion		soluzione 5% w/w in miscela di H_2O e alcoli a catena corta	Sigma-Aldrich

• *Materiali e strumentazione*

	<i>CARATTERISTICHE</i>	<i>CASA PRODUTTRICE</i>
Potenziostato	Autolab PGSTAT 20, con software GPES 4.9	Metrohm
	CHI 660C	CHInstruments, Inc.
Termostato	modello MB-5	Julabo
Elettrodo di riferimento	SCE	AMEL
Controelettrodo	Filo di Pt	GoodFellow

• *Procedure operative*

3.3.1. Sensori per H_2O_2 a base di HCF depositati su GC

3.3.1.1. CuHCF (GC/CuHCF)

Deposizione elettrochimica, per via potenziodinamica:

si sono applicati cicli voltammetrici tra 0.0 e +1.05 V vs. SCE, a 20 o 50 mV/s (numero di cicli e velocità di scansione dipendenti dalle applicazioni) in soluzione di KCl 0.1 M + HCl 0.1 M, contenente ioni Cu^{2+} e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (da soluzioni acquose di CuCl_2 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) a concentrazioni dell'ordine mM (valori riportati nel dettaglio nella sezione *Risultati e discussione*).

L'elettrosintesi è stata condotta in atmosfera inerte, degasando la soluzione con un flusso di N_2 ad alta purezza per 10 minuti.

Deposizione per via chimica:

la precipitazione di CuHCF è stata indotta mescolando, direttamente sulla superficie elettrodica, uguali volumi (ordine di grandezza μM) di soluzioni di CuCl_2 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, entrambe 0.1 M, erogati mediante una micropipetta.

3.3.1.2. CuHCF arricchito di Cu^{2+}

CuHCF, elettrodepositato con 20 cicli voltammetrici a 20 mV/s, è stato successivamente sottoposto alla seguente procedura per ottenere l'intercalazione di ioni Cu^{2+} . Si è immerso l'elettrodo in una soluzione, precedentemente degasata con N_2 , di $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 4 mM in HNO_3 0.1 M, e si è registrata una voltammetria a scansione lineare (LSV) a 1 mV/s, scansionando il potenziale da +1.0 V vs. SCE verso potenziali più catodici. Si è osservata la comparsa di un picco di riduzione, al termine del quale (ad un potenziale, vicino a 0.0 V) la scansione è stata arrestata.

3.3.1.3. PdHCF (GC/PdHCF)

Deposizione elettrochimica, per via potenziodinamica:

si sono applicati 100 cicli voltammetrici tra 0.0 e +1.05 V vs. SCE, a 50 mV/s in soluzione di KCl 0.1 M + HCl 0.1 M, contenente ioni Pd^{2+} e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (da soluzioni di PdCl_2 0.05 M in HCl 0.1 M e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in H_2O) a concentrazioni dell'ordine mM (valori riportati nel dettaglio nella sezione *Risultati e discussione*).

3.3.1.4. CuPdHCF (GC/CuPdHCF)

Deposizione elettrochimica, per via potenziodinamica:

si sono applicati 100 cicli voltammetrici tra 0.0 e +1.05 V vs. SCE, a 50 mV/s in soluzione di KCl 0.1 M + HCl 0.1 M, contenente ioni Cu^{2+} , Pd^{2+} e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (da soluzioni di CuCl_2 in H_2O , PdCl_2 in HCl 0.1 M e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in H_2O) a concentrazioni dell'ordine mM (valori riportati nel dettaglio nella sezione *Risultati e discussione*).

Dopo la modifica, gli elettrodi sono stati risciacquati abbondantemente con acqua, per eliminare le tracce di sali provenienti dalla soluzione di elettrosintesi.

La sospensione enzimatica di GOx, conservata a $-18\text{ }^\circ\text{C}$, prima di essere impiegata è stata tenuta per 1 ora in bagno termostato a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.2. *Biosensore per il glucosio a base di HCF e GOx (GC)*

Dopo avere modificato la superficie elettrodica per elettrodeposizione di un esacianoferrato, si è depositato l'enzima GOx, testando diversi sistemi di immobilizzazione:

3.3.2.1. BSA + GA (GC/HCF/GOx+BSA+GA)

Sono stati mescolati 30 μL di una sospensione contenente GOx (10 mg/mL) e BSA (40 mg/mL), in PBS 0.1 M a pH 7.0, con 10 μL di soluzione acquosa di GA al 2.5% w/w. Una aliquota da 10 μL della miscela è stata depositata sull'elettrodo e lasciata ad asciugare lentamente in una camera satura di vapori d'acqua.

3.3.2.2. Nafion (GC/HCF/GOx+Nafion)

Il Nafion è stato impiegato in miscela con l'enzima.

Si sono mescolati 100 μL di GOx 10 mg/mL (in PBS pH 5.5) e 900 μL di una soluzione acquosa di Nafion all'1%, ottenuta per diluizione con H_2O della soluzione concentrata commerciale (5% in miscela di acqua e alcoli organici a catena corta) e portata a pH 5.5 per aggiunta di KOH. 10 μL della miscela sono stati depositati sull'elettrodo modificato. Per aumentare la stabilità del biofilm, è stato applicato un ulteriore trattamento consistente

nella esposizione della superficie elettroica modificata a vapori di glutaraldeide (25% w/w) per 20 minuti. L'elettrodo è stato quindi posto in atmosfera satura di vapori d'acqua per consentire al film una lenta asciugatura.

La rimozione dei film di esacianoferrati dalla superficie elettroica è stata effettuata immergendo l'elettrodo in soluzione fortemente alcalina (LiOH 1 M), per un tempo sufficiente a garantirne la completa dissoluzione.

3.3.3. Biosensori per il lattato a base di HT e LOx (Pt/HT/LOx/BSA+GA e Pt/HT/LOx/Nafion)

Si è eseguita l'elettrosintesi di un film di HT a base di Ni e Al (Ni/Al-HT) su Pt.

La deposizione di HT è stata condotta per via potenziostatica, applicando un potenziale di -0.9 V vs. SCE per 30 secondi all'elettrodo immerso in una soluzione acquosa, quiescente, contenente $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 0.0250 M, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0.0075 M e KNO_3 0.3 M. La superficie dell'elettrodo modificato è stata risciacquata abbondantemente con H_2O_2 distillata, per rimuovere le tracce dei sali della soluzione acida di elettrosintesi.

Nella preparazione dei biosensori, la sospensione enzimatica di LOx, conservata a -18 °C, prima di essere impiegata è stata tenuta per 1 ora in bagno termostato a 35 °C, per fare in modo che la conformazione dell'enzima, e, di conseguenza, la sua attività, venisse ripristinata.

3.3.3.1. Pt/HT/LOx/BSA+GA

Una aliquota da 10 μL di una sospensione contenente LOx (1.1 mg/mL) e BSA (22 mg/mL), in PBS pH 7.0, è stata depositata sulla superficie elettroica modificata con l'HT. L'elettrodo appena modificato è stato esposto per 20 minuti a vapori prodotti da una soluzione acquosa di GA 25% w/w ed è stato quindi sottoposto a lenta asciugatura in atmosfera satura di vapori d'acqua, a temperatura ambiente. Non si è lasciato che il biofilm si asciugasse completamente, perchè prove precedenti avevano dimostrato che

una membrana troppo “secca” si distaccava dal supporto elettrodico, non appena immersa in soluzione per le misure.

3.3.3.2. *Pt/HT/LOx/Nafion*

10 μL di una sospensione di LOx 1.1 mg/mL (in PBS 0.1 M, pH 7.0) sono stati depositati sull'elettrodo modificato con l'HT. Il biofilm è stato sottoposto ad asciugatura lenta, secondo la procedura descritta sopra, quindi una aliquota da 10 μL di Nafion 0.5% (ottenuto diluendo con H₂O la soluzione commerciale al 5% w/w) è stata depositata sull'elettrodo e la procedura di asciugatura è stata ripetuta.

3.4. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER ESPERIMENTI SECM

- Materiali e strumentazione*

	<i>CARATTERISTICHE</i>	<i>CASA PRODUTTRICE</i>
Lamine GC	Sigradur [®] - G	HTW Hochtemperatur Werkstoffe
Potenzio stato	Autolab PGSTAT 12 con software GPES 4.9	Metrohm
Elettrodo di riferimento	mini Ag/AgCl	
Controelettrodo	Filo di Pt	GoodFellow

- Reagenti*

<i>DENOMINAZIONE</i>	<i>FORMULA CHIMICA / SIGLA</i>	<i>SPECIFICHE</i>	<i>CASA PRODUTTRICE</i>
Esacianoferrato di ferro(III), o ferricianuro	K ₃ [Fe(CN) ₆]		Riedel-de Haën
Cloruro di ferro(III) (esaidrato)	FeCl ₃		Acros
Cloruro di potassio	KCl		J.T. Baker
Acido cloridrico	HCl		J.T. Baker
Glucosio ossidasi	GOx	tipo X-S da <i>Aspergillus niger</i> , 146000 unità/g di solido	Sigma-Aldrich
Resydrol		AY 498w/35WA	Vianova Resins

- Procedure operative*

I campioni per effettuare esperimenti SECM sono stati preparati su lamine di GC.

La deposizione elettrochimica di film di forma circolare e diametro dell'ordine di centinaia di μm si è effettuata con una cella di dimensioni ridotte, chiamata "droplet cell" [1] (Figura 3.8). Si tratta di un dispositivo, in materiale polimerico trasparente, con 3 aperture. In quella posta sul lato inferiore è inserito un capillare appuntito, contenente la soluzione per l'elettrodeposizione, che funge da cella elettrochimica. I due alloggiamenti sul lato superiore contengono l'elettrodo di riferimento (mini-Ag/AgCl) e il contro elettrodo (filo di Pt).

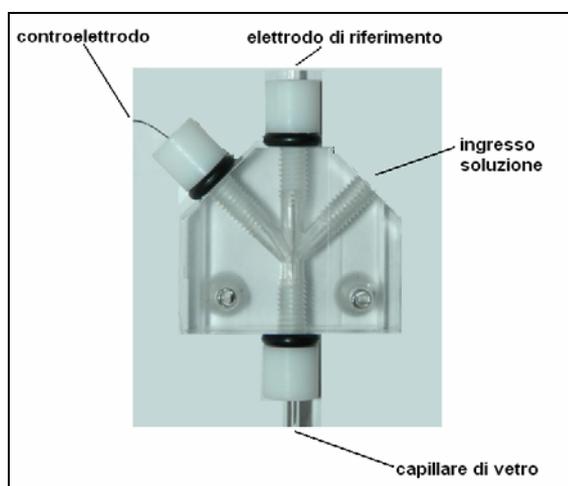


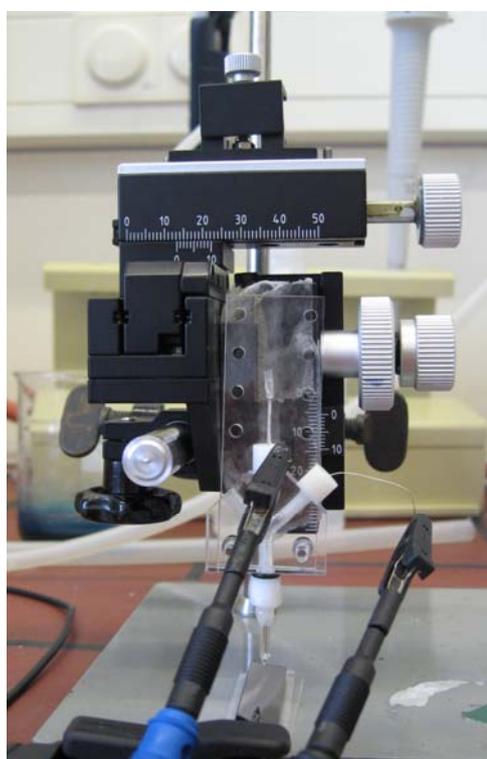
Figura 3.8 – Droplet cell.

3.4.1. Spot di Blu di Prussia (GC/PB)

L'elettrodeposizione di spot circolari di PB di dimensioni micrometriche è stata condotta potenziodinamicamente, eseguendo 5 cicli voltammetrici tra +0.40 e +0.75 V vs. Ag/AgCl, a 20 mV/s, in una soluzione acquosa, preparata al momento, contenente FeCl_3 2 mM (in HCl 1 M), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 2 mM, KCl 0.1 M e HCl 0.1 M. L'ossigeno atmosferico non è stato rimosso dalla soluzione durante l'elettrosintesi. È importante che le soluzioni dei reagenti di partenza siano preparate giornalmente, e che FeCl_3 (in HCl) sia conservato al buio.

La droplet cell è stata fissata ad un dispositivo in grado di farla muovere in direzione verticale, mediante una vite di regolazione, quindi si è riempito velocemente il capillare con la soluzione contenente i reagenti e si sono

inseriti l'elettrodo di riferimento e il controelettrodo negli appositi alloggiamenti (Figura 3.9). Si è fatta muovere lentamente la cella in direzione verticale, verso il supporto di GC da modificare, e la si è arrestata quando il capillare è entrato in contatto con il GC e si è osservata la formazione di un sottilissimo strato di soluzione fra il bordo del capillare e la superficie stessa. In queste condizioni, ci si attendeva che la porzione di GC bagnata dalla soluzione che esce dal capillare possedesse all'incirca le dimensioni finali dello spot di PB.



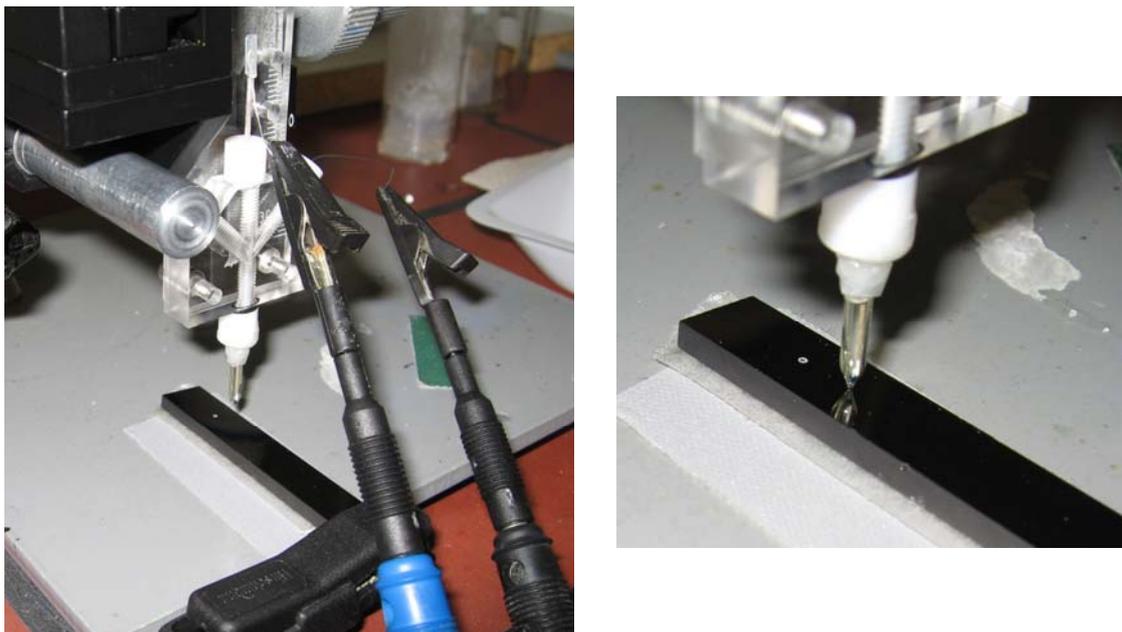


Figura 3.9 – Impiego della droplet cell per la modifica elettrochimica della lamina di GC.

Il film depositato è stato lavato con H₂O e sottoposto a due successivi trattamenti, per aumentare la stabilità operativa del film, come suggerito da un lavoro di letteratura [2]. Nel primo trattamento, di “attivazione”, sono stati eseguiti 20 cicli CV tra +0.35 e -0.05 V vs. Ag/AgCl, a 40 mV/s, nello stesso elettrolita di supporto impiegato per la deposizione. Nel secondo, di “asciugatura”, il campione è stato posto in stufa a 100 °C, per 1 ora.

3.4.2. Spot di Blu di Prussia+GOx (GC/PB/GOx+Resydrol)

L'enzima GOx è stato immobilizzato sul film di PB usando il polimero commerciale Resydrol [3], secondo la procedura seguente. Si sono mescolati polvere liofilizzata di GOx (la quantità, dipendente dalla massa che si desidera depositare, è indicata dettagliatamente nella sezione *Risultati e discussione*) e Resydrol (140 µL) in un vial, portando la miscela ad un volume totale di 1 mL con PBS 0.1 M a pH 6.0. Una piccola quantità della miscela è stata prelevata e depositata con un sottile capillare di vetro sulla superficie del GC, quindi lo spot è stato lasciato ad asciugare all'aria, a temperatura ambiente, per 1 ora.

3.5. VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI DEGLI ELETTRODI MODIFICATI

- *Materiali e strumentazione*

	<i>CARATTERISTICHE</i>	<i>CASA PRODUTTRICE</i>
Potenziostato	Autolab PGSTAT 20 con software GPES 4.9	Metrohm
	CHI 660C	CHInstruments
Elettrodo di riferimento	SCE	AMEL
Controelettrodo	Filo di Pt	GoodFellow

- *Reagenti*

<i>DENOMINAZIONE</i>	<i>FORMULA CHIMICA / SIGLA</i>	<i>SPECIFICHE</i>	<i>CASA PRODUTTRICE</i>
Diidrogenofosfato di potassio	KH_2PO_4		Riedel-de Haën
Perossido di idrogeno	H_2O_2	35% w/w in H_2O	Sigma-Aldrich
D(+)-glucosio	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	anidro	Fluka
Acido L(+)-lattico	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$		Fluka

- *Procedure operative*

3.5.1. Determinazioni cronoamperometriche

Le prestazioni degli elettrodi modificati sono state valutate mediante cronoamperometria in soluzione PBS 0.1 M, a pH 5.5 o 7.0, in dipendenza dalle applicazioni. Le soluzioni tamponate sono state preparate a partire da KH_2PO_4 , in seguito portando il pH al valore desiderato mediante aggiunte di soluzione acquosa di KOH.

Le soluzioni di H_2O_2 sono state preparate per diluizione della soluzione stock concentrata commerciale (30% w/w). La soluzione di glucosio (0.05 o 0.1 M) è stata lasciata a riposo per almeno 2 ore prima dell'utilizzo, a temperatura ambiente, per consentire all'equilibrio di anomerizzazione di stabilirsi.

Nella determinazione cronoamperometrica, è stato applicato un potenziale di lavoro costante ed è iniziata la misurazione. Stabilizzatasi la corrente di background, sono state effettuate aggiunte successive di analita sotto agitazione magnetica, registrando il conseguente incremento di corrente. Nel

caso degli elettrodi modificati con esacianoferrati, l'elettrodo è stato sempre sottoposto a precondizionamento, polarizzandolo al potenziale di lavoro per 10 minuti.

3.5.2. Studio della risposta agli interferenti nei biosensori per il lattato

Lo studio di interferenza è stato condotto mediante cronoamperometria. Dopo aver applicato il potenziale di lavoro, si è atteso che la corrente di background si stabilizzasse. Si è aggiunta una aliquota di acido lattico in soluzione e si è registrato il conseguente incremento di corrente (preso come riferimento). In successione, sono state effettuate aggiunte equimolari di acido lattico+interferente. L'entità dell'interferenza (%) è stata valutata con la seguente formula:

$$\frac{i_{L+I} - i_L}{i_L} \times 100$$
, dove i_{L+I} è la corrente registrata in presenza di lattato+interferente, e i_L è la corrente in presenza di solo lattato.

3.6. VISUALIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ LOCALE DI BLU DI PRUSSIA: TECNICA SECM

- *Materiali e strumentazione*

	CARATTERISTICHE	CASA PRODUTTRICE
SECM	bipotenziostato Jaissle PG100	Jaissle Electronics
Elettrodo di riferimento	mini Ag/AgCl	
Controelettrodo	Rete di Pt	GoodFellow

- *Reagenti*

DENOMINAZIONE	FORMULA CHIMICA / SIGLA	SPECIFICHE	CASA PRODUTTRICE
Diidrogenofosfato di potassio	KH ₂ PO ₄		Riedel-de Haën
Perossido di idrogeno	H ₂ O ₂	35% w/w in H ₂ O	Sigma-Aldrich
D(+)-glucosio	C ₆ H ₁₂ O ₆	anidro	Fluka
Catalasi		da fegato bovino, 2100000 unità/g di solido	Sigma-Aldrich

- *Procedure operative*

La soluzione tampone PBS 0.1 M è stata preparata da a partire da KH_2PO_4 , portando in seguito il pH al valore di 6.0 per aggiunte di soluzione acquosa di KOH.

La soluzione diluita di H_2O_2 (0.1, 0.001, 0.001 M) è stata preparata dalla soluzione stock concentrata commerciale (30% w/w). La soluzione di glucosio (1 M) è stata lasciata a riposo per 24 ore prima dell'utilizzo, per consentire all'equilibrio di anomerizzazione di stabilirsi.

L'attività locale di spot micrometrici di Blu di Prussia è stata valutata impiegando la tecnica SECM. La cella elettrochimica a 4 elettrodi era composta dal microelettrodo di Pt e dalla lamina di GC (substrato) come elettrodi di lavoro, da un elettrodo Ag/AgCl come riferimento e da una rete di Pt come controlettrodo (Figura 3.10).

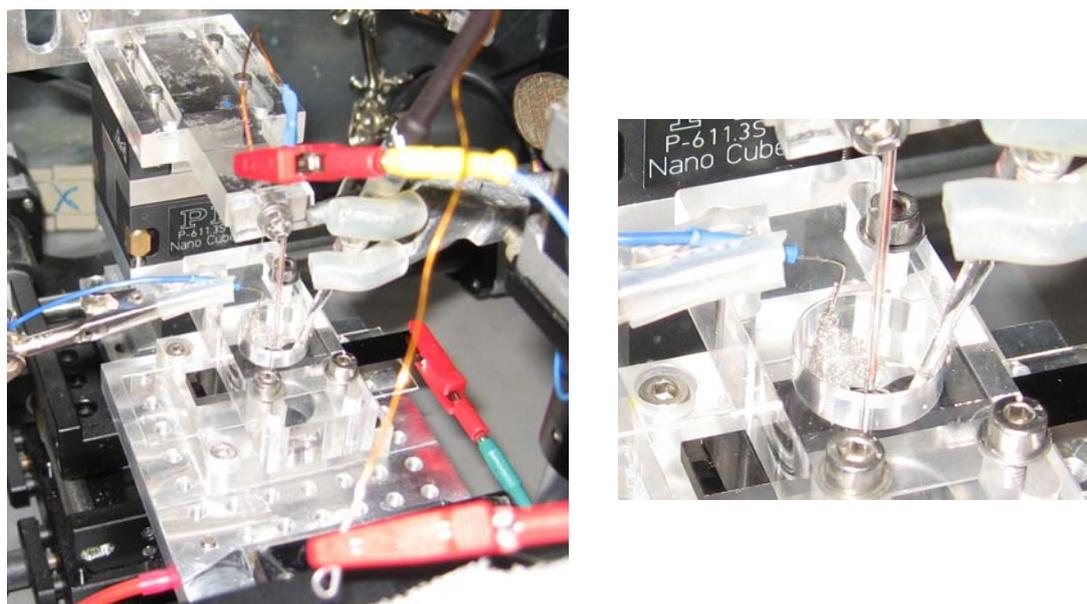


Figura 3.10 – Posizionamento degli elettrodi e del substrato nella cella del microscopio SECM.

Un tipico esperimento è composto da fasi successive, che di seguito sono descritte nel dettaglio dal punto di vista operativo.

- 1) Posizionamento del campione e degli elettrodi (set-up sperimentale), aggiunta della soluzione.

- 2) Definizione dell'area di scansione, la quale rappresenta un rettangolo (o un quadrato) comprendente lo spot circolare. La tip viene posizionata in corrispondenza dell'angolo in alto a sinistra dell'area di scansione ("punto 0").
- 3) Avvicinamento della tip alla superficie e correzione del "tilt".

La strumentazione SECM impiegata per effettuare queste determinazioni di attività elettrocatalitica era dotata di un software in grado di compensare l'angolazione (tilt) normalmente esistente fra la superficie del campione e il piano di scansione. La correzione del tilt prevede la registrazione di 3 curve di avvicinamento su altrettanti punti agli angoli dell'area di scansione (punti 0, 1, 2). Il software individua un piano passante per 3 punti, aventi tutti coordinate x,y uguali a quelle dei punti 0, 1 e 2 e medesima distanza dalla superficie: durante la scansione la tip si muove seguendo questo piano, mantenendo costante la distanza fra il piano di scansione e la superficie del campione e, dunque, evitando il rischio di collisione fra tip e substrato.

Ogni curva di avvicinamento è stata registrata in PBS 0.1 M, pH 6.0, applicando un potenziale di lavoro di -0.6 V vs. Ag/AgCl per far decorrere la reazione di riduzione dell'ossigeno (ORR). La procedura operativa consiste nel far dapprima avvicinare la tip a velocità sostenuta ($3 \mu\text{m/s}$) mediante il motore meccanico (stepper), poi, quando la corrente inizia a diminuire per effetto del feedback negativo, nel far proseguire l'avvicinamento a velocità più ridotta ($1 \mu\text{m/s}$) attivando il motore piezoelettrico. La tip viene arrestata quando entra in contatto con la superficie del campione e la posizione spaziale (coordinate x,y,z) di contatto viene memorizzata dal software di compensazione del tilt. La tip viene sollevata a distanza "di sicurezza" dal substrato e portata in prossimità del punto successivo di interesse.

- 4) Impostazione dei parametri sperimentali.

Si è impiegata una modalità di scansione "a pettine" ("comb-like"), secondo cui la tip scansiona una linea per volta in direzione x , quindi torna indietro (a velocità molto più alta, visto che non avviene acquisizione al ritorno) e si muove di un incremento di distanza in direzione y , per poi scansionare una seconda linea.

I parametri da impostare sono le dimensioni dell'area da scansionare, gli incrementi di distanza per l'avanzamento della tip nelle direzioni x e y , la

velocità di scansione, la velocità di ritorno, l' "offset" (distanza fra piano di scansione e superficie del substrato), il profilo a impulsi di potenziale per la tip (E di base, E di acquisizione), il potenziale del substrato, la sensibilità (definibile come i/E).

Gli incrementi x e y definiscono la risoluzione dell'immagine finale ottenibile, la quale è diversa a seconda delle caratteristiche del campione esaminato. Una risoluzione soddisfacente può essere ottenuta con valori del rapporto $\frac{\text{lunghezza_linea}}{\text{incremento}}$ superiori a 15.

5) Aggiunta di reagenti.

Si aggiunge una quantità opportuna di H_2O_2 , nel caso del campione GC/PB, o di glucosio, nel caso del campione GC/PB/GOx+Resydrol, quindi si mescola con attenzione, con l'aiuto di una pipetta Pasteur.

6) Condizionamento del campione.

Il substrato viene mantenuto per 5-10 minuti al potenziale di lavoro.

7) Inizio della scansione.

3.7. TRATTAMENTO DEI DATI

Tutti i grafici relativi a cronoamperometrie e curve di calibrazione sono stati presentati utilizzando il software OriginPro 7.

Nella costruzione delle curve di calibrazione, gli incrementi "totali" di corrente di stato stazionario ("delta i totali", espressi in A) sono stati posti in grafico in funzione della concentrazione di analita in soluzione (espressa come mM), in modo da correggere il responso in caso di linea di base non costante. La pendenza della porzione lineare della curva di calibrazione è stata assunta come sensibilità analitica del sensore.

Il limite di linearità (L.O.D.), associato a una determinazione cronoamperometrica, è stato calcolato dalla curva di calibrazione (corrente vs. concentrazione di analita) dell'elettrodo secondo il metodo riportato da Miller [J.C. Miller, J.N. Miller, "Statistics for Analytical Chemistry" (2nd edition), 1988, Ellis Horwood Limited, Chichester, England, pag. 17). Secondo tale definizione, si è considerata come L.O.D. la concentrazione corrispondente, secondo l'equazione della retta di regressione lineare tracciata per i punti sperimentali riportati in grafico, ad un segnale pari a quello del bianco più 3 volte la deviazione standard del bianco. Come

segnale di bianco, si è impiegato il valore dell'intercetta della retta di regressione con l'asse y, mentre la deviazione standard del bianco è stata stimata con la deviazione standard della regressione, $s_{y/x}$, calcolata con il software OriginPro 7.

Le scansioni SECM sono state rielaborate, sottraendo il background dal segnale, e presentate mediante il software MIRA ("Microscopic Image Rapid Analysis").

3.8. ANALISI SUPERFICIALE CON MICROSCOPIO A SCANSIONE ELETTRONICA (SEM)

Le immagini SEM sono state acquisite impiegando una tensione di accelerazione di 5 keV, con un microscopio a scansione elettronica EVO 50 Series Instrument (LEO ZEISS), equipaggiato con una sonda per microanalisi INCAEnergy 350 EDS e INCASmartMap (Oxford Instruments Analytical).

BIBLIOGRAFIA

- [1] M.M. Lohrengel, C. Rosenkranz, I. Kluppel, A. Moehring, H. Bettermann, B. Van den Bossche, J. Deconinck, *Electrochim. Acta* 2004, 49, 2863.
- [2] I.L. de Mattos, L. Gorton, T. Ruzgas, A.A. Karyakin, *Anal. Sci.* 2000, 16, 795.
- [3] M. Maciejewska, D. Schäfer, W. Schuhmann, *Electrochem. Commun.* 2006, 8, 1119.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. PRESTAZIONI ELETTROCATALITICHE DI ESACIANOFERRATI PURI E MISTI DI Cu E Pd PER LA RIDUZIONE DEL PEROSSIDO DI IDROGENO

In letteratura sono riportate le buone proprietà elettrocatalitiche mostrate dall'esacianoferrato di palladio (PdHCF) per l'ossidazione di acido ascorbico [1], dopamina [2] e idrazina [3]. Sulla base di questi promettenti risultati, si è pensato di verificare le prestazioni di questo esacianoferrato come potenziale catalizzatore per la riduzione di H₂O₂.

4.1.1. ELETTRODI MODIFICATI CON ESACIANOFERRATO DI Pd (PdHCF)

4.1.1.1. Deposizione

Film sottili di PdHCF sono stati depositati elettrochimicamente, per via potenziodinamica, su superfici elettrodiche di carbone vetroso, a partire da soluzioni diluite contenenti ioni Pd²⁺ e Fe(CN)₆³⁻. È plausibile che il meccanismo di precipitazione dell'esacianoferrato sia simile a quello ipotizzato per la formazione di NiHCF: durante ogni scansione di potenziale in direzione catodica, gli ioni Fe^{III}(CN)₆³⁻ sono ridotti a Fe^{II}(CN)₆⁴⁻, e questi ultimi si combinano con i cationi Pd²⁺ per formare un precipitato [4-6].

Il voltammogramma registrato durante la deposizione (Figura 4.1) mostra che la cinetica di crescita del film è molto lenta: nei primi cicli, i picchi relativi alla coppia redox Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ (anioni liberi in soluzione) sono ancora visibili, indicando che la reazione dell'anione ferrocianuro con il catione Pd²⁺ avviene con una certa difficoltà. All'aumento dello spessore del film depositato corrisponde un incremento di corrente per una coppia di picchi situati a circa +0.7 V vs. SCE.

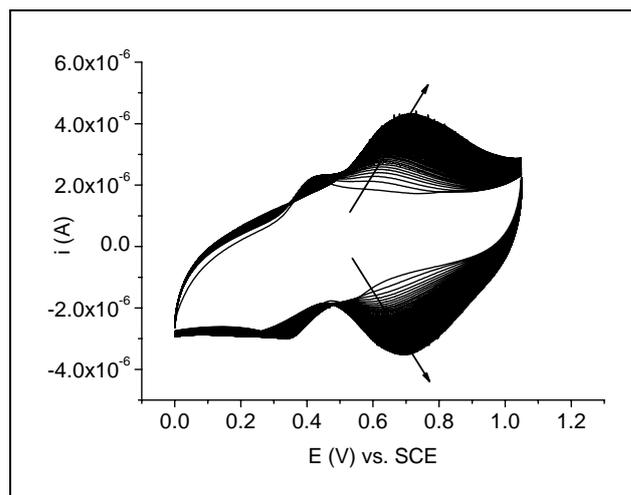


Figura 4.1 – CV di deposizione di PdHCF su GC, 100 cicli a 50 mV/s. Soluzione contenente PdCl₂ 0.065 mM, K₃Fe(CN)₆ 0.05 mM, KCl 0.1 M e HCl 0.1 M.

4.1.1.2. Caratterizzazione elettrochimica

La caratterizzazione elettrochimica mediante CV dell'elettrodo modificato (Figura 4.2), in soluzione di elettrolita di supporto, rivela la presenza di un'unica coppia di picchi, molto allargati, a circa +0.7 V vs. SCE. Poichè ci si attende che Pd²⁺ non sia elettroattivo nell'intervallo di potenziale 0.0 – 1.0 V [7,8], in modo simile a quanto avviene per Ni²⁺ [9], i picchi osservati sono attribuibili al comportamento redox reversibile della coppia Fe(III)/Fe(II) dell'anione esacianoferrato strutturale nel film. Il processo redox può essere così rappresentato [2]:

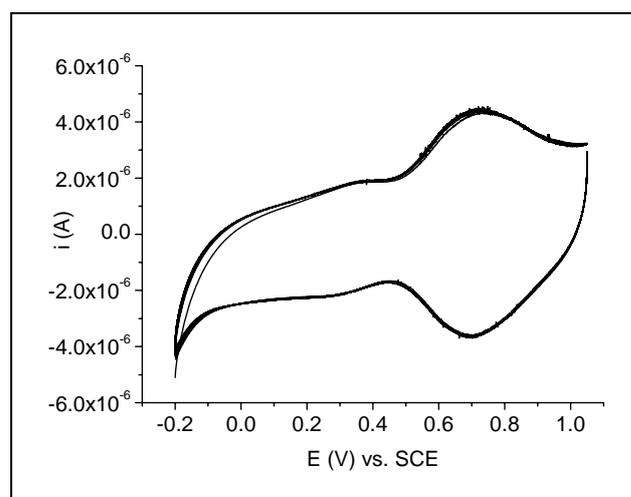
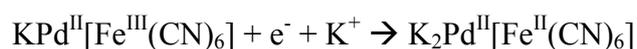


Figura 4.2 – CV di caratterizzazione di PdHCF in KCl 0.1 M + HCl 0.1 M. 5 cicli, 50 mV/s.

4.1.1.3. Prestazioni elettrocatalitiche

Per studiare l'attività elettrocatalitica di film sottili di PdHCF su GC per la riduzione di H₂O₂, sono state condotte prove cronoamperometriche a diversi potenziali, compresi nell'intervallo +0.2 – -0.2 V vs. SCE. I risultati ottenuti non sono stati soddisfacenti: alcune prove a 0.0 V e -0.1 V hanno fornito una piccola risposta, con valori di sensibilità scarsamente riproducibili, in altre prove il responso è stato completamente assente.

Temendo che la bassa sensibilità di risposta fosse attribuibile alla scarsità di materiale elettroattivo depositato sull'elettrodo, considerando la bassa velocità di crescita del film, sono state condotte ulteriori prove su film depositati con un numero di cicli voltammetrici molto più alto, fra 500 e 1000. I risultati non sono stati molto diversi.

Per cercare di comprendere le ragioni della scarsa riproducibilità, i film più spessi sono stati sottoposti ad analisi di dispersione a raggi X (EDX), per verificarne la composizione elementare superficiale. I risultati ottenuti hanno mostrato che i film di PdHCF che avevano fornito una risposta cronoamperometrica ad H₂O₂ contenevano, oltre a Pd e Fe, attesi, anche tracce di Cu. Un esempio di composizione elementare è riportato in Tabella 2.

Elemento	% atomica
<i>Pd</i>	45.3
<i>Fe</i>	41.0
<i>Cu</i>	1.6

Tabella 2 – Composizione elementare di un film di PdHCF, depositato per via potenziodinamica, contenente tracce di Cu.

Probabilmente queste tracce di Cu provenivano da un inquinamento accidentale della soluzione, oppure dalla parziale dissoluzione, provocata dalla soluzione acida impiegata per le misure, del filo di Cu usato per realizzare il contatto elettrico all'interno degli elettrodi di GC fabbricati artigianalmente (vedi sezione *Parte Sperimentale*).

Sapendo che l'esacianoferrato di rame, CuHCF, è in grado di ridurre H₂O₂ [10,11], si è ipotizzato che, quando osservata in film di PdHCF, probabilmente "contaminati" con tracce di Cu, l'elettrocatalisi fosse attribuibile alla coppia Cu(II)/Cu(I). Per verificare l'ipotesi, si è depositato un film di PdHCF da una soluzione

contenente una frazione molare di Cu^{2+} ($x_{\text{Cu,sol}}$) pari a 0.05, con $x_{\text{Cu,sol}} = \frac{n_{\text{Cu}}}{n_{\text{Cu}} + n_{\text{Pd}}}$ (n =numero di moli). Come atteso, a 0.0 V vs. SCE si è osservato un responso cronoamperometrico ben definito, con una sensibilità di risposta, valutata dalla pendenza della corrispondente curva di calibrazione, come descritto nella sezione *Parte Sperimentale*, pari a $8.8 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ (Figura 4.3):

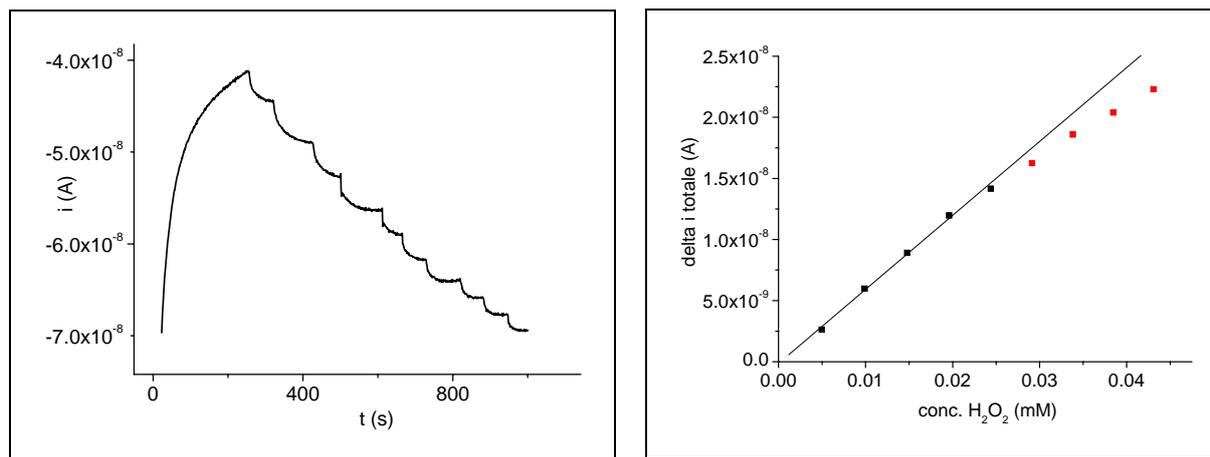


Figura 4.3 – Sinistra: responso cronoamperometrico di PdHCF con $x_{\text{Cu,sol}} = 0.05$; destra: curva di calibrazione relativa al responso cronoamperometrico.

Si può concludere che PdHCF non costituisce un materiale promettente per la modifica di elettrodi nella progettazione di sensori per H_2O_2 , innanzitutto perchè la deposizione di film su materiali elettrodici, quale il carbone vetroso, è troppo lenta per essere sfruttata in applicazioni pratiche, ma soprattutto perchè non è in grado di esercitare una soddisfacente attività elettrocatalitica.

4.1.2. ELETTRODI MODIFICATI CON ESACIANOFERRATI MISTI DI Cu E Pd (CuPdHCF) E CONFRONTO CON ESACIANOFERRATO DI Cu (CuHCF)

La scoperta che l'inserimento di ioni Cu^{2+} in film di PdHCF è in grado di promuovere elettrocatalisi in film di PdHCF inattivi ha suggerito di rivolgere l'attenzione allo studio delle prestazioni di esacianoferrati misti di Cu e Pd (CuPdHCF). Le prestazioni sono state confrontate con quelle di elettrodi modificati con CuHCF puro, uno degli esacianoferrati più noti e maggiormente descritti in letteratura per la sua attività elettrocatalitica verso la riduzione di H_2O_2 , in modo da evidenziare le eventuali

differenze fra il comportamento di esacianoferrati misti così costituiti e quello dei corrispondenti esacianoferrati “puri” (singolo metallo).

4.1.2.1. Deposizione

La deposizione di esacianoferrati misti su superfici elettrodiche di GC è stata condotta potenziodinamicamente. Sono state prese in esame diverse composizioni della soluzione di deposizione: i valori di frazione molare di Cu, $x_{\text{Cu,sol}}$, presi in considerazione sono compresi nell'intervallo 0.1 – 0.8. Rispetto a quanto osservato per i film di PdHCF, la deposizione di esacianoferrati misti procede più rapidamente, tanto più quanto maggiore è la frazione molare di Cu, indice del fatto che la cinetica della reazione fra ioni $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ e ioni Cu^{2+} è più veloce che con ioni Pd^{2+} . Questa ipotesi è stata confermata da semplici esperimenti di precipitazione, condotti con soluzioni dei reagenti molto più concentrate, che hanno evidenziato una precipitazione praticamente istantanea; un comportamento simile è stato riportato in letteratura per esacianoferrati misti di Ni e Pd (NiPdHCF), confrontati con PdHCF [9]. In Figura 4.4 è riportato, come esempio, il voltammogramma di deposizione di CuPdHCF con $x_{\text{Cu,sol}} = 0.5$. Si può osservare che, a parità di numero di cicli voltammetrici, la corrente di picco aumenta più velocemente, rispetto al caso di PdHCF, e i picchi appaiono meno allargati. Questo comportamento è sempre più accentuato all'aumentare del contenuto di Cu nel film; nel caso estremo, costituito da CuHCF puro, i picchi sono molto stretti e le correnti aumentano ancora più velocemente ad ogni ciclo di deposizione (Figura 4.5).

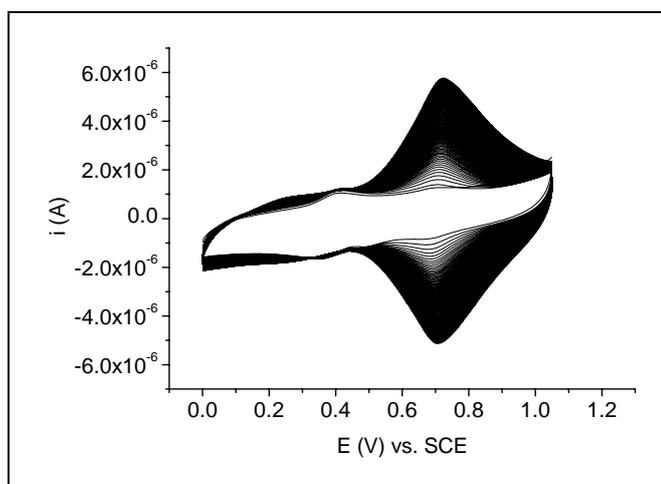


Figura 4.4 – CV di deposizione di CuPdHCF ($x_{\text{Cu,sol}} = 0.5$) su GC, 100 cicli a 50 mV/s; soluzione contenente PdCl_2 0.065 mM, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.05 mM, KCl 0.1 M e HCl 0.1 M.

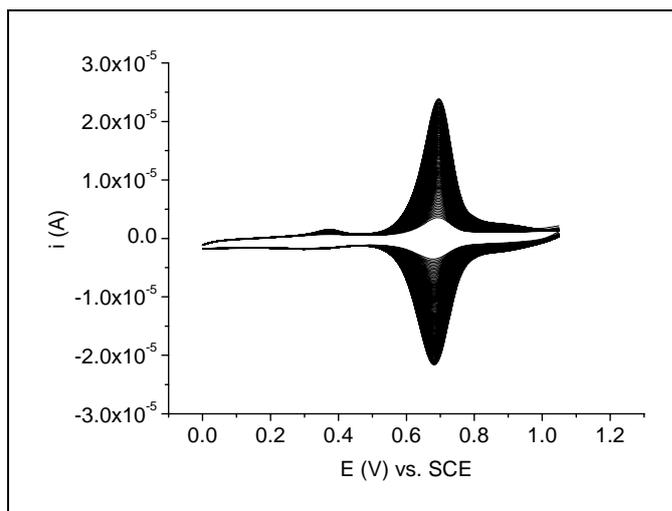


Figura 4.5 – CV di deposizione di CuHCF su GC, 100 cicli a 50 mV/s; soluzione contenente CuCl_2 0.065 mM, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.05 mM, KCl 0.1 M e HCl 0.1 M.

4.1.2.2. Caratterizzazione elettrochimica

Si riporta di seguito la caratterizzazione elettrochimica, condotta mediante CV in elettrolita di supporto (KCl+HCl), di film di CuPdHCF (con varie composizioni) e, per confronto, di CuHCF e di PdHCF. In tutti i casi, è chiaramente visibile la coppia di picchi già osservati per PdHCF, a circa +0.7 V vs. SCE: all'aumentare della frazione di Cu, da 0 (PdHCF) a 1 (CuHCF), i picchi diventano sempre più stretti e si spostano verso potenziali meno positivi (Figure 4.6, 4.7).

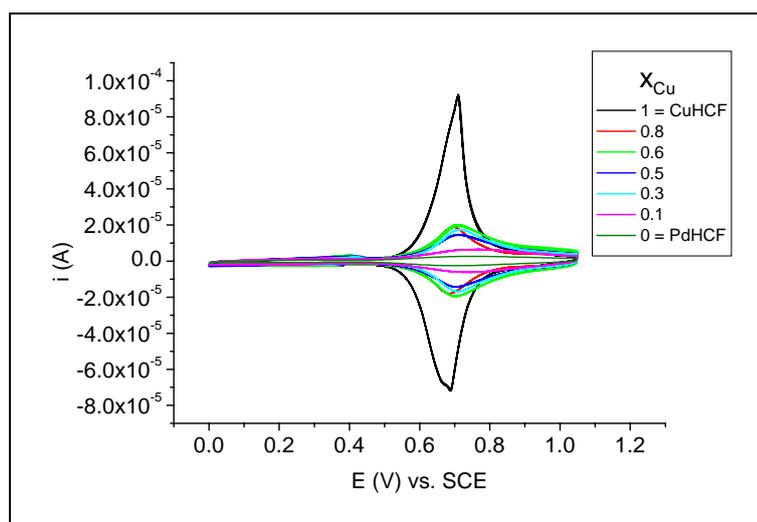


Figura 4.6 - Confronto fra CV di caratterizzazione di CuHCF, PdHCF e CuPdHCF con diverse composizioni, a 50 mV/s, in soluzione di KCl 0.1 M + HCl 0.1 M.

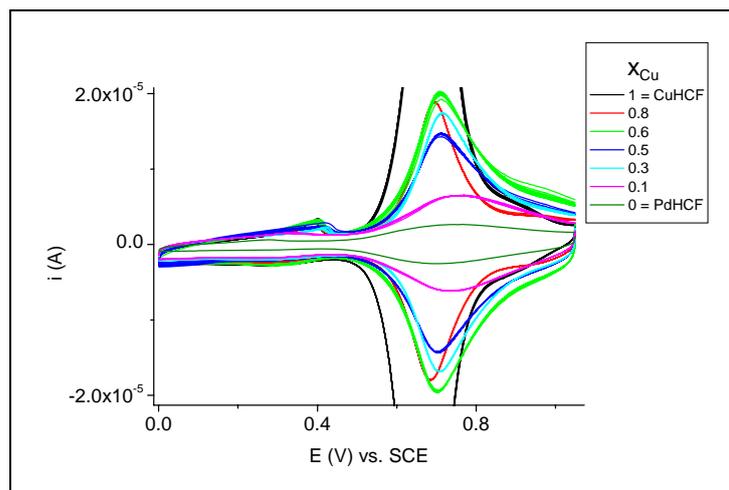
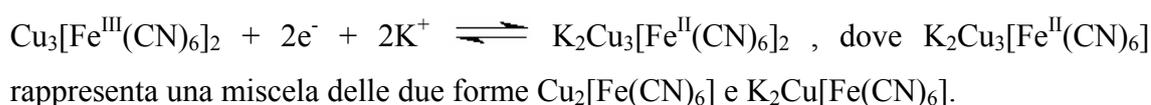
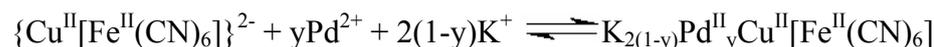


Figura 4.7 – Ingrandimento dei voltammogrammi riportati nel grafico di Figura 4.6.

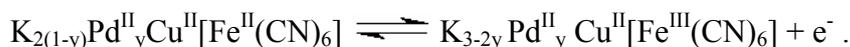
Per quanto riguarda CuHCF, si può ipotizzare che il processo redox associato alla coppia di picchi a circa +0.7 V sia descritto dalla seguente reazione, in cui solo il Fe è elettrochimicamente attivo [12,13]:



Nel caso degli esacianoferrati misti, si può ipotizzare un comportamento simile a quello proposto da Kulesza et al. [9] per gli esacianoferrati misti di Ni e Pd, e pensare che, in fase di deposizione, sia avvenuta l'incorporazione di ioni Pd^{2+} nella struttura di CuHCF, secondo una reazione del tipo:



Come per CuHCF, l'attività elettrochimica del composto, associata alla coppia di picchi a +0.7 V, potrebbe essere attribuita al Fe, secondo un processo redox del tipo:



L'andamento del potenziale formale, $E_{1/2}$, della coppia Fe(III)/Fe(II), calcolato come semisomma dei potenziali di picco anodico e catodico, in funzione di $x_{\text{Cu,sol}}$ è riportato in grafico (Figura 4.8), ipotizzando che la composizione del film elettrodepositato non si discosti molto da quella della soluzione. La variazione di $E_{1/2}$ dovrebbe riflettere i cambiamenti di intorno chimico degli ioni ferro, e quindi sarebbe la prova della formazione di un nuovo composto, per inserimento di Cu^{2+} nella struttura del preesistente PdHCF.

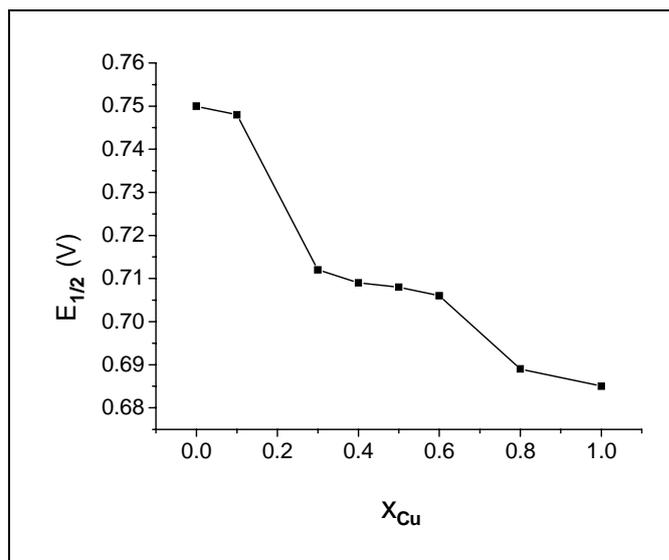


Figura 4.8 – Andamento dei valori di $E_{1/2}$, ricavati da voltammogrammi di caratterizzazione, in funzione della composizione, per diversi CuPdHCF.

La differenza fra i voltammogrammi di caratterizzazione di film con diversa composizione è ancora più evidente se le voltammetrie sono registrate in PBS, invece che in KCl, anche se la causa di tale differenza dei responsi, nei due elettroliti, non è chiara (Figura 4.9). Il fatto che i responsi voltammetrici abbiano caratteristiche uniche e non derivino dalla combinazione delle CV relative a CuHCF e PdHCF sembra confermare che i composti ottenuti non siano semplici miscele degli HCF puri, ma nuove fasi in cui sia Cu sia Pd sono coordinati ad atomi di N. La formazione di una fase mista di esacianoferrato in presenza di cationi di due diversi metalli di transizione è possibile quando gli esacianoferrati dei singoli metalli hanno reticoli cristallini con la stessa simmetria e quando i raggi ionici dei metalli sono simili tra loro. Poichè Kulesza [9] ha riportato la probabile formazione di un esacianoferrato misto di Ni e Pd, i cui raggi ionici sono, rispettivamente, pari a 0.72 e 0.86 Å, è possibile anche la formazione di una fase mista con Cu e Pd, visto che Cu^{2+} ha il medesimo raggio ionico di Ni^{2+} [14].

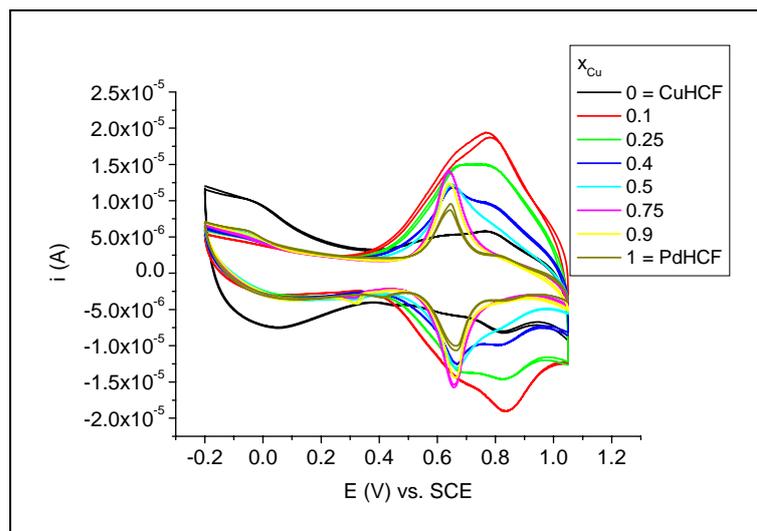
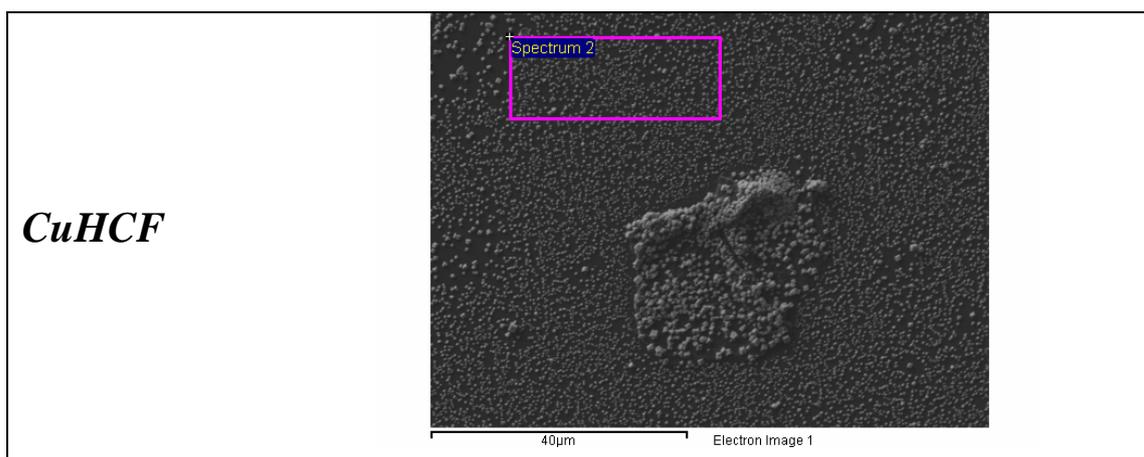


Figura 4.9 - Confronto fra CV di caratterizzazione di CuHCF, PdHCF e CuPdHCF con diverse composizioni, a 50 mV/s, in soluzione PBS 0.1 M, pH 5.5.

4.1.2.3. Caratterizzazione SEM/EDX

Film di CuHCF e di CuPdHCF, depositati da soluzioni con valori di $x_{Cu,sol}$ pari a 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 e 0.7, sono stati caratterizzati mediante microscopia a scansione elettronica (SEM).

Come si può osservare dalle scansioni riportate in Figura 4.10, relative ad alcune composizioni esaminate, i film sottili depositati ricoprono in modo uniforme la superficie elettrodica, ma in alcuni punti tendono a formarsi aggregati di materiale più spessi.



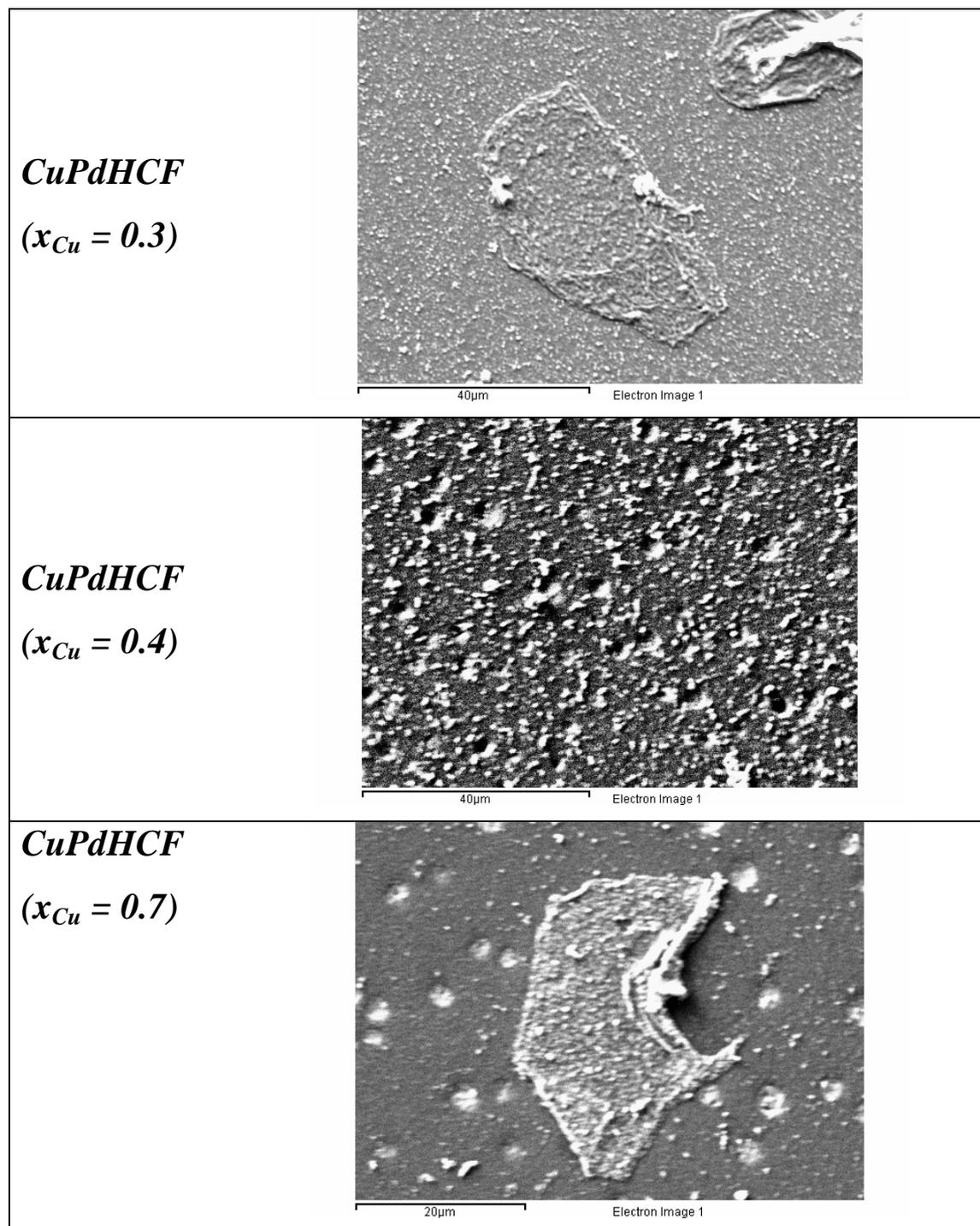


Figura 4.10 – Immagini SEM di film sottili di esacianoferrati di Cu e Pd, depositati su superfici di GC.

La composizione superficiale è stata studiata sottoponendo i film ad analisi EDX. Le percentuali atomiche degli elementi costitutivi principali degli esacianoferrati presi in esame, cioè K, Cu, Pd e Fe, sono riportate nelle Tabelle (3-8) sottostanti: le righe di ciascuna tabella contengono set di dati relativi a diversi punti della superficie analizzati.

CuHCF	ELEMENTO			
% ATOMICA	<i>K</i>	<i>Cu</i>	<i>Fe</i>	$\frac{\%Cu}{\%Fe}$
	-	21.43	20.10	1.07
	5.01	6.55	7.10	0.92
	3.78	5.48	5.89	0.93
	0.34	1.18	1.21	0.97
	0.38	0.76	0.75	1.01

Tabella 3 – Analisi EDX di un film di CuHCF depositato su GC.

CuPdHCF ($x_{Cu} = 0.3$)	ELEMENTO						
% ATOMICA	<i>K</i>	<i>Cu</i>	<i>Pd</i>	<i>Fe</i>	$\frac{\%Cu}{\%Cu + \%Pd}$	$\frac{\%Pd}{\%Cu + \%Pd}$	$\frac{\%Cu + \%Pd}{\%Fe}$
	n.d.	2.68	5.58	7.46	0.32	0.68	1.11
	n.d.	2.09	2.73	6.91	0.43	0.57	0.70
	1.84	0.27	0.54	0.58	0.33	0.67	1.40
	2.31	0.24	0.75	0.66	0.24	0.76	1.50
	2.20	0.30	0.68	0.70	0.31	0.69	1.40

Tabella 4 – Analisi EDX di un film di CuPdHCF ($x_{Cu}=0.3$) depositato su GC.

CuPdHCF ($x_{Cu} = 0.4$)	ELEMENTO						
% ATOMICA	<i>K</i>	<i>Cu</i>	<i>Pd</i>	<i>Fe</i>	$\frac{\%Cu}{\%Cu + \%Pd}$	$\frac{\%Pd}{\%Cu + \%Pd}$	$\frac{\%Cu + \%Pd}{\%Fe}$
	0.56	0.39	0.64	0.78	0.38	0.62	1.32
	0.76	0.89	1.58	1.77	0.36	0.64	1.40
	0.46	0.37	0.53	0.85	0.41	0.59	1.06
	0.32	0.36	0.58	0.72	0.38	0.62	1.30

Tabella 5 – Analisi EDX di un film di CuPdHCF ($x_{Cu}=0.4$) depositato su GC.

CuPdHCF ($x_{Cu} = 0.5$)	ELEMENTO						
% ATOMICA	<i>K</i>	<i>Cu</i>	<i>Pd</i>	<i>Fe</i>	$\frac{\%Cu}{\%Cu + \%Pd}$	$\frac{\%Pd}{\%Cu + \%Pd}$	$\frac{\%Cu + \%Pd}{\%Fe}$
	0.48	0.63	0.72	0.93	0.47	0.53	1.45
	0.58	0.63	0.52	0.91	0.55	0.45	1.26
	0.28	0.47	0.52	0.97	0.47	0.53	1.02
	0.56	0.42	0.52	0.69	0.45	0.55	1.36

Tabella 6 – Analisi EDX di un film di CuPdHCF ($x_{Cu}=0.5$) depositato su GC.

CuPdHCF ($x_{Cu} = 0.6$)	ELEMENTO						
% ATOMICA	<i>K</i>	<i>Cu</i>	<i>Pd</i>	<i>Fe</i>	$\frac{\%Cu}{\%Cu + \%Pd}$	$\frac{\%Pd}{\%Cu + \%Pd}$	$\frac{\%Cu + \%Pd}{\%Fe}$
	2.17	1.74	0.97	2.35	0.64	0.36	1.15
	2.08	2.07	0.74	2.56	0.74	0.26	1.10
	2.59	1.87	1.07	2.55	0.64	0.36	1.15
	2.18	1.85	0.83	2.35	0.69	0.31	1.14

Tabella 7 – Analisi EDX di un film di CuPdHCF ($x_{Cu}=0.6$) depositato su GC.

CuPdHCF ($x_{Cu} = 0.7$)	ELEMENTO						
% ATOMICA	<i>K</i>	<i>Cu</i>	<i>Pd</i>	<i>Fe</i>	$\frac{\%Cu}{\%Cu + \%Pd}$	$\frac{\%Pd}{\%Cu + \%Pd}$	$\frac{\%Cu + \%Pd}{\%Fe}$
	n.d.	11.92	2.76	12.05	0.81	0.19	1.22
	18.26	27.12	5.67	27.13	0.83	0.17	1.21
	22.21	25.66	5.11	27.64	0.83	0.17	1.11
	13.66	17.36	4.61	23.17	0.79	0.21	0.95

Tabella 8 – Analisi EDX di un film di CuPdHCF ($x_{Cu}=0.7$) depositato su GC.

Per quanto riguarda i film di CuPdHCF, l'analisi EDX consente di ricavare, per ogni valore di $x_{\text{Cu,sol}}$ studiato, un corrispondente valore medio di $x_{\text{Cu,film}}$, ottenibile come media dei dati $\frac{\% \text{Cu}}{\% \text{Cu} + \% \text{Pd}}$, calcolati per ciascuna analisi effettuata sul film. Ponendo in grafico $x_{\text{Cu,film}}$ in funzione di $x_{\text{Cu,sol}}$, si osserva (Figura 4.11) che la composizione media del film rispecchia quella della soluzione ($x_{\text{Cu,film}} = x_{\text{Cu,sol}}$) per valori di $x_{\text{Cu,sol}}$ inferiori o uguali a 0.5. Per valori superiori, si verifica un arricchimento del film in Cu ($x_{\text{Cu,film}} > x_{\text{Cu,sol}}$), che confermerebbe, come suggerito precedentemente, che la reazione di Cu^{2+} con il ferrocianuro è più veloce di quella di Pd^{2+} . Si osserva, inoltre, che la frazione $\frac{\% \text{Cu} + \% \text{Pd}}{\% \text{Fe}}$ assume quasi sempre valori maggiori di 1: questa composizione (metallo strutturale in quantità superiore al Fe) rientra nell'intervallo di stabilità della struttura "insolubile" di un esacianoferrato, in cui sono presenti vacanze di $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ [15].

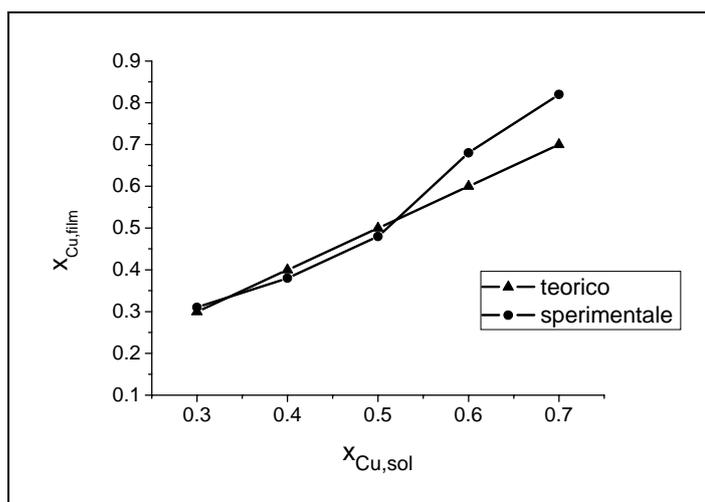


Figura 4.11 – Composizione di film di CuPdHCF ($x_{\text{Cu,film}}$), determinata con misure SEM, in funzione della composizione della soluzione di elettrosintesi ($x_{\text{Cu,sol}}$).

4.1.2.4. Prestazioni elettrocatalitiche

Le prestazioni elettrocatalitiche di film di CuPdHCF con differenti composizioni verso la riduzione di H_2O_2 sono state valutate mediante cronoamperometria, e confrontate con quelle di elettrodi modificati con CuHCF.

Per selezionare il potenziale di lavoro ottimale, sono state condotte prove cronoamperometriche qualitative di risposta ad H_2O_2 a potenziali diversi, compresi nell'intervallo +0.2 – -0.2 V vs. SCE, impiegando un elettrodo modificato con CuHCF, preso come modello. Sono state effettuate solo poche aggiunte di analita, sufficienti per

valutare le prestazioni analitiche. Dal confronto dei cronoamperogrammi registrati, riportato in Figura 4.12, si è scelto un potenziale di lavoro pari a 0.0 V, perchè garantisce la più alta sensibilità di risposta.

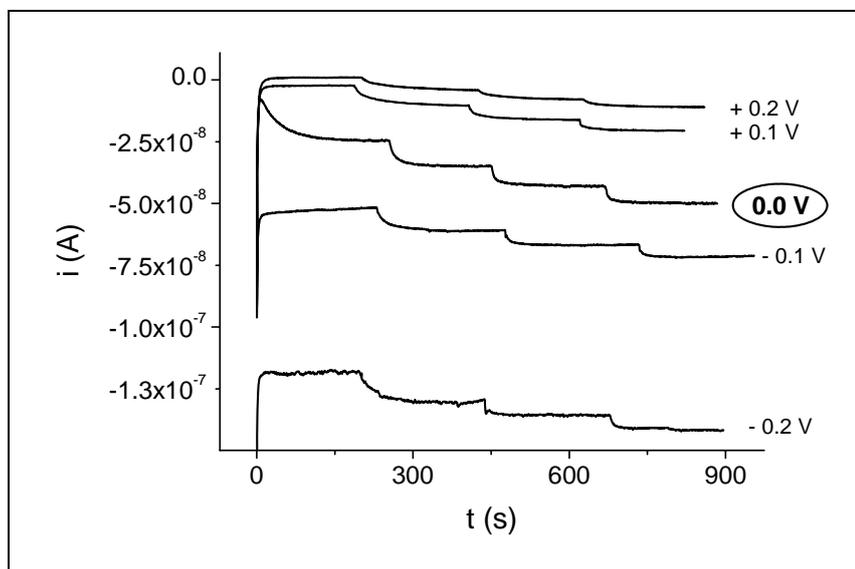


Figura 4.12 – Confronto dei responsi cronoamperometrici di un elettrodo CuHCF/GC, per diversi potenziali di lavoro applicati. Aggiunte da 30 μ L di H_2O_2 0.01 M a 20 mL di PBS 0.1 M, pH 5.5.

A questo punto, sono stati testati elettrodi modificati con esacianoferrati misti CuPdHCF e con CuHCF. Gli esacianoferrati misti hanno fornito responsi cronoamperometrici più definiti e stabili di quelli tipici dell'esacianoferrato di rame. Di seguito si riporta (Figura 4.13) un confronto fra due determinazioni, una effettuata con un elettrodo modificato con CuHCF, l'altra con uno modificato con un esacianoferrato misto CuPdHCF con $x_{Cu} = 0.4$, preso come esempio.

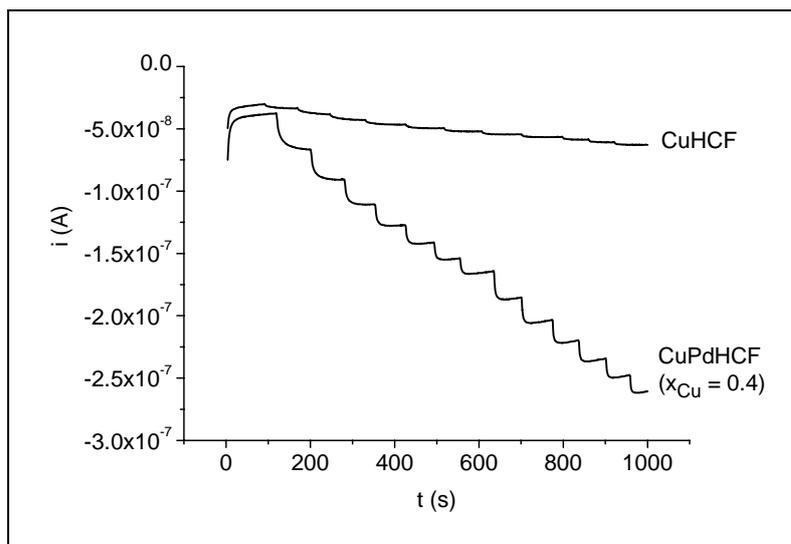


Figura 4.13 – Confronto fra i responsi cronoamperometrici di film di CuHCF e CuPdHCF ($x_{Cu} = 0.4$), depositati su GC, a 0.0 V vs. SCE. Aggiunte effettuate: 7 da $100 \mu\text{L}$ + 6 da $200 \mu\text{L}$ di H_2O_2 0.001 M, in 20 mL di soluzione PBS 0.1 M a pH 5.5 .

Risulta subito evidente che la sensibilità di risposta ottenuta con l'esacianoferrato misto è più alta di quella raggiunta con CuHCF. Questo comportamento è stato in generale riscontrato per i film di CuPdHCF nel range di composizioni in cui $x_{Cu, \text{film}}$ assume valori compresi tra 0.3 e 0.8 , e rappresenta un risultato di notevole importanza dal punto di vista analitico. Il grafico (Figura 4.14) mostra che le prestazioni dell'elettrodo verso la riduzione di H_2O_2 a 0.0 V risultano ottimali quando il film contiene Cu e Pd in percentuali uguali, cioè per un valore di $x_{Cu, \text{film}}$ pari a 0.5 .

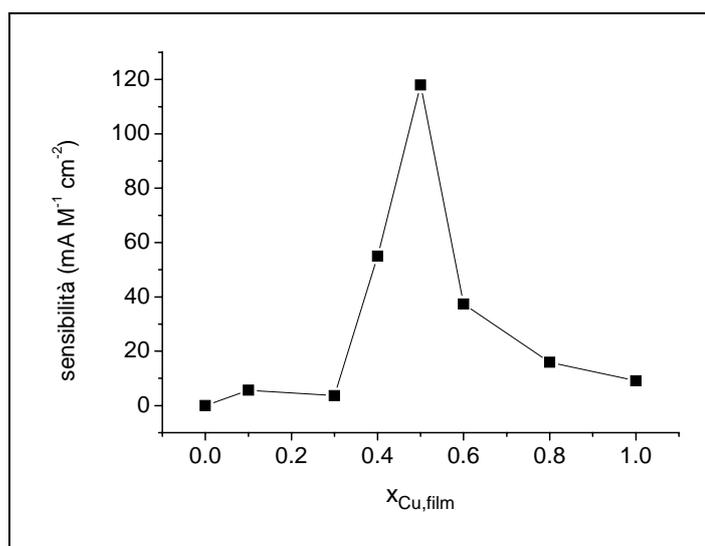


Figura 4.14 – Grafico della sensibilità di risposta vs. composizione del film ($x_{Cu, \text{film}}$) per determinazioni cronoamperometriche di H_2O_2 (a 0.0 V vs. SCE, in PBS 0.1 M, pH 5.5), effettuate con elettrodi modificati con film di CuPdHCF. I dati relativi alle prestazioni di CuHCF e PdHCF sono riportati per confronto.

Sia per i film di CuHCF sia per quelli di CuPdHCF, i limiti di rivelabilità (L.O.D.) calcolati sono compresi fra 2 e 3 μM , mentre il limite di linearità risulta circa pari a 30 μM , anche se il range di risposta dinamico si estende a concentrazioni più alte.

Ricordando che PdHCF non è in grado di promuovere attività elettrocatalitica verso la riduzione di H_2O_2 e osservando che le prestazioni degli esacianoferrati misti CuPdHCF sono migliori di quelle dell'esacianoferrato CuHCF, si può concludere che il Cu rivesta un ruolo chiave nel meccanismo elettrocatalitico, ma il Pd faciliti il trasferimento elettronico nel film. La presenza di entrambi i metalli nella struttura del composto conduce ad un sensibile miglioramento delle prestazioni degli elettrodi modificati.

4.1.3. EVIDENZE SPERIMENTALI DEL RUOLO CHIAVE DI Cu NELL'ATTIVITÀ ELETTROCATALITICA

4.1.3.1. Comportamento elettrochimico di CuHCF

L'attività elettrocatalitica di CuHCF è stata valutata a diversi potenziali. Tenendo presente il responso voltammetrico, in elettrolita di supporto contenente ioni K^+ , di film sottili di CuHCF depositati su elettrodi di GC (Figura 4.15), si sono svolte prove cronoamperometriche a diversi potenziali, a partire da +0.5 V. Se l'attività elettrocatalitica fosse promossa dagli ioni Fe, la riduzione di H_2O_2 decorrerebbe alla medesima velocità a potenziali inferiori o uguali a +0.5 V, quando nel film di esacianoferrato gli ioni ferro sono nello stato di ossidazione +2.

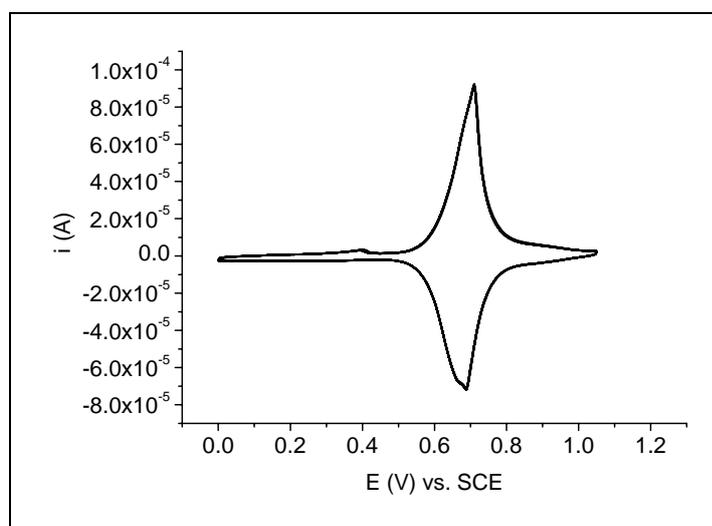


Figura 4.15 – CV di caratterizzazione di CuHCF in KCl 0.1 M + HCl 0.1 M. 5 cicli, 50 mV/s.

In realtà, non si è osservato alcun responso per potenziali compresi fra +0.5 e +0.1 V vs. SCE, risultato che dimostra che il Fe non è coinvolto nella elettrocatalisi. Si è invece ottenuto un responso a potenziali compresi fra +0.1 e -0.2 V (non si sono testati valori di potenziale più catodici), con sensibilità di risposta diverse fra loro: molto bassa a +0.1 V, più alta per potenziali applicati più negativi, ancora maggiore, e confrontabile, a potenziali pari a -0.1 e -0.2 V vs. SCE. Le curve di calibrazione, costruite per i diversi potenziali applicati, sono riportate in Figura 4.16.

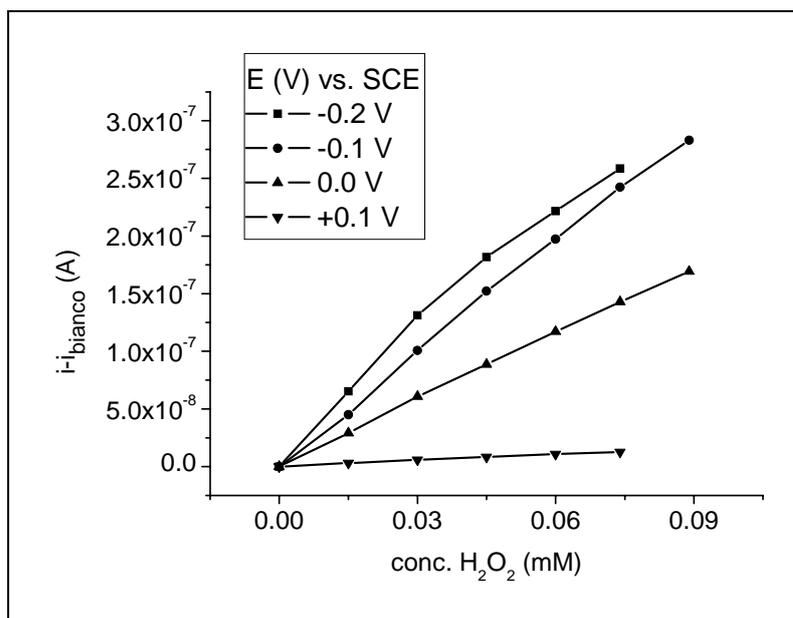


Figura 4.16 – Curve di calibrazione relative a responsi cronoamperometrici registrati con un elettrodo GC/CuHCF a diversi potenziali di lavoro.

Questo risultato può essere motivato in due modi: o durante la procedura di elettrodeposizione si verifica la contemporanea formazione di PB, che giustificherebbero la presenza di attività a 0.0 V [16,17], oppure a potenziali fra 0.0 e -0.1 V sono presenti centri attivi ridotti in grado di promuovere la riduzione di H₂O₂. Alcuni lavori di letteratura [18-20] riportano l'osservazione, in determinate condizioni sperimentali, di picchi redox attribuibili alla coppia Cu(II)/Cu(I): si ritiene che essi siano originati da processi complessi, coinvolgenti gli ioni Cu localizzati nelle cavità interstiziali, e accompagnati da riorganizzazione strutturale, poichè la separazione fra i potenziali di picco è consistente (superiore a 300 mV). Si sono ricercati, nell'intervallo di potenziali di interesse, picchi compatibili con quelli descritti in letteratura, effettuando un ingrandimento del voltammogramma di caratterizzazione di CuHCF.

L'ingrandimento (Figura 4.17) mostra chiaramente un picco di ossidazione a circa +0.35 V vs. SCE, ma il picco corrispondente di riduzione non è visibile. Il motivo di questa assenza potrebbe essere ricercato nella scarsità di ioni Cu^{2+} nelle cavità interstiziali, se il metodo di deposizione per via potenziodinamica favorisce l'intercalazione di ioni K^+ , oppure da un processo redox "interno" fra gli ioni Fe(II) e Cu(II) , favorito dalla linearità delle catene $\text{Fe-C}\equiv\text{N-Cu}$.

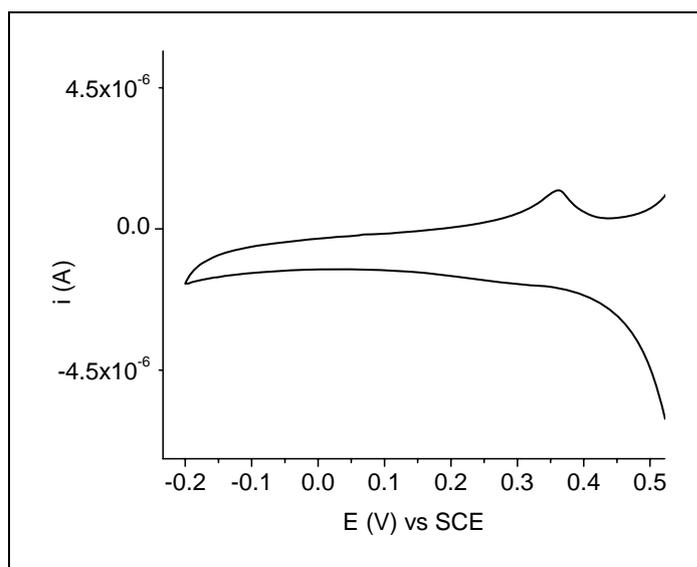


Figura 4.17 - Ingrandimento di una CV di caratterizzazione di CuHCF in KCl 0.1 M + HCl 0.1 M, a 50 mV/s.

Diversamente, depositando su un elettrodo di GC una sospensione di CuHCF sintetizzato chimicamente, si è ottenuto un voltammogramma di caratterizzazione di aspetto differente. La Figura 4.18, che riporta un ingrandimento della zona di interesse, mostra una coppia di picchi molto allargati non evidenziati in precedenza, dei quali quello di ossidazione è centrato attorno a +0.3 V, quello di riduzione tra +0.1 e 0.0 V vs. SCE. Questa differenza di comportamento elettrochimico fra esacianoferrati depositati in modi diversi è stata già riportata in letteratura [18].

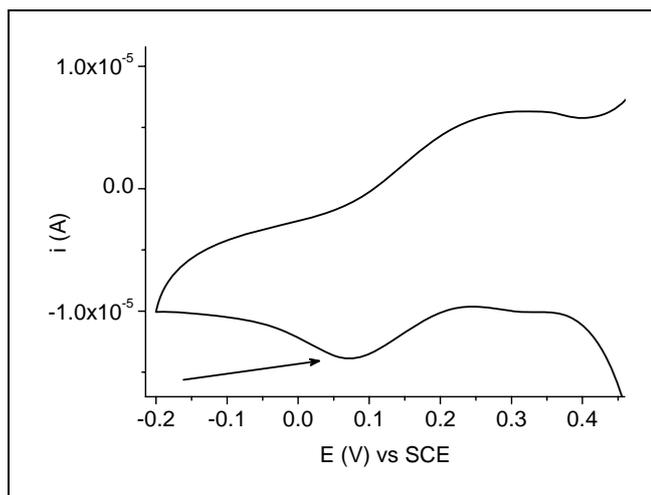


Figura 4.18 - Ingrandimento di una CV di caratterizzazione di CuHCF, sintetizzato chimicamente, depositato su GC.

La posizione del picco di riduzione, quando visibile, è in accordo con le sensibilità osservate nelle calibrazioni di Figura 4.16: i valori di sensibilità maggiori si ottengono per potenziali applicati in cui la frazione di Cu(I) è più alta, se si attribuisce la coppia di picchi al sistema Cu(II)/Cu(I). Questo risultato dimostra che Cu è coinvolto nel meccanismo di elettrocatalisi.

4.1.3.2. Comportamento elettrochimico di CuHCF arricchito in Cu²⁺

Per verificare definitivamente il ruolo chiave di Cu nella elettrocatalisi, film di CuHCF depositati su GC sono stati arricchiti con ioni Cu²⁺ mediante una procedura di intercalazione per voltammetria a scansione lineare di potenziale (LSV) a bassa velocità, in direzione catodica. Una tipica scansione con cui si effettua l'intercalazione è mostrata in Figura 4.19. Come si può notare, ad un potenziale di circa +0.15 V vs. SCE si osserva la comparsa di un picco di riduzione, che si può attribuire al decorso dell'intercalazione di ioni Cu nelle cavità del materiale.

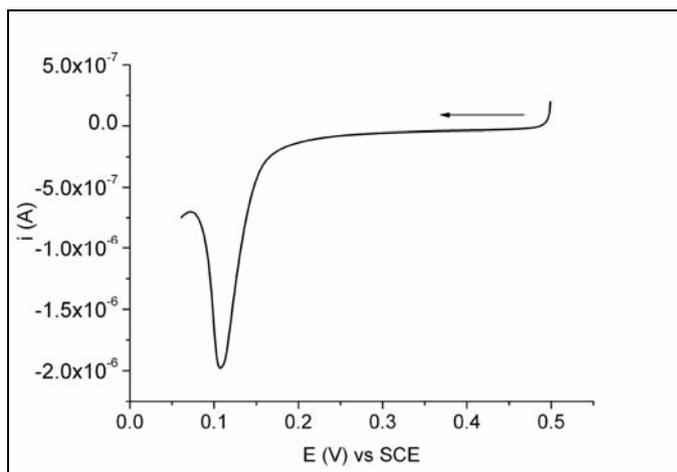


Figura 4.19 – LSV di intercalazione di Cu^{2+} all'interno di un film di CuHCF (depositato nelle condizioni indicate nella Parte Sperimentale, ma con 20 cicli a 20 mV/s) in soluzione contenente $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 4 mM in HNO_3 0.1 M, a 1 mV/s.

Dopo la procedura di intercalazione, gli elettrodi sono stati caratterizzati mediante voltammetria ciclica in elettrolita di supporto. Si è ottenuto un responso del tipo riportato in Figura 4.20.

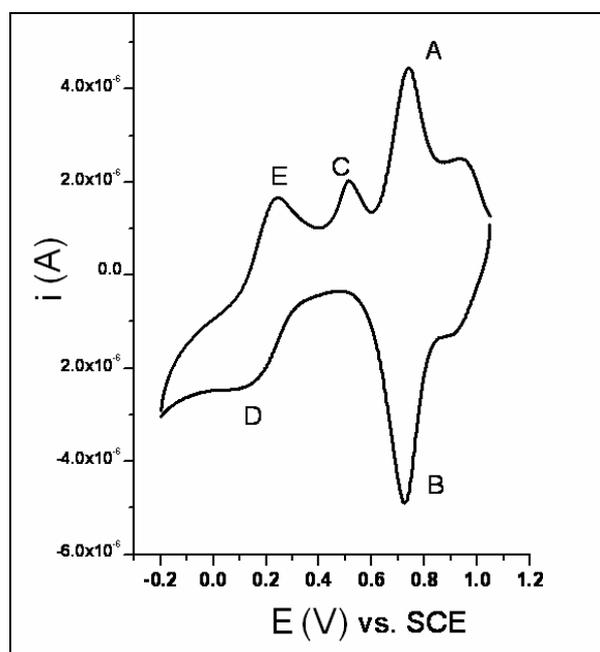


Figura 4.20 – CV di caratterizzazione di un elettrodo GC/CuHCF arricchito in ioni Cu^{2+} , in KCl 0.1 M + HCl 0.1 M, a 20 mV/s.

La CV mostra diversi picchi, alcuni dei quali già osservati per CuHCF (Figura 4.15): la coppia di picchi A-B, attribuiti all'attività redox degli ioni Fe strutturali, e il picco C. In aggiunta, compare un nuovo picco, indicato come E. Poiché il picco C è sempre visibile

in fase di caratterizzazione di CuHCF, è con tutta probabilità originato dagli ioni Cu^{2+} strutturali, ossia quelli coordinati agli atomi di azoto. Il picco E, che compare solo in seguito all'intercalazione, sarebbe invece attribuibile agli ioni Cu^{2+} intercalati, i quali occupano, probabilmente, posizioni interstiziali nel film. Il picco D, infine, è quasi sicuramente correlato a E, e sarebbe quindi originato dalla riduzione di ioni interstiziali [18]; non è stato possibile dimostrare se questo picco sia collegato o meno anche a C. È comunque interessante notare che il picco D era stato osservato in precedenza (Figura 4.18) solo in film di CuHCF depositati per via chimica, in cui l'intercalazione di ioni Cu^{2+} aveva modo di decorrere in misura maggiore, rispetto al caso della deposizione elettrochimica.

Il successo della procedura di intercalazione è stato verificato anche mediante analisi EDX. Si riportano in Tabella 9 i risultati di alcune prove effettuate. Confrontando i dati con quelli relativi al semplice CuHCF (Tabella 3), si può osservare che, in seguito all'intercalazione, nella quale gli ioni Cu^{2+} entrano nel film e sostituiscono gli ioni K^+ , la percentuale atomica di Cu aumenta, a fronte di una diminuzione della percentuale di K.

<i>CuHCF ricco in Cu^{2+}</i>	ELEMENTO			
	<i>K</i>	<i>Cu</i>	<i>Fe</i>	<i>Cu/Fe</i>
% ATOMICA	0.69	2.46	1.66	1.48
	0.30	2.27	1.98	1.15
	0.00	2.00	0.97	2.06

Tabella 9 – Analisi EDX di un film di CuHCF ricco in Cu^{2+} , depositato su GC.

L'attività elettrocatalitica degli elettrodi modificati con CuHCF, arricchito di Cu, è stata valutata mediante cronoamperometria, senza avere prima effettuata la loro caratterizzazione tramite CV in elettrolita contenente K^+ , che, altrimenti, avrebbe sostituito Cu^{2+} nelle cavità interstiziali, vanificando l'intercalazione.

Come si può osservare dal confronto dei cronoamperogrammi riportati in Figura 4.21, la sensibilità di risposta di CuHCF, ricco in Cu, risulta significativamente più alta di quella del semplice CuHCF: anche questo risultato conferma il ruolo chiave del Cu nella attività elettrocatalitica degli esacianoferrati studiati.

Le curve di calibrazione corrispondenti (Figura 4.22) evidenziano come, oltre ad una aumentata sensibilità di risposta, gli elettrodi modificati con CuHCF, arricchiti in Cu, conducano ad una estensione del range di linearità.

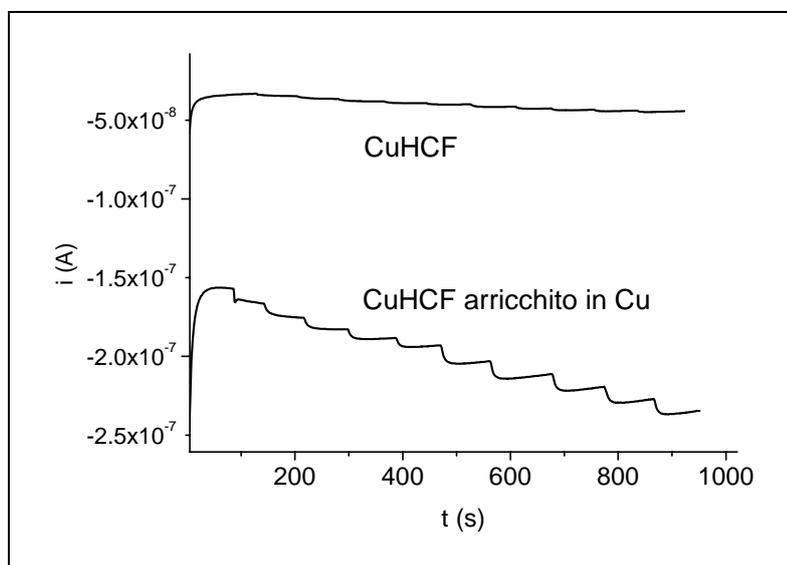


Figura 4.21 - Confronto di cronoamperogrammi di risposta ad H_2O_2 a 0.0 V vs. SCE , in soluzione PBS 0.1 M a $\text{pH } 5.5$, relativi a CuHCF (depositato nelle condizioni indicate nella Parte Sperimentale, ma con 20 cicli a 20 mV/s) e a CuHCF arricchito di ioni Cu^{2+} mediante intercalazione.

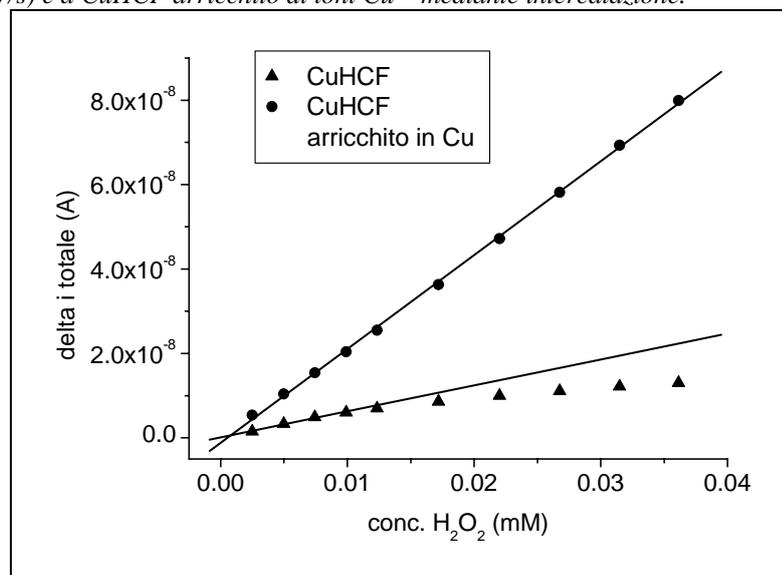


Figura 4.22 – Curve di calibrazione relative ai cronoamperogrammi riportati in Figura 4.21.

La sensibilità di risposta di un elettrodo, sottoposto ad intercalazione, diminuisce progressivamente nel corso di prove cronoamperometriche successive, condotte in PBS (Figura 4.23), perchè K^+ si sostituisce a Cu^{2+} .

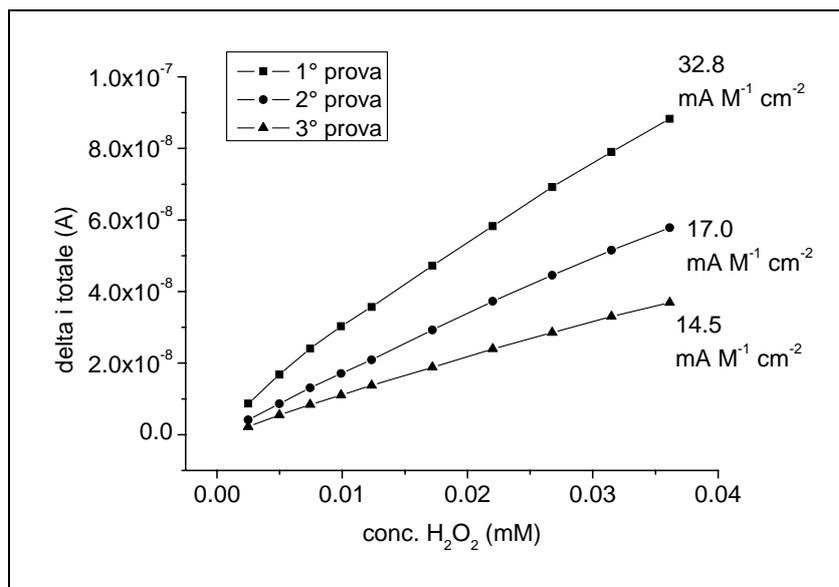


Figura 4.23 – Curve di calibrazione relative a determinazioni cronoamperometriche di H₂O₂ effettuate sequenzialmente con uno stesso elettrodo di GC, modificato con un film di CuHCF arricchito di ioni Cu²⁺, in PBS 0.1 M a pH 5.5.

Infatti, lavorando in un elettrolita contenente cationi più difficilmente scambiabili, come NH₄⁺, il decremento di sensibilità in prove successive è più lento, come mostrato in Tabella 10.

	Diminuzione % di sensibilità di risposta rispetto alla 1° determinazione cronoamperometrica
K ⁺	2° determinazione: - 48.2 3° determinazione: - 55.8
NH ₄ ⁺	2° determinazione: - 17.2 3° determinazione: -36.4

Tabella 10 – Decremento della sensibilità di risposta ad H₂O₂ di elettrodi modificati con CuHCF arricchito di Cu²⁺, rispetto alla sensibilità ottenuta durante la prima determinazione, in soluzioni contenenti cationi differenti (K⁺ e NH₄⁺).

Un'applicazione molto interessante della procedura di intercalazione è costituita dalla possibilità di ripristinare le prestazioni di un elettrodo quando queste, dopo ripetute determinazioni, sono diminuite notevolmente, rispetto a quelle iniziali.

A titolo di esempio, si riporta (Figura 4.24) un confronto fra le curve di calibrazione riferite ad un elettrodo utilizzato più volte in determinazioni cronoamperometriche e allo stesso elettrodo sottoposto a procedura di intercalazione.

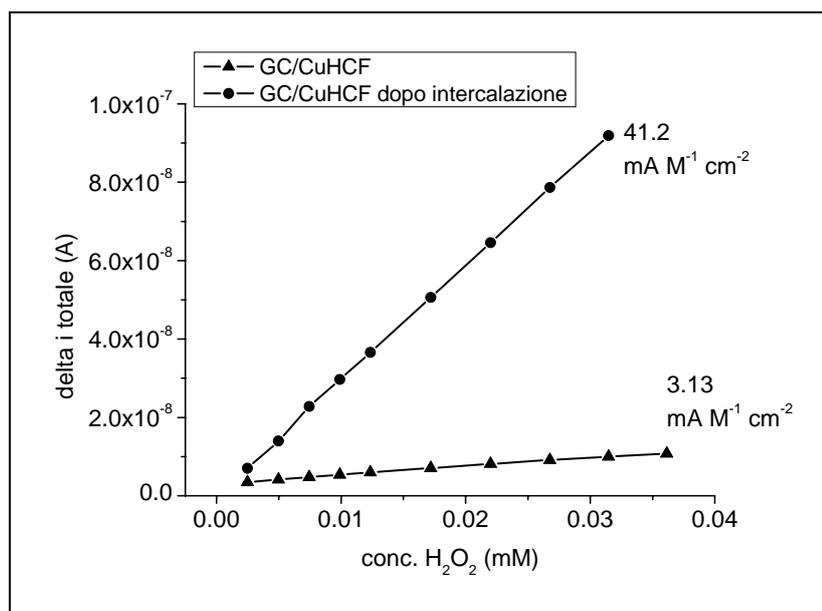


Figura 4.24 – Confronto fra curve di calibrazione relative a determinazioni cronopotamperometriche di H₂O₂ effettuate con un elettrodo di GC (a fine vita del sensore) modificato con CuHCF prima (triangoli) e dopo (cerchi) la procedura di intercalazione di ioni Cu²⁺.

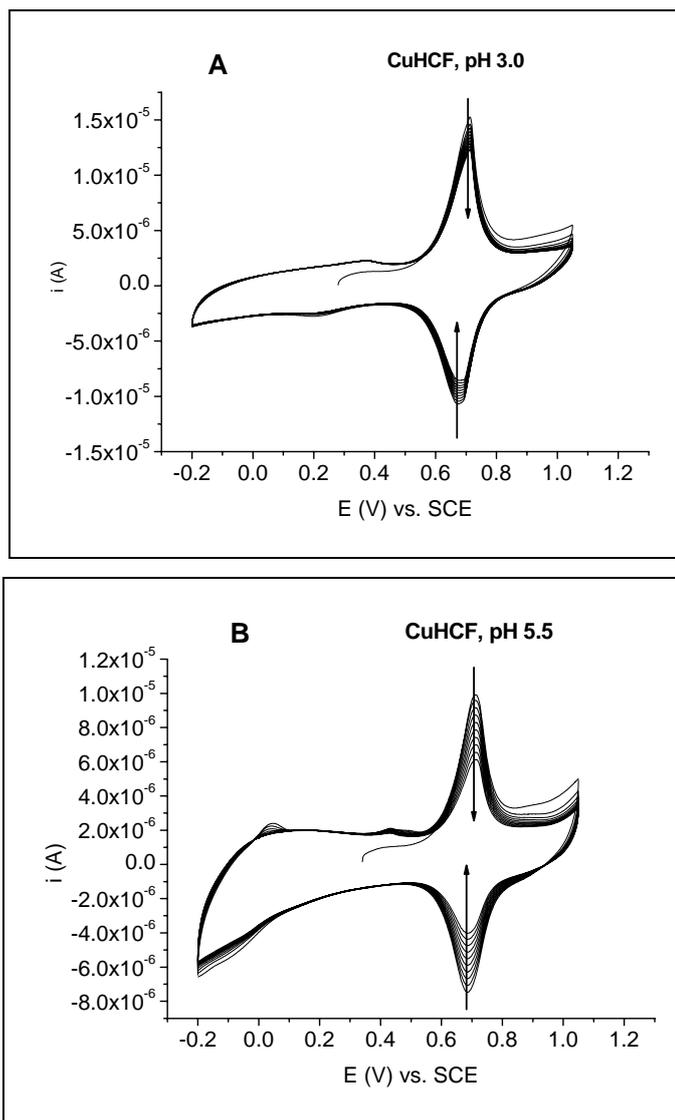
4.1.4. STABILITÀ AL pH

È noto che tutti gli esacianoferrati puri di metalli di transizione si sciolgono in soluzioni alcaline, ma sono instabili già in soluzioni debolmente acide. Questa scarsa stabilità limita l'applicabilità di elettrodi modificati in matrici reali e rappresenta uno svantaggio nella progettazione di biosensori basati su esacianoferrati, visto che l'attività degli enzimi diminuisce drasticamente in ambiente acido.

La stabilità di esacianoferrati misti CuPdHCF in soluzioni di PBS, a diversi pH, è stata valutata mediante voltammetria ciclica, e confrontata con quella mostrata da CuHCF e PdHCF. Il comportamento di CuHCF è risultato simile a quello tipico degli esacianoferrati in generale. L'instabilità del film è tanto maggiore quanto più alto è il pH, e si manifesta con un decremento delle intensità di corrente di picco dopo ogni ciclo voltammetrico: le Figure 4.25A-E riportano i voltammogrammi registrati a pH 3.0, 5.5 e 7.0. Per le valutazioni riguardo agli altri esacianoferrati, si è scelto di testare gli elettrodi modificati solo a pH 5.5. PdHCF, al contrario, si dimostra molto più stabile, poichè i voltammogrammi risultano ancora sovrapponibili, anche dopo 20 cicli in PBS pH 5.5, a 50 mV/s. La stabilità di esacianoferrati misti del tipo CuPdHCF è risultata molto alta a pH 5.5, di gran lunga superiore a quella di CuHCF e, dato molto interessante, anche a quella di PdHCF. Si può concludere che Pd eserciti una azione di stabilizzazione molto forte nei composti CuPdHCF, e questo dato trova conferma nell'aumentata stabilità di

esacianoferrati misti di Ni e Pd, rispetto a quella tipica di NiHCF, riportata da Kulesza et al. in un lavoro della letteratura [9].

Il fatto che gli esacianoferrati misti manifestino elevata stabilità in soluzioni debolmente acide o a pH vicini alla neutralità costituisce un risultato importante, perchè rende non necessari ulteriori trattamenti di stabilizzazione simili a quelli spesso applicati a PB [21,22].



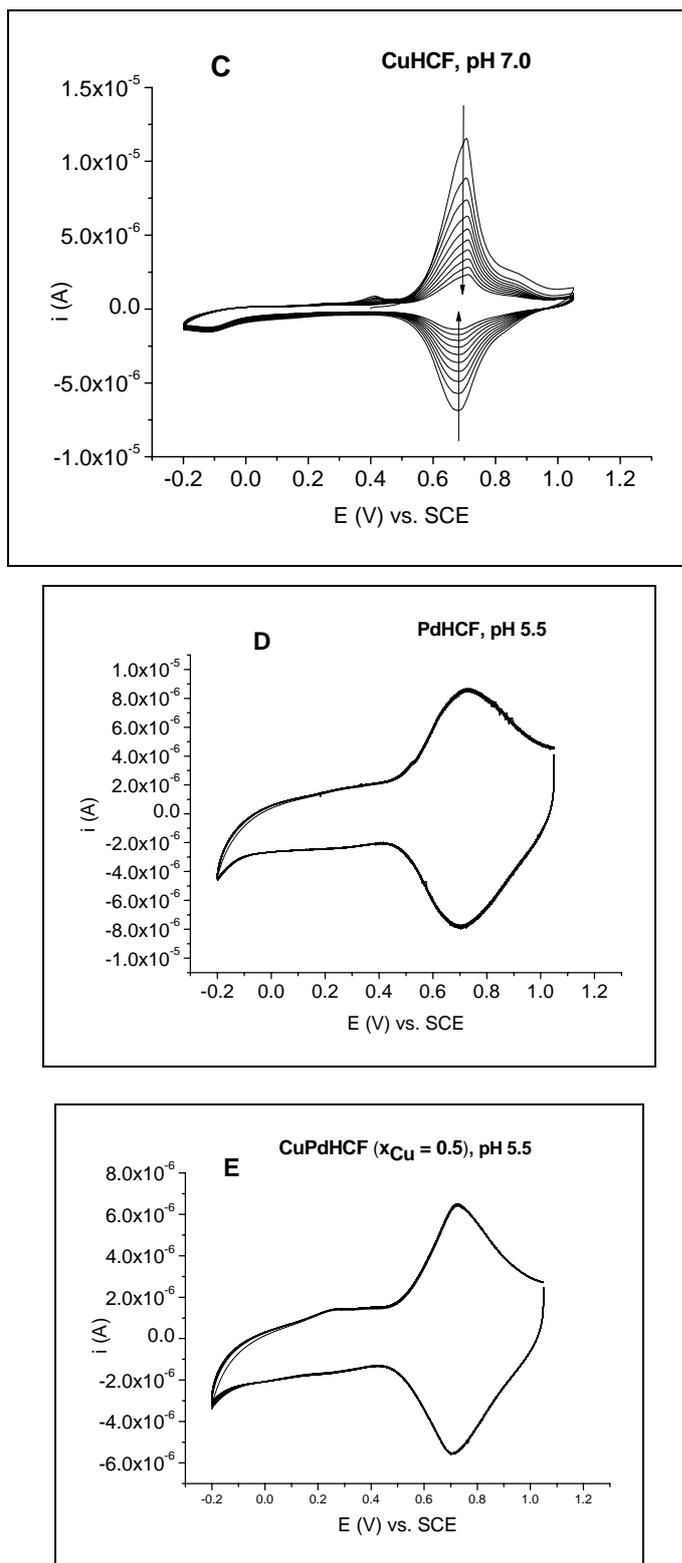


Figura 4.25 – CV registrate con elettrodi GC modificati con film di CuHCF, PdHCF e CuPdHCF ($x_{Cu} = 0.5$), in PBS 0.1 M, nelle condizioni di pH indicate nel titolo relativo ad ogni grafico (A-E).

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Eftekhari, *J. Electroanal. Chem.* 2003, 558, 75.
- [2] H. Razmi, A. Azadbakht, *Electrochim. Acta* 2005, 50, 2193.
- [3] H. Razmi, A. Azadbakht, M. H. Sadr, *Anal. Sci.* 2005, 21, 1317.
- [4] J. Bacskai, K. Martinusz, E. Czirok, G. Inzelt, P.J. Kulesza, M.A. Malik, *J. Electroanal. Chem.* 1995, 385, 241.
- [5] P.J. Kulesza, M. Faszynska, *J. Electroanal. Chem.* 1988, 252, 461.
- [6] P.J. Kulesza, M. Faszynska, *Electrochim. Acta.* 1989, 34, 1749.
- [7] J.A. Cox, S.E. Gadd, B.K. Das, *J. Electroanal. Chem.* 1988, 256, 199.
- [8] M. Jiang, Z. Zhao, *J. Electroanal. Chem.* 1990, 292, 281.
- [9] P.J. Kulesza, M.A. Malik, R. Schmidt, A. Smolinska, K. Miecznikowski, S. Zamponi, A. Czerwinski, M. Berrettoni, R. Marassi, *J. Electroanal. Chem.* 2000, 487, 57.
- [10] R. Pauliukaite, M. Florescu, C.M.A. Brett, *J. Solid State Electrochem.* 2005, 9, 354.
- [11] I.L. de Mattos, L. Gorton, T. Laurell, A. Malinauskas, A.A. Karyakin, *Talanta* 2000, 52, 791.
- [12] R. Pauliukaite, M. Florescu, C.M.A. Brett, *J. Solid State Electrochem.* 2005, 9, 354.
- [13] I.L. de Mattos, L. Gorton, T. Laurell, A. Malinauskas, A.A. Karyakin, *Talanta* 2000, 52, 791.
- [14] X. Cui, L. Hong, X. Lin, *J. Electroanal. Chem.* 2002, 526, 115.
- [15] M. Giorgetti, M. Berrettoni, *Inorg. Chem.* 2008, 47, 6001.
- [16] A.A. Karyakin, *Electroanalysis* 2001, 13, 813.
- [17] M.S. Lin, T.F. Tseng, W.C. Shih, *Analyst* 1998, 123, 159.
- [18] O. Makowski, J. Stroka, P.J. Kulesza, M.A. Malik, Z. Galus, *J. Electroanal. Chem.* 2002, 532, 157.
- [19] R. Pauliukaite, M. Florescu, C.M.A. Brett, *J. Solid State Electrochem.* 2005, 9, 354.
- [20] D.R. Shankaran, S.S. Narayanan, *Fresenius J. Anal. Chem.* 1999, 364, 686.
- [21] I.L. de Mattos, L. Gorton, T. Ruzgas, A.A. Karyakin, *Anal. Sci.* 2000, 16, 795.
- [22] B. Haghighi, S. Varma, F.M. Alizadeh Sh., Y. Yigzaw, L. Gorton, *Talanta* 2004, 64, 3.

4.2. PRESTAZIONI ELETTROCATALITICHE DI ESACIANOFERRATI PURI E MISTI DI Cu E Pd PER LA REALIZZAZIONE DI BIOSENSORI PER IL GLUCOSIO

Dopo aver valutato le prestazioni elettrocatalitiche di elettrodi modificati con CuHCF e CuPdHCF nei confronti della riduzione di H_2O_2 , si è compiuto un passo successivo: l'applicazione di questi sistemi alla progettazione di biosensori.

Per realizzare la configurazione di un biosensore, l'enzima glucosio ossidasi (GOx), scelto come enzima modello, è stato immobilizzato sulle superfici elettrodiche di carbone vetroso modificate con i film di esacianoferrati. Le prestazioni sono state valutate effettuando aggiunte di glucosio (substrato enzimatico della GOx) durante lo svolgimento di prove cronoamperometriche e registrando la corrente di riduzione dell' H_2O_2 prodotta durante la reazione enzimatica.

Lo schema di rivelazione del glucosio, che ricalca quello tipico di un biosensore di "I generazione mediata" (vedi *Introduzione*), è riportato in Figura 4.26. La funzione di mediatore/catalizzatore dell'esacianoferrato assume notevole importanza durante lo step di rivelazione di H_2O_2 all'elettrodo.

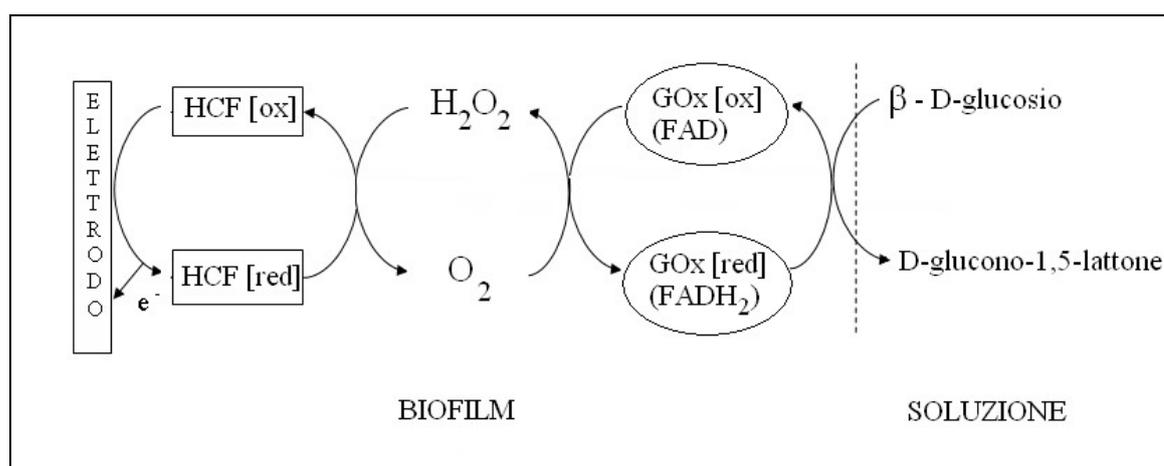


Figura 4.26 – Schema di rivelazione del glucosio in un biosensore di tipo GC/HCF/GOx (I generazione mediata).

4.2.1. SCELTA DEL SISTEMA DI IMMOBILIZZAZIONE ENZIMATICA

Le prove preliminari di ottimizzazione della configurazione del biosensore sono state svolte per via cronoamperometrica a 0.0 V vs. SCE, in aria, con un elettrodo modificato con CuHCF.

Il primo tipo di immobilizzazione (chimico) testato è la reticolazione con albumina di siero bovino e glutaraldeide (sistema “BSA+GA”, biosensore del tipo *GC/CuHCF/GOx_BSA_GA*). Nelle prove iniziali, si sono effettuate aggiunte da 50 μL di glucosio 0.1 M a 20 mL di PBS a pH 5.5 (concentrazione di ogni aggiunta circa 0.25 mM), ma non si è osservato alcun responso. Si è allora incrementata la quantità di glucosio aggiunto fino ad ottenere concentrazioni dieci volte maggiori. In tal caso, quando si osservava un responso, il segnale non si stabilizzava, era caratterizzato da un tempo di risposta molto lungo e, spesso, si raggiungeva la condizione di saturazione già dopo la prima aggiunta (cioè assenza di risposta per le aggiunte successive). Il responso cronoamperometrico è riportato in Figura 4.27.

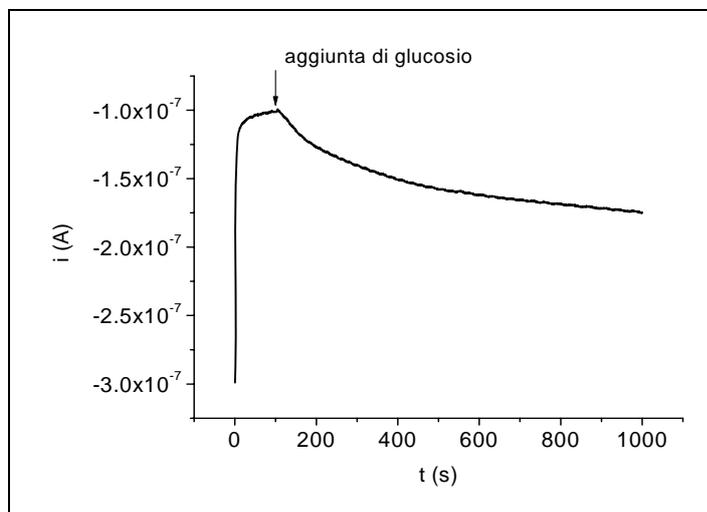


Figura 4.27 – Responso cronoamperometrico al glucosio di un biosensore *GC/CuHCF/GOx_BSA_GA*. $E = 0.0$ V vs. SCE. 1 aggiunta da 500 μL di glucosio 0.1 M a 20 mL di PBS 0.1 M, pH 5.5.

Il comportamento del biosensore ha condotto ad ipotizzare che vi fosse un problema di diffusione, causato dall'eccessivo spessore della membrana BSA+GA. Se è presente una barriera diffusoriale, il glucosio è ostacolato nel raggiungere i siti enzimatici, quindi anche il perossido di idrogeno raggiunge lentamente la superficie dell'elettrodo,

e questo si traduce in una risposta cineticamente lenta, che si manifesta solo ad alte concentrazioni di analita.

Per convalidare l'ipotesi formulata, è stata testata la risposta di un elettrodo modificato immobilizzando la GOx in una membrana BSA+GA su un film di Blu di Prussia (configurazione del tipo *GC/PB/GOx_BSA_GA*). Questo composto è stato preso come modello, perchè, fra tutti gli esacianoferrati descritti in letteratura, presenta classicamente le migliori prestazioni nella rivelazione di H₂O₂. Per aggiunte di glucosio in concentrazione pari a 0.5 mM circa ciascuna, si è registrato un responso eccellente, rapido e stabile (Figura 4.28): questo risultato dimostra che la concentrazione di H₂O₂ che si ottiene in prossimità della superficie elettrodica, modificata con l'esacianoferrato, è limitata dalla barriera diffusionale dovuta alla spessa membrana di immobilizzazione. Tale concentrazione risulta inferiore al L.O.D. caratteristico di CuHCF per il perossido di idrogeno (assenza di risposta), ma non a quello di PB (responso osservato).

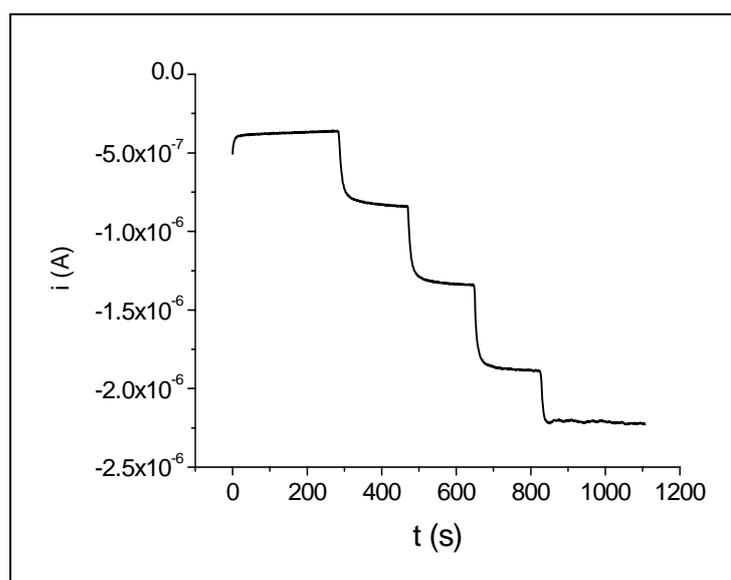


Figura 4.28 – Responso cronoamperometrico al glucosio di un biosensore *GC/PB/GOx_BSA_GA*. $E = 0.0$ V vs. SCE. Aggiunte da 100 μ L di glucosio 0.1 M a 20 mL di PBS 0.1 M, pH 5.5.

Come sistema di immobilizzazione alternativo si è impiegata una membrana di Nafion, realizzando un biosensore con configurazione del tipo *GC/CuHCF/GOx_Nafion*. La determinazione cronoamperometrica di H₂O₂ ha prodotto il responso atteso (Figura 4.29), quindi si è scelto il Nafion come sistema di immobilizzazione per la realizzazione dei biosensori basati su esacianoferrati di Cu e Pd.

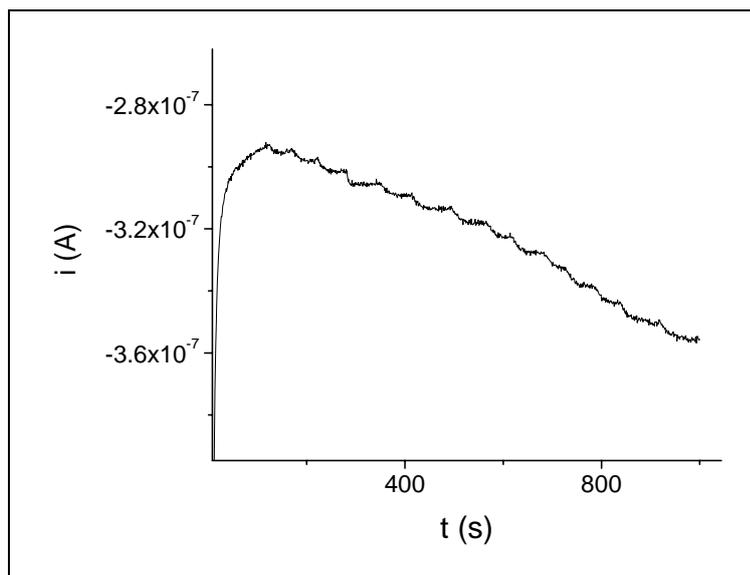


Figura 4.29 – Risposta cronoamperometrica al glucosio di un biosensore GC/CuHCF/GO_x/Nafion. $E = 0.0$ V vs. SCE. Aggiunte da 10 μ L di glucosio 0.1 M a 20 mL di PBS 0.1 M, pH 5.5.

4.2.2. CONFRONTO QUALITATIVO DELLE PRESTAZIONI DI ELETTRODI MODIFICATI CON CuHCF e CuPdHCF COME BIOSENSORI PER IL GLUCOSIO

Per verificare se le prestazioni di CuHCF e CuPdHCF, come componenti di un biosensore per il glucosio, riflettessero quelle mostrate nella determinazione di H₂O₂, sono stati testati 3 tipi di biosensori, basati rispettivamente su CuHCF, CuPdHCF con $x_{Cu} = 0.3$ e CuPdHCF con $x_{Cu} = 0.5$. Considerando l'andamento riportato in Figura 4.14, ci si attendeva che la sensibilità di risposta fosse massima per CuPdHCF con $x_{Cu} = 0.5$, intermedia per CuHCF e minima per CuPdHCF con $x_{Cu} = 0.3$. In Figura 4.30 si riporta un confronto fra i cronoamperogrammi relativi ai tre biosensori (Figura 4.30A) e fra le corrispondenti curve di calibrazione (Figura 4.30B), costruite sulla base dei responsi registrati, il quale mostra che i risultati ottenuti si sono dimostrati perfettamente in accordo con queste previsioni.

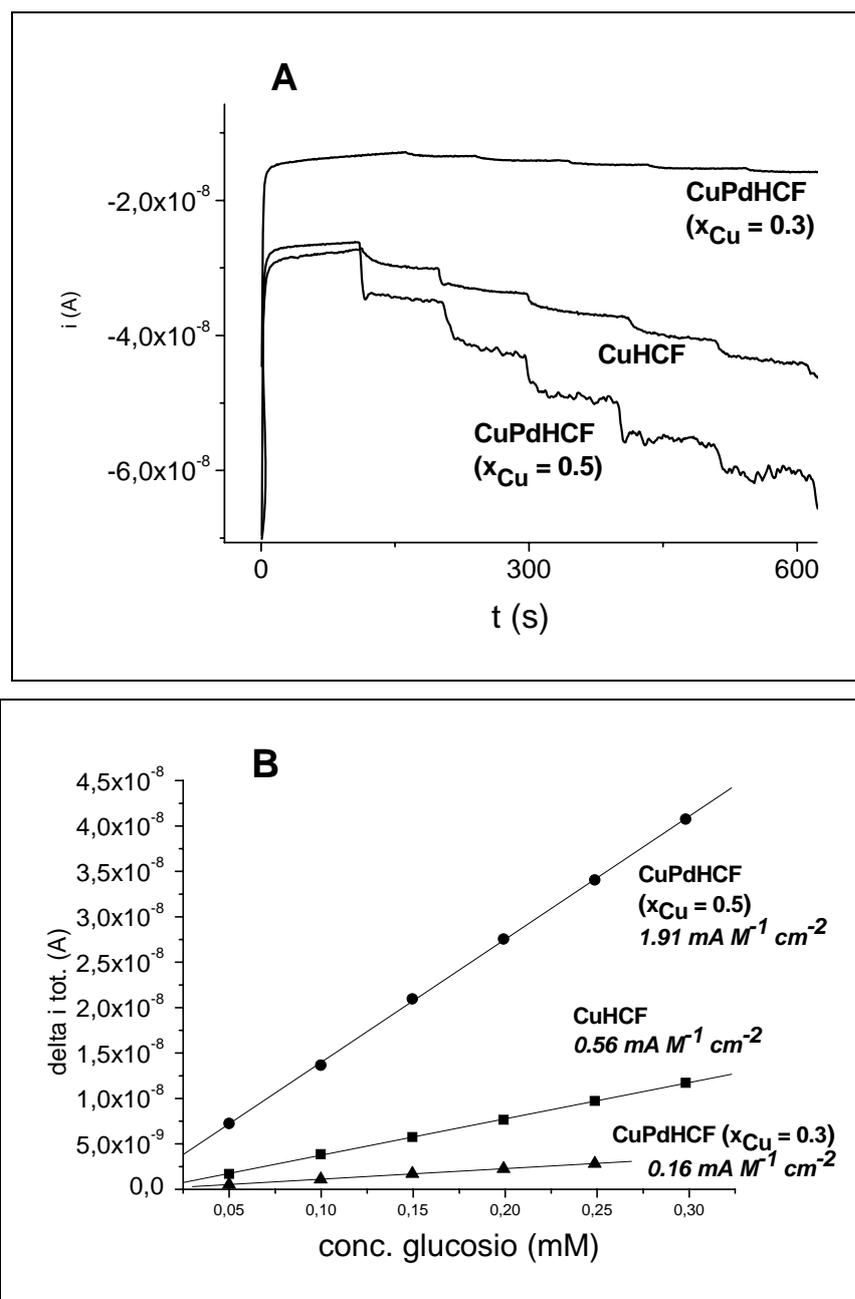


Figura 4.30 – A: Confronto dei responsi cronoamperometrici al glucosio di biosensori GC/CuHCF/GOx_Nafion e GC/CuPdHCF/GOx_Nafion (per $x_{Cu} = 0.3$ e 0.5). $E = 0.0$ V vs. SCE. Aggiunte da $20 \mu\text{L}$ di glucosio 0.05 M a 20 mL di PBS 0.1 M, pH 5.5 . B: Curve di calibrazione relative ai responsi cronoamperometrici riportati in Figura 4.30A.

Nonostante una valutazione esaustiva delle prestazioni dei biosensori, in termini di estensione dell'intervallo di linearità e del range di risposta dinamico, non sia stata svolta, è comunque possibile formulare alcune riflessioni sulla stabilità. Sia gli elettrodi basati sull'esacianoferrato di Cu, sia quelli impieganti esacianoferrati misti di Cu e Pd sono caratterizzati da una bassa stabilità operativa, che li rende più idonei ad un utilizzo come biosensori monouso che per applicazioni prolungate nel tempo. Determinazioni di

glucosio eseguite in successione mostrano un marcato decremento di sensibilità (un esempio è riportato in Figura 4.31), che potrebbe essere attribuibile ad un rilascio dell'enzima in soluzione, oppure alla sua disattivazione da parte dei centri metallici dell'esacianoferrato, o, infine, alla parziale solubilizzazione dell'esacianoferrato causata da variazioni locali di pH.

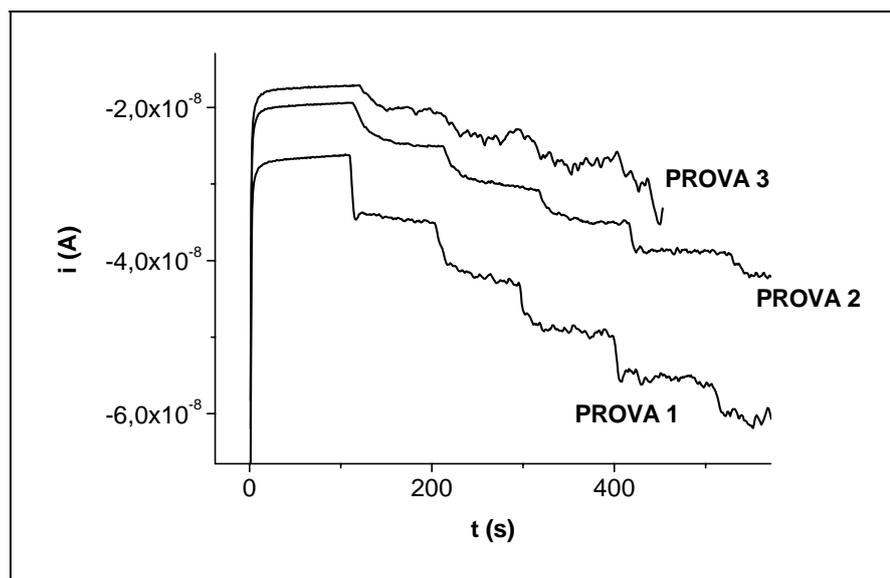


Figura 4.31 – Confronto dei responsi cronoamperometrici registrati in 3 determinazioni successive di glucosio con un elettrodo GC/CuPdHCF/GOx_Nafion ($x_{Cu} = 0.5$). $E = 0.0$ V vs. SCE. Aggiunte da $20 \mu\text{L}$ di glucosio 0.05 M a 20 mL di PBS 0.1 M, pH 5.5 .

4.3. VISUALIZZAZIONE DELL'ATTIVITA' ELETTROCATALITICA DI ESACIANOFERRATI MICROSTRUTTURATI

4.3.1. CARATTERIZZAZIONE DELLA TIP

Prima di essere impiegato come tip nelle scansioni SECM, un microelettrodo di Pt deve essere caratterizzato per accertare che le sue prestazioni elettrochimiche siano ottimali.

Tutti i microelettrodi fabbricati sono stati ispezionati al microscopio ottico per verificare che la geometria di elettrodo fosse quella, attesa, di tipo “microdisco”, e che il filo di Pt fosse ben saldato all'involucro esterno di vetro. In Figura 4.32 sono mostrati due esempi di microelettrodi di Pt che soddisfano entrambi i requisiti. Il secondo elettrodo, tuttavia, consente di effettuare scansioni SECM con risoluzione più elevata, in quanto, a parità di diametro elettrodico, presenta un valore del parametro RG inferiore, essendo la superficie elettrodica circondata da un involucro di vetro meno spesso.

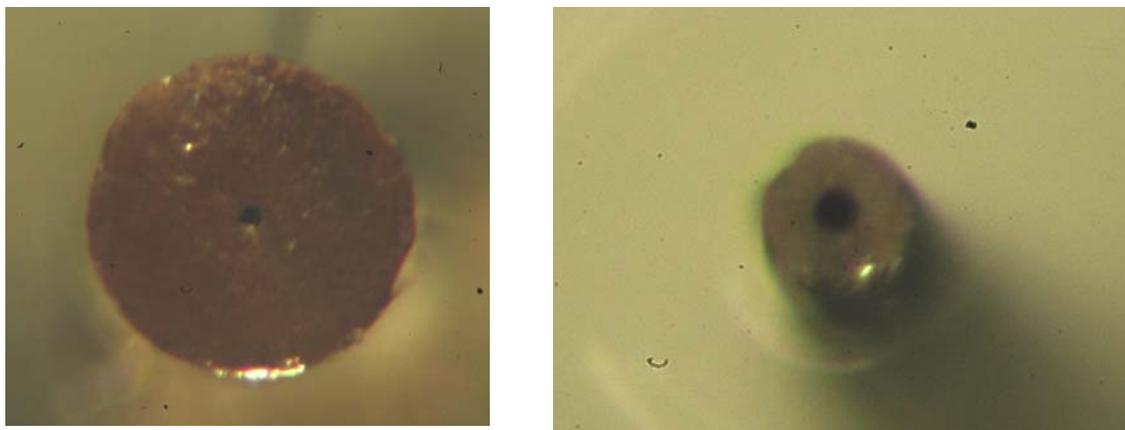
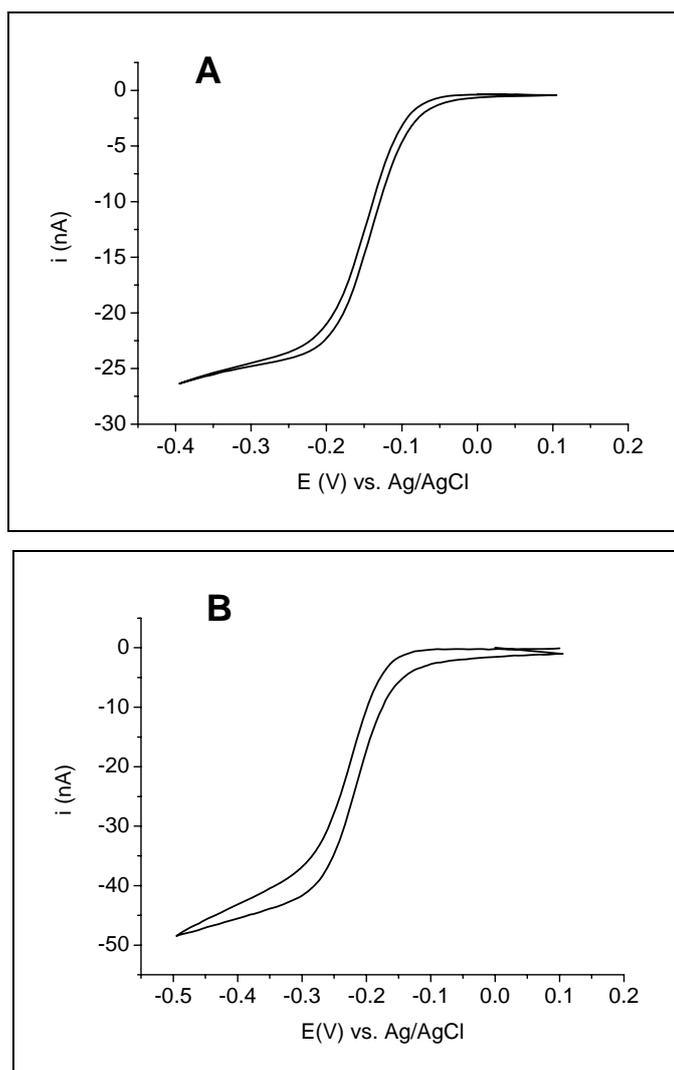


Figura 4.32 – Immagini al microscopio ottico di microelettrodi di Pt con geometria a disco con RG pari a 12 (sinistra) e 4 (destra).

Successivamente, è stata eseguita una caratterizzazione mediante voltammetria ciclica (CV) per verificare che sulla superficie elettrodica non fossero presenti specie contaminanti elettroattive e che il comportamento elettrochimico del microelettrodo fosse in accordo con quello previsto dalla teoria della diffusione per una geometria di tipo microdisco [1].

In Figura 4.33 (A-C) sono riportati alcuni voltammogrammi esemplificativi di caratterizzazione di microelettrodi. Il voltammogramma di Figura 4.33A è caratteristico di un microelettrodo dal comportamento elettrochimico ottimale: la curva presenta una forma sigmoideale, una piccola differenza (in termini di valori di potenziale) fra la scansione di andata e quella di ritorno, e una corrente di stato stazionario di circa 25 nA, attesa per un elettrodo di diametro pari a 25 μm , caratterizzato in una soluzione la cui composizione è indicata in didascalia.

Il voltammogramma di Figura 4.33B presenta correttamente una forma sigmoideale, ma la corrente di stato stazionario è troppo alta; lo stesso vale per l'elettrodo di Figura 4.33C, la cui CV tende a quella tipica di un macroelettrodo. Probabilmente in questi ultimi due elettrodi l'aderenza fra Pt e vetro non era ottimale, per cui la soluzione di misura è riuscita a penetrare nella fessura, producendo l'effetto complessivo di un aumento dell'area elettrodica attiva.



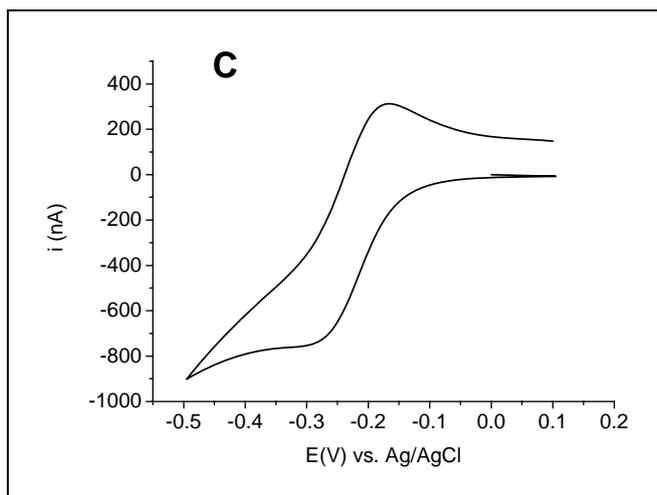
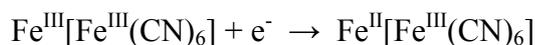


Figura 4.33 – CV di caratterizzazione di microelettrodi di Pt (\varnothing 25 μ m) in soluzione contenente $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 5 mM in KCl 0.1 M. A: Responso caratteristico di un microelettrodo. B e C: responsi di microelettrodi con area elettroattiva maggiore di quella geometrica teorica.

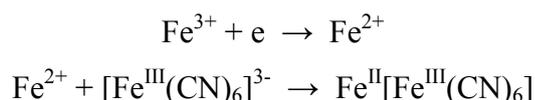
4.3.2. DEPOSIZIONE ELETTROCHIMICA DI SPOT DI BLU DI PRUSSIA

L'impiego della “droplet cell” ha consentito di depositare elettrochimicamente film microstrutturati di Blu di Prussia su lamine di carbone vetroso.

L'elettrosintesi è stata condotta per via potenziodinamica a partire da una miscela di ioni Fe^{3+} e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, sfruttando i due diversi meccanismi di deposizione che si attuano a +0.7 V e a +0.4 V (vs. SCE) [2]. Secondo quanto riportato in letteratura, a +0.7 V si verifica la riduzione del complesso $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ [3], secondo la reazione



la quale conduce alla precipitazione di PB sulla superficie dell'elettrodo. A +0.4 V decorre la precipitazione “bulk” di PB per riduzione di Fe^{3+} a Fe^{2+} e successiva reazione di quest'ultimo con $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$, secondo le reazioni



Sperimentalmente si è verificato che nella droplet cell, che si configura come una “micro-cella” elettrochimica, la geometria di cella riveste un ruolo chiave in fase di elettrosintesi, diversamente da quanto avviene in una cella di dimensioni maggiori. La

posizione relativa degli elettrodi (Figura 4.34) deve prevedere che l'elettrodo di riferimento e il controlettrodo siano vicini tra loro, ma sufficientemente separati dall'elettrodo di lavoro, per evitare la precipitazione di PB sul controlettrodo. Inoltre, RE e CE devono essere sufficientemente lontani dalla superficie del GC, per avere uno strato di soluzione sufficientemente spesso da consentire la formazione di un profilo diffusionale vicino al supporto.

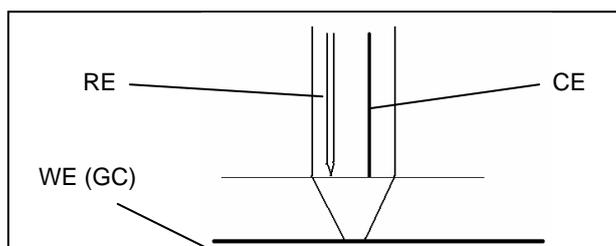


Figura 4.34 - Rappresentazione schematica della posizione ottimale degli elettrodi e del substrato durante l'impiego della droplet cell.

Nel voltammogramma di deposizione (Figura 4.35) si è osservato, all'aumentare dello spessore del film ad ogni scansione, un incremento di corrente nell'intervallo di potenziali compreso fra +0.65 e +0.75 V vs. Ag/AgCl/KCl, agar. Gli "spot" depositati sono risultati, ad una ispezione al microscopio ottico, di forma circolare, di diametro compreso tra 500 e 650 μm , con bordi compatti e definiti, meccanicamente stabili, adesi alla superficie del supporto sottostante, con un ottimo grado di copertura del GC (Figura 4.36).

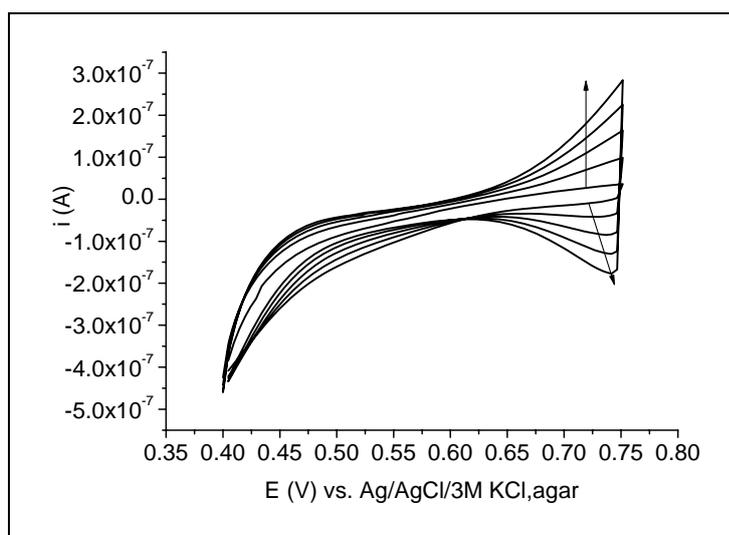


Figura 4.35 - CV di deposizione di un film microstrutturato di PB su GC (5 cicli in soluzione contenente FeCl_3 2 mM, in HCl 1 M, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 2 mM, KCl 0.1 M e HCl 0.1 M).

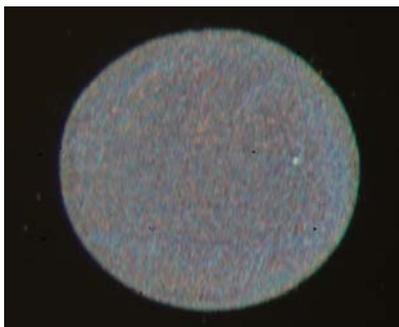


Figura 4.36 – Immagine al microscopio ottico di film di PB depositato con successo.

Diversamente, nei casi in cui la disposizione degli elettrodi conduceva ad una geometria di cella sfavorevole alla deposizione, il voltammogramma ciclico non presentava gli attesi incrementi di corrente e il film era disomogeneo e meccanicamente instabile (Figura 4.37).

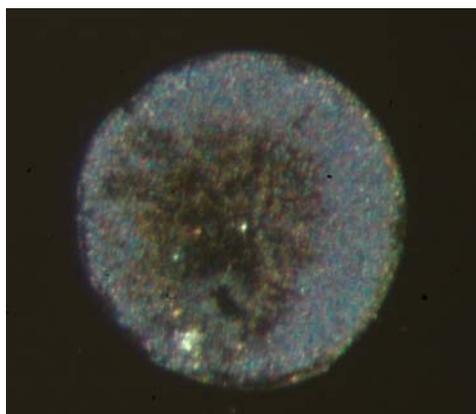
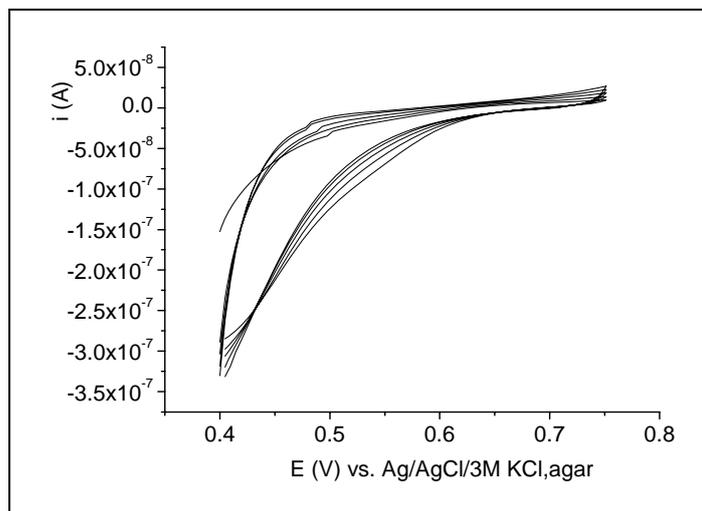


Figura 4.37 – In alto: CV di deposizione relativa ad una deposizione con geometria di cella sfavorevole di un film microstrutturato di PB su GC. In basso: immagine al microscopio ottico di un film di PB che ricopre in modo non uniforme il supporto sottostante.

Dopo la deposizione, alla lamina di GC modificata sono stati applicati 20 cicli voltammetrici nella soluzione di elettrolita di supporto, contenente KCl e HCl. Il voltammogramma mostra un sistema di picchi, attribuibili alla coppia Blu di Prussia (PB) / Bianco di Prussia (PW): più stretti appaiono tali picchi, migliore è la “qualità” del deposito ottenuto [2]. La procedura descritta prende il nome di “attivazione”, perchè porta ad un aumento della attività elettrochimica del materiale: come si può notare dalla Figura 4.38, le correnti di picco aumentano ad ogni ciclo.

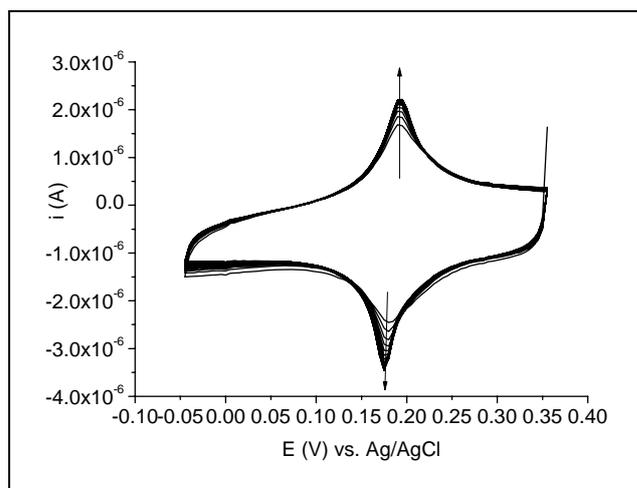


Figura 4.38 – CV di attivazione di film di PB microstrutturato depositato su PB. Soluzione contenente KCl 0.1 M + HCl 0.1 M; 20 cicli a 40 mV/s.

Secondo alcuni autori [4,5], la procedura di attivazione consente di ottenere una più alta stabilità al pH, perchè comporta una riorganizzazione della struttura cristallina del materiale. È noto, infatti che il Blu di Prussia è instabile in soluzioni a pH vicini alla neutralità o alcalini, perchè lo ione OH^- , coordinandosi agli ioni Fe^{2+} e Fe^{3+} , rompe i legami Fe–CN–Fe e causa la solubilizzazione del policristallo.

Il film di PB depositato è stato, infine, sottoposto ad un trattamento di asciugatura in stufa a 100 °C per 1 ora, in grado di rimuovere irreversibilmente le molecole d’acqua contenute nelle sue cavità (“ H_2O zeolitica”) [6]. Sembra che la rimozione dell’acqua zeolitica contribuisca ad accrescere la stabilità del film di Blu di Prussia [5].

Complessivamente, la procedura ottimizzata di elettrosintesi-attivazione-asciugatura descritta ha fornito film di Blu di Prussia altamente stabili, anche in soluzioni debolmente acide e a potenziali catodici, in cui la forma ridotta Bianco di Prussia normalmente si distacca con facilità dalla superficie elettrodica.

4.3.3. SCANSIONI SECM

4.3.3.1. Curve di avvicinamento e correzione del tilt del campione

Prima di effettuare una scansione di un substrato, sono state registrate 3 curve di avvicinamento in sequenza, in corrispondenza di altrettanti punti della superficie (evidenziati in Figura 4.39, relativamente all'area di scansione scelta), con il duplice scopo di portare la tip alla distanza di lavoro desiderata e di fornire al software dedicato i dati necessari ad apportare la correzione del "tilt" del campione.

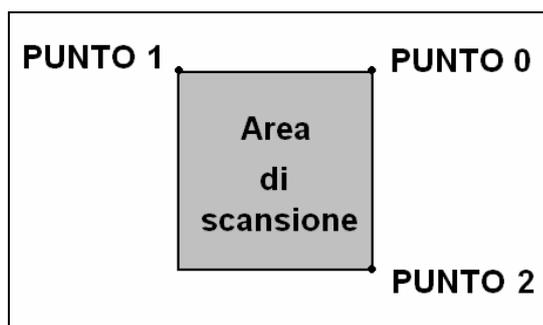


Figura 4.39 – Rappresentazione schematica della disposizione spaziale dei punti su cui si basa la correzione del tilt, rispetto all'area di scansione del campione scelta.

La curva di avvicinamento è stata eseguita in soluzione tampone, in assenza di alcun mediatore redox di sintesi.

Alla tip si è applicato un potenziale costante di -0.60 V vs. Ag/AgCl per far decorrere la riduzione dell'O₂ disciolto in soluzione, secondo la seguente reazione (ORR):



Quando la tip è lontana (distanza superiore a 100 µm) dalla superficie del campione, la diffusione di O₂ verso la superficie elettrodica procede alla massima velocità, producendo una corrente di tip, i_T , pari alla corrente di riduzione di stato stazionario di O₂, $i_{T,\infty}$: $i_T = i_{T,\infty}$. Quando la tip si avvicina tanto che il profilo diffusionale viene perturbato dalla presenza della superficie, la corrente di tip comincia a diminuire, perchè la diffusione di O₂ risulta sempre più ostacolata nello strato di soluzione fra tip e substrato, il cui spessore si va sempre più riducendo. L'effetto atteso è quello del feedback negativo, in cui $i_T < i_{T,\infty}$.

Si riportano di seguito due set di curve di avvicinamento registrate per effettuare una correzione del tilt. Per poterle confrontare tra loro, a gruppi di tre, sono state

“normalizzate”, dividendo la corrente di tip per $i_{T,\infty}$. È stata riportata solo la porzione di curva registrata impiegando il motore piezoelettrico, tralasciando invece quella relativa all'uso del motore passo-passo (“stepper”). Il “ricciolo” che caratterizza le curve nella loro parte finale è prodotto dal contatto del vetro della tip con la superficie. Nel campione relativo alla Figura 4.40A il tilt del campione è inferiore a quello relativo alla Figura 4.40B, come indicano le frecce riportate in grafico, ed è massimo nella direzione punto 0 – punto 2. La tip impiegata in Figura 4.40B possiede un migliore allineamento verticale, perchè, prima che il vetro entri in contatto con il substrato, la corrente subisce un decremento del 60-80%, contro il 30-35% visibile in Figura 4.40A.

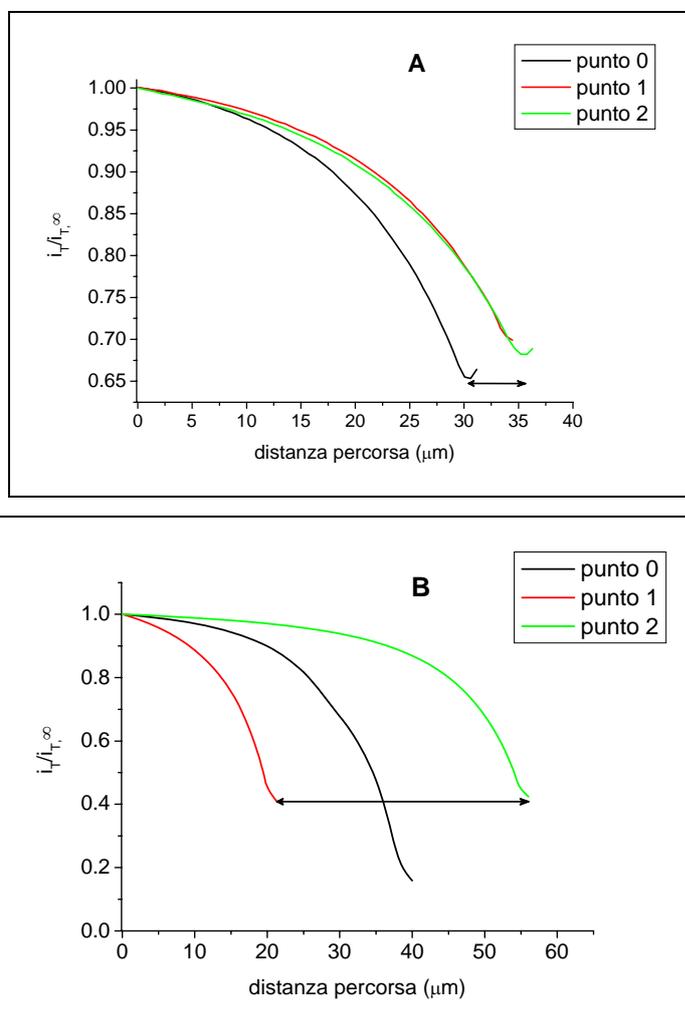


Figura 4.40 – Curve di avvicinamento per correzione del tilt di un campione nei casi di tilt trascurabile (A) ed elevato (B).

4.3.3.2. Visualizzazione dell'attività elettrocatalitica di Blu di Prussia (GC/PB)

L'attività elettrocatalitica verso la riduzione di H_2O_2 di spot microstrutturati di PB depositati su lamine di GC è stata valutata qualitativamente impiegando la modalità SECM "competizione redox" (RC-SECM).

Operando in una soluzione di PBS, a pH 6.0 contenente H_2O_2 , si è applicato alla tip un profilo di impulsi di potenziale (Figura 4.41), consistente in un potenziale di base (E_{base}) pari a 0.0 V vs. Ag/AgCl, durante l'applicazione del quale la corrente non viene campionata, e in un potenziale di rivelazione (E_{det}) di +0.6 V, durante la cui applicazione si campiona la corrente relativa all'ossidazione di H_2O_2 .

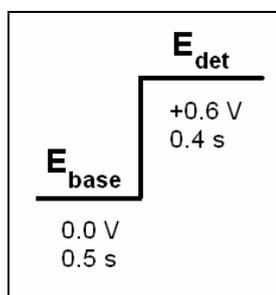


Figura 4.41 – Profilo di impulsi di potenziale adottato per la visualizzazione dell'attività elettrocatalitica di spot di PB in modalità RC-SECM.

Al substrato è stato applicato un potenziale costante, tale da consentire la riduzione di H_2O_2 per elettrocatalisi in corrispondenza dello spot di PB, ma non sufficientemente catodico da superare la sovratensione per la reazione su GC. Il risultato atteso era che la corrente di tip assumesse un valore costante quando era scansionata sulla lamina di GC non modificata, quindi diminuisse in corrispondenza dello spot di Blu di Prussia, a causa della competizione esercitata da quest'ultimo nel consumo di H_2O_2 (Figura 4.42).

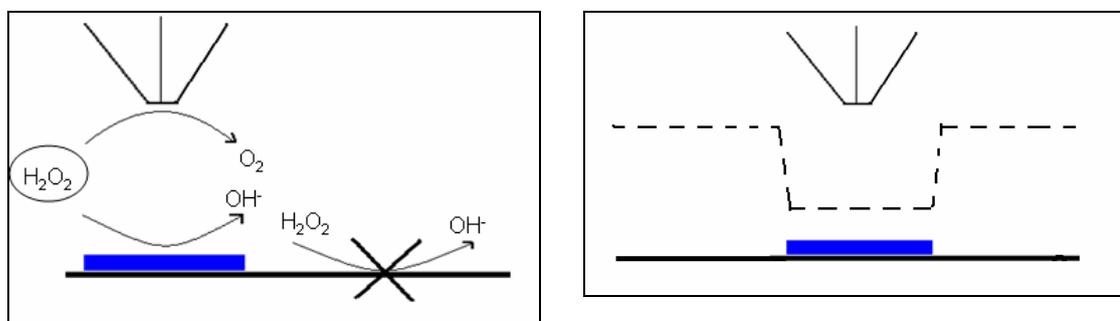


Figura 4.42 – Sinistra: rappresentazione schematica del principio alla base della visualizzazione dell'attività elettrocatalitica di PB depositato su GC, in modalità RC-SECM. Destra: profilo di corrente atteso.

La CV di caratterizzazione riportata in Figura 4.38 mostra che, a potenziali più negativi di +0.1 V, PB si trova nella sua forma ridotta, elettrocataliticamente attiva. Sono stati scelti due potenziali per il substrato, ossia +0.50 e -0.50 V, per verificare l'influenza del potenziale applicato al GC modificato sulla corrente di tip. Ci si attendeva che la diminuzione di corrente in corrispondenza dello spot attivo fosse più marcata a -0.50 V, essendo la riduzione elettrocatalitica di H_2O_2 più veloce che a +0.50 V.

Quanto ottenuto sperimentalmente si è dimostrato in accordo con i risultati attesi (Figure 4.43 - 4.45).

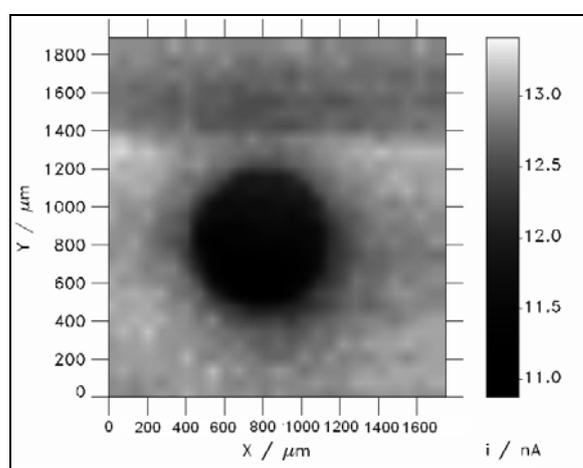


Figura 4.43 – Scansione SECM (corretta per sottrazione di background) di spot di PB depositato su GC. $E_{GC} = -0.05$ V vs. Ag/AgCl. Soluzione: PBS 0.1 M a pH 6.0 + H_2O_2 1 mM. Distanza tip/substrato = 10 μm, velocità di scansione = 35 μm/s, RG tip = 4.5.

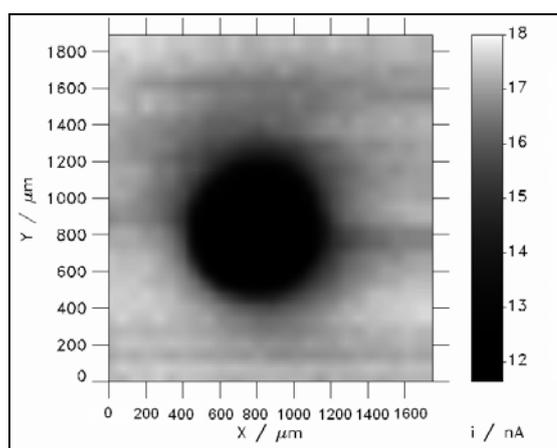


Figura 4.44 – Scansione SECM (corretta per sottrazione di background) di spot di PB depositato su GC. $E_{GC} = +0.05$ V vs. Ag/AgCl. Soluzione: PBS 0.1 M a pH 6.0 + H_2O_2 1 mM. Distanza tip/substrato = 10 μm, velocità di scansione = 35 μm/s, RG tip = 4.5.

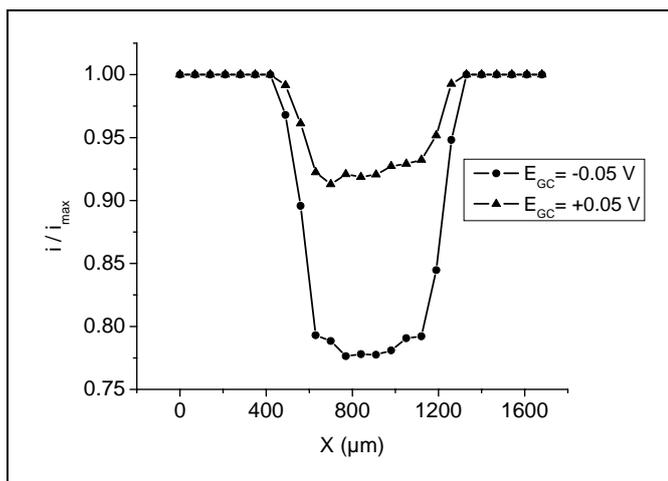


Figura 4.45 – Confronto dei profili di corrente registrati attraverso gli spot di PB per $E_{GC} = -0.05 V$ (cerchi) e $+0.05 V$ (triangoli) vs. Ag/AgCl.

4.3.3.3. Visualizzazione dell'attività elettrocatalitica di Blu di Prussia in presenza di enzima GOx (GC/PB/GOx)

Lo stesso principio descritto nel precedente paragrafo, ossia rivelazione di H_2O_2 alla tip per ossidazione e competizione da parte di PB per riduzione, è stato applicato ad un campione più complesso. L'idea di base era quella di produrre H_2O_2 localmente, invece di aggiungerla a PBS prima dell'inizio della scansione. Questo obiettivo poteva essere raggiunto immobilizzando un enzima appartenente alla classe delle ossidasi direttamente sullo spot di PB: in presenza di O_2 , l'ossidazione del substrato enzimatico avrebbe portato localmente alla formazione di H_2O_2 . Come elemento biologico è stato scelto un enzima modello, la glucosio ossidasi (GOx).

Per immobilizzare stabilmente l'enzima ed impedire che venisse rilasciato in soluzione per effetto della lunga permanenza in soluzione (i tempi di scansione nella SECM spesso superano le 2 ore) e degli effetti convettivi, seppur minimi, causati dal movimento della tip, è stato impiegato il polimero commerciale Resydrol.

L'obiettivo consisteva nel verificare come l'attività elettrocatalitica del PB sottostante l'enzima influenzasse la quantità di H_2O_2 in grado di raggiungere la tip. Per riuscire a visualizzare l'effetto della competizione da parte dello spot attivo di PB, si è pensato di istituire un confronto fra due scansioni sequenziali. Nella prima prova si sarebbe applicato al campione un potenziale a cui il Blu di Prussia non fosse attivo: in questo caso, per aggiunta di glucosio, era prevedibile che la quantità di H_2O_2 rivelata alla tip fosse la massima possibile. Questo schema coincide, in pratica, con quello di un esperimento SECM in modalità SG/TC. Nella seconda prova si sarebbe applicato un

potenziale a cui lo spot fosse elettrocataliticamente molto attivo, quindi esercitasse una energica azione di competizione nei confronti della tip: ci si attendeva una corrente di ossidazione inferiore, rispetto a quella della prima prova (Figura 4.46).

L'informazione sulla attività elettrocatalitica può essere estratta solo per confronto fra le due prove, perchè l'incremento di corrente atteso in corrispondenza dello spot è differente, ma il profilo di corrente è identico.

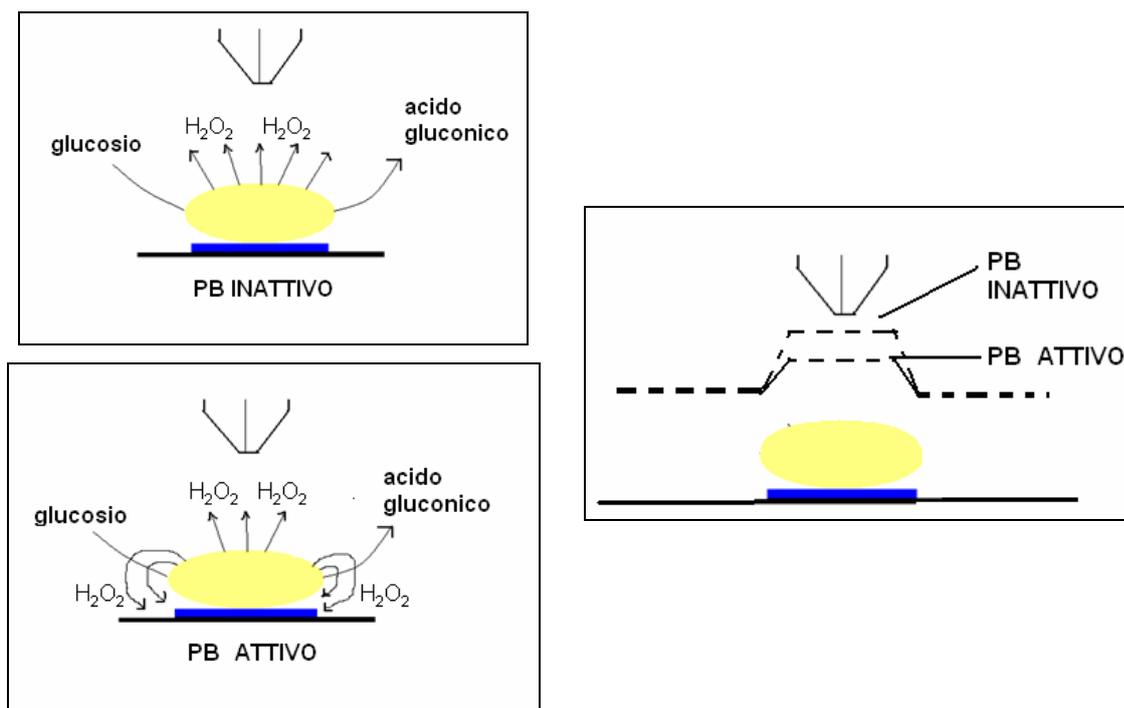


Figura 4.46 – Sinistra: rappresentazione schematica della modalità RC-SECM impiegata per la visualizzazione dell'attività elettrocatalitica di PB, depositato su GC in presenza di GOx. Destra: profili di corrente attesi.

Sono state testate diverse condizioni sperimentali, fino a giungere ad un risultato soddisfacente, in pieno accordo con le previsioni teoriche formulate:

1. Rivelazione con potenziale costante

Alla tip è stato applicato un potenziale costante pari a +0.6 V vs. Ag/AgCl. Al substrato sono stati applicati i potenziali di +0.25 V, a cui il PB è inattivo, e -0.05 V, a cui il PB esercita l'azione di competizione verso la tip.

Le scansioni effettuate per i due diversi valori di potenziale applicato al substrato e il confronto degli incrementi di corrente attraverso lo spot sono riportati nelle Figure 4.47 - 4.49.

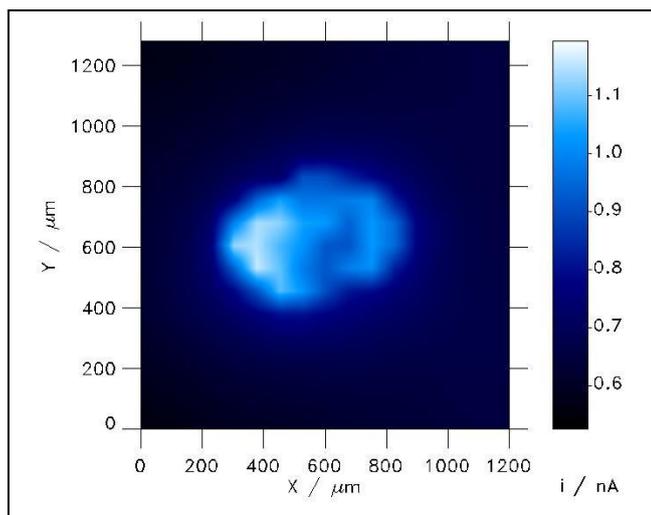


Figura 4.47 – Scansione SECM (corretta per sottrazione di background) di spot di PB depositato su GC in presenza di GOx. $E_{GC} = +0.25$ V vs. Ag/AgCl; $E_T = +0.6$ V = costante. Soluzione: PBS 0.1 M a pH 6.0 + glucosio 10 mM. Distanza tip/substrato = 10 μm, velocità di scansione = 40 μm/s, RG tip = 4.5.

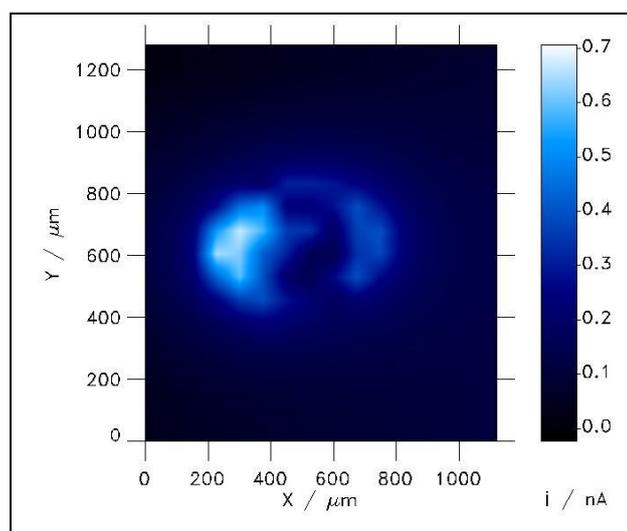


Figura 4.48 – Scansione SECM (corretta per sottrazione di background) di spot di PB depositato su GC in presenza di GOx. $E_{GC} = -0.05$ V vs. Ag/AgCl; $E_T = +0.6$ V = costante. Soluzione: PBS 0.1 M a pH 6.0 + glucosio 10 mM. Distanza tip/substrato = 10 μm, velocità di scansione = 40 μm/s, RG tip = 4.5.

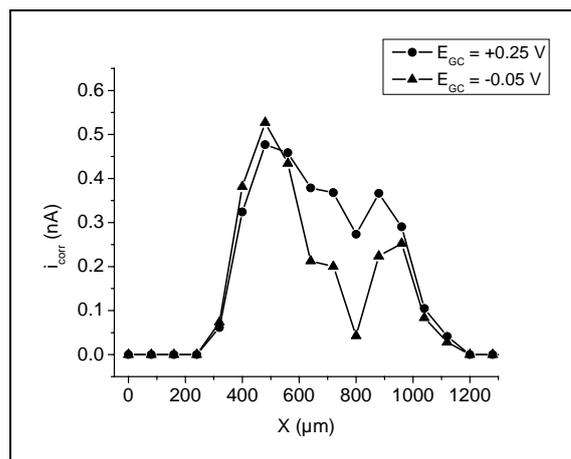


Figura 4.49 – Confronto dei profili di corrente registrati attraverso gli spot di PB per $E_{GC} = -0.05 V$ (triangoli) e $+0.25 V$ (cerchi) vs. Ag/AgCl.

2. Rivelazione con profilo di potenziale a impulsi

Dopo il primo promettente risultato, si è passati alla rivelazione di H_2O_2 alla tip con un profilo di impulsi di potenziale semplice, già impiegato in precedenza, costituito da un potenziale di base e uno di acquisizione.

L'immagine ottenuta dopo una scansione non ha, però, evidenziato alcuna variazione di corrente, rispetto a quella di background.

Questo risultato può essere facilmente compreso pensando che la tip, posizionata a piccola distanza dalla superficie del campione, esercita una azione di “schermo” per la diffusione dei reagenti verso l'enzima (Figura 4.50). Nelle condizioni sperimentali adottate, la concentrazione di O_2 (co-substrato enzimatico) disciolto in soluzione era bassa e l'accesso del glucosio (substrato enzimatico) al sito attivo della GOx difficoltoso: la velocità di reazione era limitata e la quantità di H_2O_2 che riusciva a raggiungere la tip scarsa.

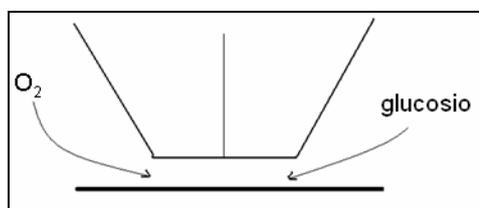


Figura 4.50 – Rappresentazione schematica dell'effetto di schermo esercitato dall'involucro di vetro della tip nei confronti dell'accesso di O_2 e glucosio al sito attivo enzimatico.

3. Rivelazione con profilo di potenziale a impulsi modificato e concentrazione di glucosio incrementata

Per le motivazioni esposte, le condizioni sperimentali sono state modificate, aumentando la concentrazione di glucosio in soluzione da 10 a 100 mM. Anche lo schema di rivelazione è stato migliorato (Figura 4.51): un breve impulso di potenziale a +1.2 V (E_{inj}) è stato aggiunto prima della fase di acquisizione, per fornire una “iniezione locale” di O_2 per ossidazione dell'acqua.

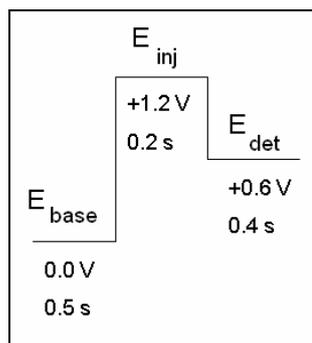


Figura 4.51 – Profilo di impulsi di potenziale ottimizzato per la visualizzazione dell'attività elettrocatalitica di spot di PB+GOx in modalità RC-SECM.

I potenziali applicati al substrato sono +0.4 V (PB inattivo) e -0.05 V (PB attivo).

Le scansioni SECM ottenute in queste condizioni sperimentali e i profili di corrente corrispondenti sono riportati nelle Figure 4.52 – 4.54.

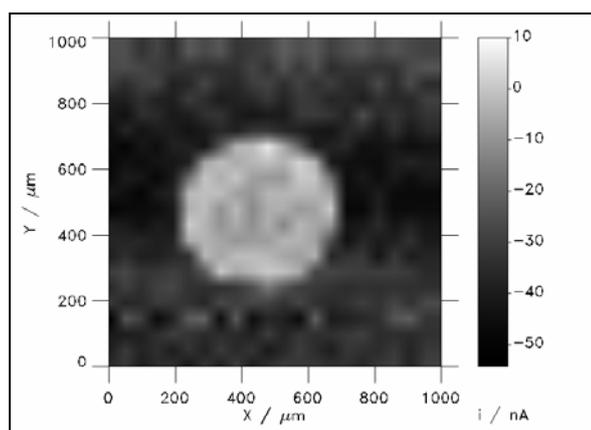


Figura 4.52 – Scansione SECM (corretta per sottrazione di background) di spot di PB depositato su GC in presenza di GOx. $E_{GC} = +0.40$ V vs. Ag/AgCl. Soluzione: PBS 0.1 M a pH 6.0 + glucosio 100 mM. Distanza tip/substrato = 10 μm , velocità di scansione = 25 $\mu m/s$, RG tip = 4.5.

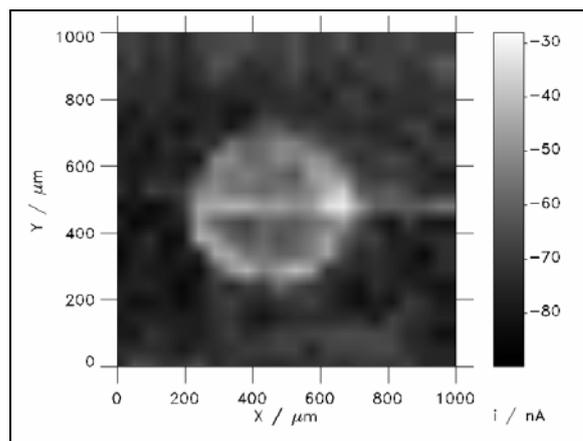


Figura 4.53 – Scansione SECM (corretta per sottrazione di background) di spot di PB depositato su GC in presenza di GOx. $E_{GC} = -0.05$ V vs. Ag/AgCl. Soluzione: PBS 0.1 M a pH 6.0 + glucosio 100 mM. Distanza tip/substrato = 10 μm , velocità di scansione = 25 $\mu\text{m/s}$, RG tip = 4.5.

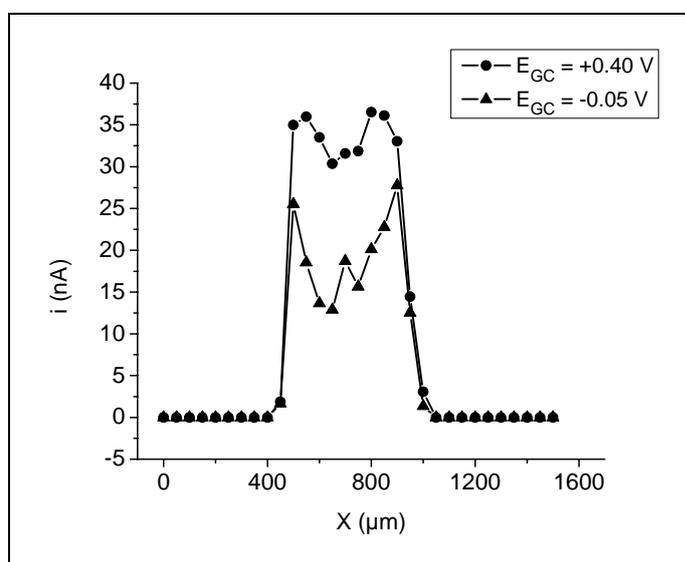


Figura 4.54 – Confronto dei profili di corrente registrati attraverso gli spot di PB+GOx per $E_{GC} = -0.05$ V (triangoli) e +0.40 V (cerchi) vs. Ag/AgCl.

4.3.3.4. Campione (GC/PB/GOx) con configurazione ottimizzata

La valutazione dell'attività elettrocatalitica, tramite esperimenti condotti in sequenza, presenta però degli svantaggi.

Il primo consiste nella necessità di sostituire la soluzione di PBS fra una misura e l'altra. Questo accorgimento è reso necessario dal fatto che, con il trascorrere del tempo di misura, H_2O_2 diffonde lentamente dallo strato di soluzione sovrastante il biospot verso il bulk. Maggiore è il tempo di misura, maggiore è la quantità di H_2O_2 rivelata anche in corrispondenza del GC non modificato: il risultato è una graduale

variazione della corrente di background, che falsa la determinazione dell'incremento di corrente sopra il biospot.

Il secondo svantaggio risiede nella modulazione delle proprietà del film polimerico per rigonfiamento ("swelling"), che si verifica durante il lungo tempo di immersione in soluzione. Questo fenomeno modifica la topografia dello spot e la diffusione dei reagenti e dei prodotti attraverso il film polimerico fra una misura e l'altra.

Come esempio, si riportano (Figura 4.55) due scansioni di un campione GC/PB/GOx+Resydrol, polarizzato in entrambi i casi a +0.25 V, eseguite a distanza di alcune ore l'una dall'altra. Si nota chiaramente come, per immersione nella soluzione di misura, il polimero abbia subito un notevole rigonfiamento, che ha consentito un più facile accesso del glucosio al sito attivo enzimatico e condotto ad un maggiore apporto di H₂O₂ alla tip.

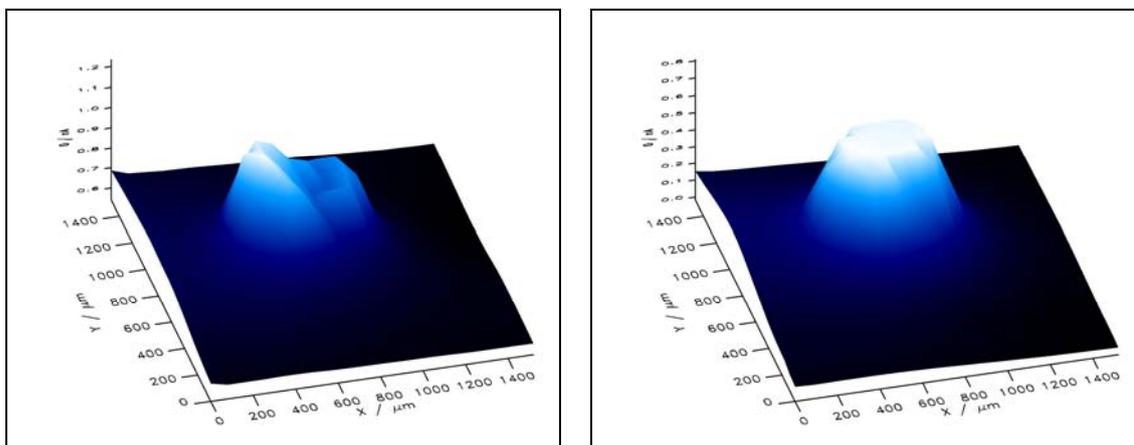


Figura 4.55 – Scansioni SECM (corrette per sottrazione di background) di spot di PB depositato su GC in presenza di GOx: l'immagine di destra è stata realizzata alcune ore dopo quella di sinistra. $E_{GC} = +0.25$ V vs. Ag/AgCl; $E_T = +0.6$ V = costante. Soluzione: PBS 0.1 M a pH 6.0 + glucosio 10 mM. Distanza tip/substrato = 10 μ m, velocità di scansione = 40 μ m/s, RG tip = 4.5.

Per superare le limitazioni descritte sopra, la GOx è stata immobilizzata con il Resydrol in modo tale da coprire allo stesso tempo sia lo spot di PB, sia una porzione di GC non modificato. Con questa configurazione, applicando al campione un potenziale in cui PB è elettrocataliticamente attivo si sarebbe ricavata l'informazione analitica in una sola scansione. Il profilo atteso, riportato in Figura 4.56, mostra che la corrente dovrebbe essere più alta in corrispondenza del biofilm che ricopre il GC non modificato, minore in corrispondenza del biofilm sovrastante lo spot di PB. In ogni caso, la corrente registrata in corrispondenza dello spot (zone 2 e 3 in Figura 4.56) è sempre superiore al background (zona 1).

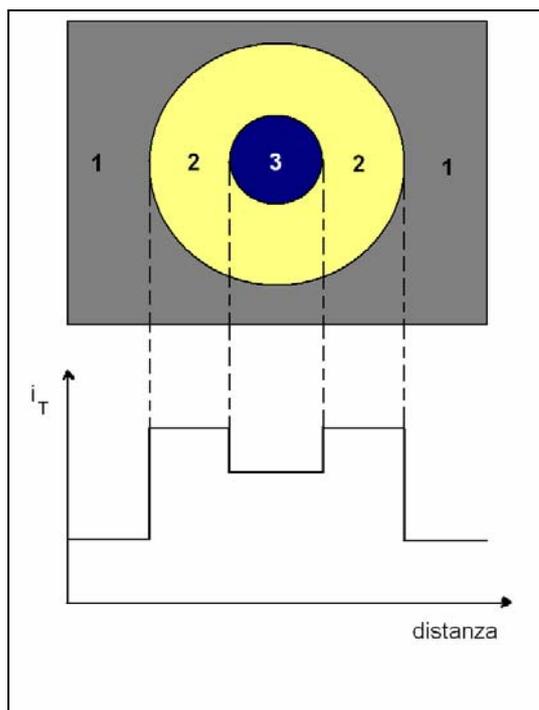


Figura 4.56 – Profilo di corrente atteso per una configurazione del biospot del tipo rappresentato schematicamente nel disegno.

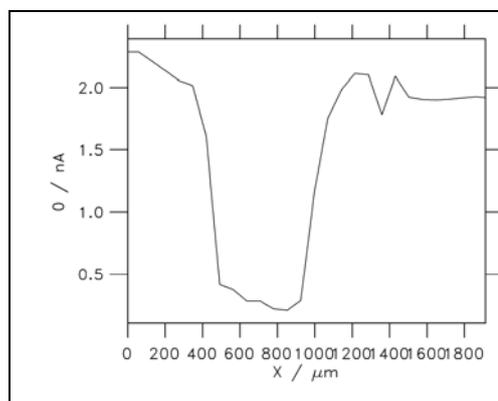
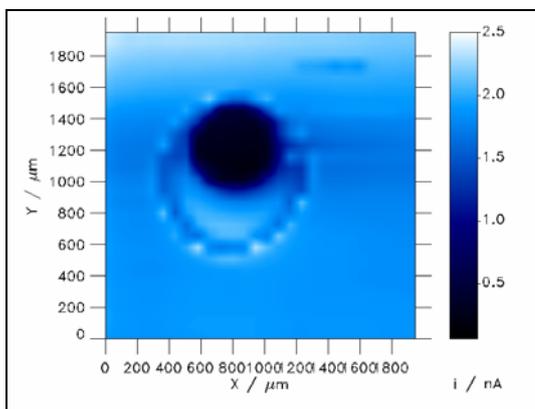
Per evitare l'effetto di accumulo nel bulk di H_2O_2 prodotta enzimaticamente, che conduce ad un aumento della corrente di background e diminuisce il contrasto di corrente fra il GC non modificato e lo spot enzimatico, si è tratto spunto da un'idea proposta da un lavoro della letteratura [7]. Si è pensato di sfruttare la reazione omogenea di disproporzionamento di H_2O_2 in H_2O e O_2 , catalizzata dall'enzima catalasi. La concentrazione di catalasi è stata scelta opportunamente mediante scansioni di prova veloci: una concentrazione troppo bassa non avrebbe sortito alcun effetto, mentre una troppo alta avrebbe soppresso anche il segnale dovuto ad H_2O_2 in corrispondenza dello spot enzimatico.

In aggiunta, il potenziale applicato al substrato è stato scelto in modo che l'attività elettrocatalitica di PB non fosse troppo alta, altrimenti l'azione di competizione nei confronti della tip sarebbe stata troppo drastica e il profilo di corrente attraverso lo spot non avrebbe avuto significato fisico.

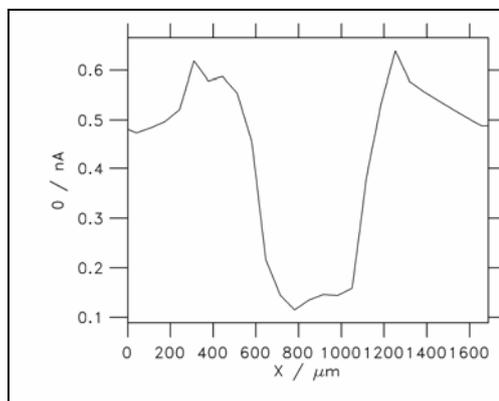
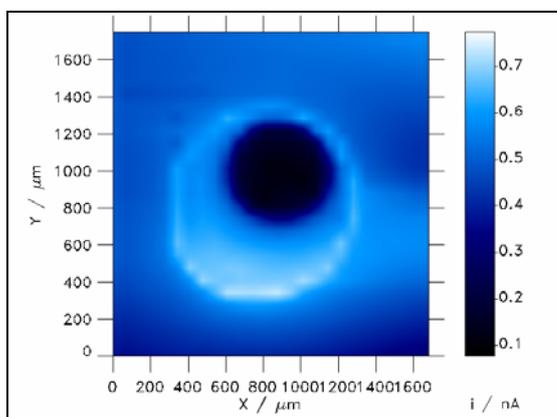
La rivelazione è stata condotta a potenziale costante, a +0.6 V vs. SCE, per evitare l'aumento del livello di rumore provocato dal profilo di potenziale a impulsi.

Le immagini riportate di seguito (Figura 4.57) mostrano l'aspetto delle scansioni per diversi valori di concentrazione di catalasi e di potenziale applicato al substrato.

$E_{GC} = -0.05 \text{ V}$, catalasi $3.0 \cdot 10^{-4} \text{ mg/mL}$



$E_{GC} = +0.175 \text{ V}$, catalasi $3.0 \cdot 10^{-4} \text{ mg/mL}$



$E_{GC} = +0.175 \text{ V}$, catalasi $2.0 \cdot 10^{-4} \text{ mg/mL}$

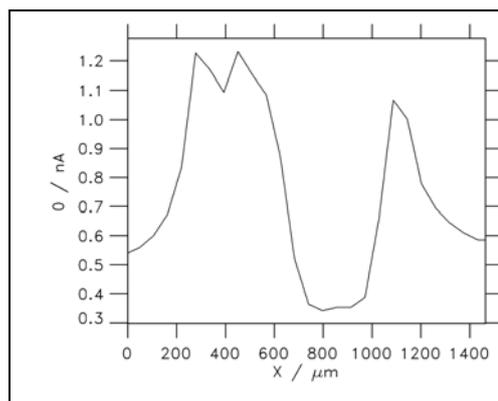
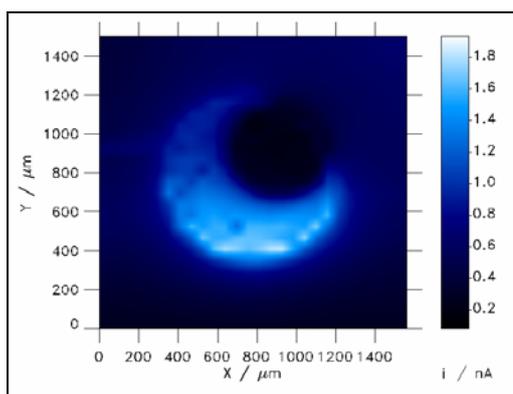


Figura 4.57 – Immagini a sinistra: scansioni SECM (corrette per sottrazione di background) di spot di PB depositato su GC in presenza di GOx; $E_T = +0.6 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ = costante; altri parametri sperimentali indicati vicino alle scansioni. Soluzione: PBS 0.1 M a pH 6.0 + glucosio 100 mM. Distanza tip/substrato = 15 μm , velocità di scansione = 35 $\mu\text{m/s}$, RG tip = 4.5. Immagini a destra: profili di corrente corrispondenti.

La modulazione dei parametri sperimentali ha condotto alla seguente combinazione ottimale (Figura 4.58): potenziale applicato al substrato pari a +0.275 V, concentrazione di catalasi uguale a $3.0 \cdot 10^{-4}$ mg/mL.

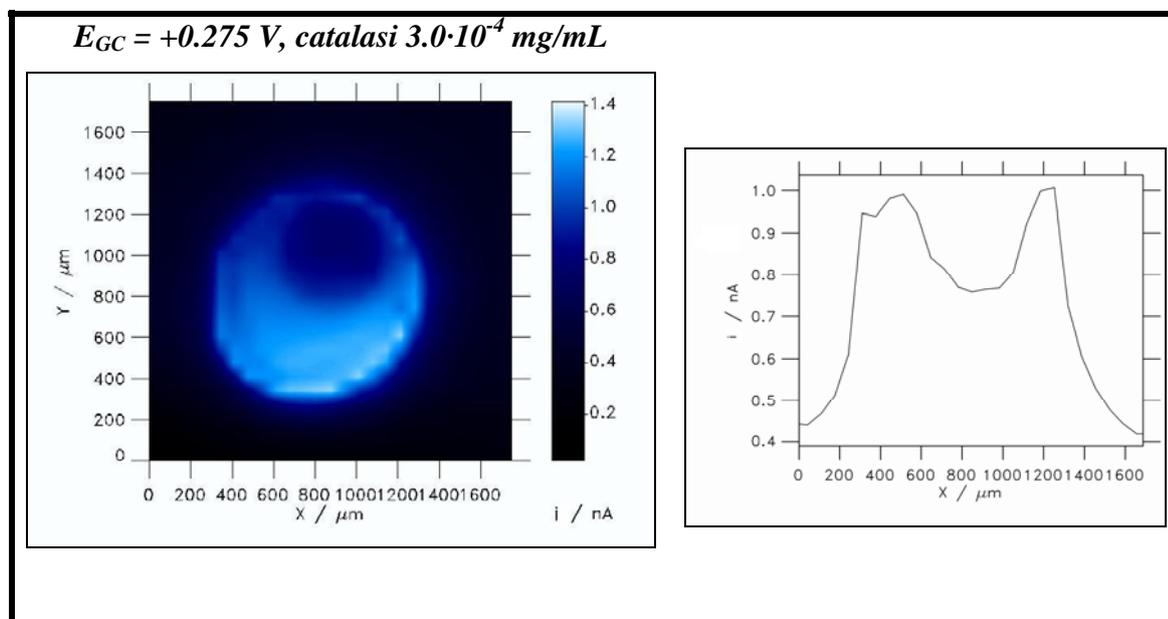


Figura 4.58 – A sinistra: scansione SECM (corretta per sottrazione di background) di spot di PB depositato su GC in presenza di GOx. $E_T = +0.6$ V vs. Ag/AgCl= costante. Soluzione: PBS 0.1 M a pH 6.0 + glucosio 100 mM. Distanza tip/substrato = 15 μm, velocità di scansione = 35 μm/s, RG tip = 4.5. A destra: profilo di corrente corrispondente.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. J. Bard, M. V. Mirkin, Scanning Electrochemical Microscopy, Marcel Dekker, New York, 2001.
- [2] A.A. Karyakin, Electroanalysis 2001, 13, 813.
- [3] J.A. Ibers, N. Davidson, J. Am. Chem. Soc. 1951, 73, 476.
- [4] F. Ricci, G. Paleschi, Biosens. Bioelectron. 2005, 21, 389.
- [5] A.A. Karyakin, E.E. Karyakina, L. Gorton, Electrochem. Commun. 1999, 1, 78.
- [6] S. Ganguli, M. Battacharya, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1 1983, 79, 1513.
- [7] G. Wittstock, W. Schuhmann, Anal. Chem. 1997, 69, 50.

4.4. SUPERFICI ELETTRODICHE MODIFICATE CON IDROTALCITI PER LA PROGETTAZIONE DI BIOSENSORI PER IL LATTATO

Lo sviluppo di metodi per la determinazione del lattato riveste un ruolo di grande importanza in campo alimentare, dal punto di vista sia dell'analisi di prodotti finiti, sia del controllo di qualità di processi produttivi. Poichè tale analita è coinvolto nei processi di fermentazione, la sua determinazione consente di valutare la qualità di latte e prodotti caseari in genere, di frutta, verdura e vini [1,2]. Inoltre, è noto che il lattato è associato a diverse situazioni cliniche patologiche, quali shock settico, disordini metabolici, stato di scarsa ossigenazione dei tessuti [2,3], quindi la determinazione della sua concentrazione nel sangue è di rilievo nella diagnostica clinica, nel corso di operazioni chirurgiche e nella medicina dello sport.

La maggior parte dei metodi analitici convenzionali, come la cromatografia, richiede tempi lunghi di analisi e necessita di pretrattamento di campione. In questa prospettiva, l'impiego di biosensori appare conveniente, perchè consente di effettuare una determinazione semplice, rapida e accurata di analiti in matrici reali senza bisogno di pretrattamento del campione, e a costi contenuti [4].

Nella fabbricazione di biosensori per il lattato, possono essere impiegati due enzimi: la lattato ossidasi (LOx) e la lattato deidrogenasi (LDH). La LOx è generalmente preferita perché, a differenza della LDH, è un enzima che non richiede la presenza del cofattore NAD^+ in soluzione, così che il costo dell'analisi risulta ridotto [5].

In letteratura sono stati riportati diversi metodi di immobilizzazione della lattato ossidasi, fra i quali la reticolazione con glutaraldeide e l'intrappolamento in sistemi sol-gel o matrici polimeriche [6-10].

In questo lavoro di tesi si è provato, per la prima volta, ad immobilizzare la LOx su una matrice idrotalcitica, per sfruttarne le caratteristiche, già descritte nella sezione introduttiva, che le rendono modificanti elettrodeiche ottimali per il supporto di sistemi enzimatici nella progettazione di biosensori [11-14]. Sono quindi state valutate le prestazioni del biosensore per la determinazione del lattato in ossidazione, con

particolare riguardo alla selettività e alla possibilità di rivelare l'analita in matrici reali complesse.

4.4.1. OTTIMIZZAZIONE DELLA CONFIGURAZIONE DEL BIOSENSORE E MESSA A PUNTO DEI PARAMETRI OPERATIVI

Il biosensore consiste in un film di idrotalcite (Ni/Al-HT), depositato su una superficie di Pt, che svolge la funzione di supporto per l'enzima LOx. Una membrana esterna copre il biofilm per impedire il rilascio della biomolecola in soluzione. Il meccanismo di rivelazione è basato sulla corrente generata dalla ossidazione (o riduzione) del perossido di idrogeno prodotto in presenza di O₂ durante la reazione enzimatica. Il biosensore può essere classificato come di I generazione, poichè H₂O₂ è rivelata direttamente alla superficie elettrodica, senza che alcun mediatore intervenga nel decorso del processo complessivo. Nelle condizioni sperimentali impiegate, l'HT non svolge alcuna azione catalitica, poichè agisce solo da modificante del Pt, aumentandone l'idrofilicità e la rugosità a livello microscopico, e limitando l'effetto di avvelenamento ("fouling") causato da H₂O₂, così da permettere l'ottenimento di un responso con alto rapporto segnale/rumore [14].

Per ottimizzare le condizioni operative di impiego del biosensore, si è utilizzata la membrana BSA+GA, la cui preparazione è descritta nella *Parte Sperimentale* (elettrodo Pt/HT/LOx/BSA+GA).

La scelta del potenziale operativo è stata condotta in base al responso voltammetrico del biosensore in PBS 0.1 M, a pH 7.0, in assenza e in presenza di lattato (ad una concentrazione di 0.05 mM). Come si può osservare in Figura 4.59, l'unico picco visibile è quello centrato attorno a 0.0 V vs. SCE, originato dalla riduzione di PtO, formatosi sulla superficie del Pt a potenziali più positivi. In seguito all'aggiunta di lattato, si osserva un incremento di corrente anodica nell'intervallo di potenziali compresi tra +0.25 e +0.70 V, ma si verifica anche un aumento della corrente catodica a potenziali inferiori a +0.2 V.

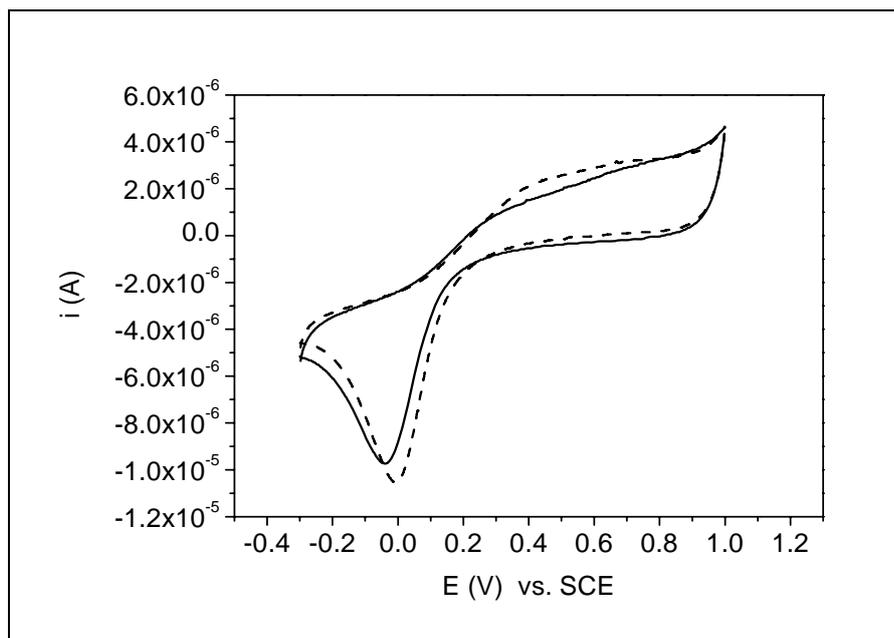


Figura 4.59 – CV registrata in assenza (linea continua) e in presenza (linea tratteggiata) di lattato (0.05 mM in PBS 0.1 M, pH 7.0), a 50 mV/s. Elettrodo: Pt/HT/LOx/BSA+GA.

Per questo motivo, sono state condotte prove cronoamperometriche a diversi potenziali, per determinare il lattato sia in ossidazione sia in riduzione. L'andamento della sensibilità di risposta in funzione del potenziale di lavoro è riportato in Figura 4.60. Poichè la risposta in riduzione era caratterizzata da scarsissima sensibilità, si è optato per la rivelazione in ossidazione. Si è scelto un potenziale pari a +0.35 V per i successivi test, perchè potenziali più positivi non consentono di ottenere un incremento di sensibilità particolarmente significativo, aumentando invece la probabilità di incorrere nella rivelazione di composti interferenti. Il valore di +0.35 V rappresenta, dunque, il miglior compromesso fra sensibilità e selettività.

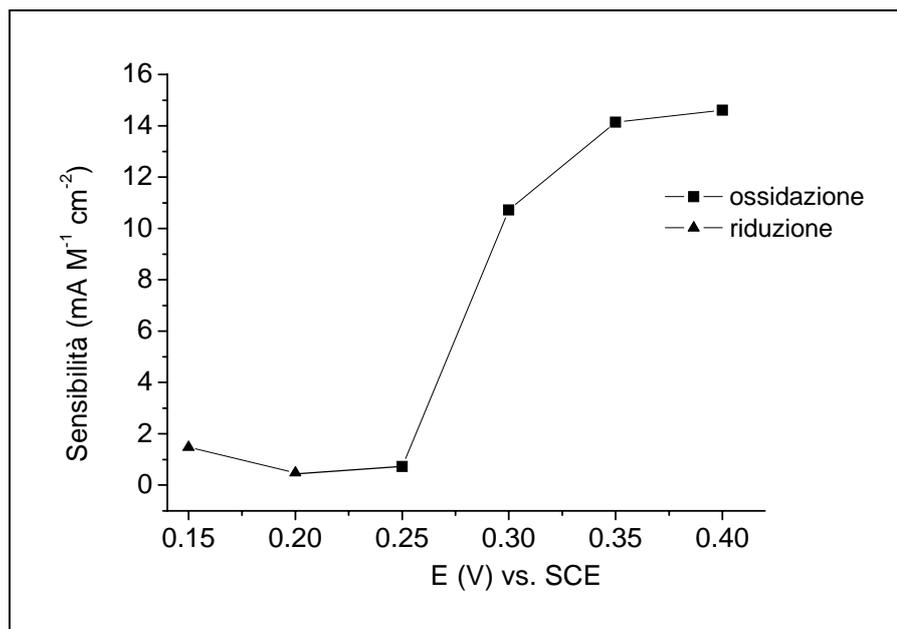


Figura 4.60 – Sensibilità di risposta di un elettrodo Pt/HT/LOx/BSA+GA in funzione del potenziale di lavoro, per la rivelazione in ossidazione (quadrati) e in riduzione (triangoli).

Il ruolo dell'HT è risultato di fondamentale importanza nel garantire un buon responso cronopotamperometrico. Provando a immobilizzare la LOx direttamente sulla superficie di Pt, senza la presenza del film di HT (elettrodo Pt/LOx/BSA+GA), si ottenuto un segnale instabile e rumoroso. Un confronto con il segnale registrato in presenza di HT è riportato in Figura 4.61.

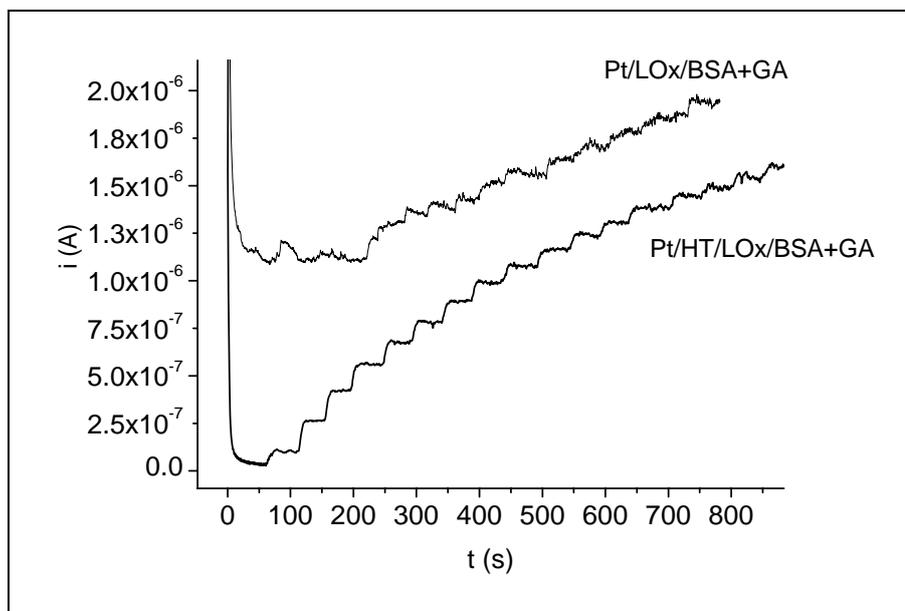


Figura 4.61 – Confronto dei responsi cronopotamperometrici registrati con gli elettrodi Pt/LOx/BSA+GA (aggiunte di lattato da 0.05 mM ciascuna) e Pt/HT/LOx/BSA+GA (1° aggiunta di lattato da 20 μ L, successive da 50 μ L), a +0.35 V vs. SCE, in 20 mL di PBS 0.1 M, pH 7.0.

4.4.2. PRESTAZIONI DEL BIOSENSORE PER IL LATTATO E STUDIO DI INTERFERENTI

Le prestazioni del biosensore, in termini di intervallo di risposta lineare e sensibilità, sono state valutate per via cronoamperometrica a +0.35 V vs. SCE, effettuando aggiunte successive di lattato ad una soluzione PBS a pH 7.0.

Per valutare la selettività, si è studiata la risposta di alcuni interferenti. Si tratta di composti facilmente ossidabili, comunemente presenti in matrici reali, la cui ossidazione decorre direttamente sulla superficie elettrodeica e produce un contributo di corrente che porta a una sovrastima della concentrazione di lattato in soluzione. Nella prospettiva di impiego del biosensore per la determinazione del lattato in matrici alimentari e nel sangue, sono stati scelti, come esempi di interferenti, l'acido ascorbico (AA, una vitamina idrosolubile presente ad alte concentrazioni negli agrumi e impiegato come antiossidante negli alimenti), l'acetaminofene (AP, un comune analgesico), e l'acido urico (UA).

Per confronto, è stato realizzato un biosensore impiegante, come membrana di immobilizzazione, il polimero Nafion (elettrodo con configurazione abbreviabile come *Pt/HT/LOx/Nafion*), per verificare se l'utilizzo di questo scambiatore cationico permettesse la riduzione dell'interferenza da parte dei composti anionici.

La modalità di svolgimento dello studio di interferenti e la procedura di valutazione dei risultati sono descritte nella sezione *Parte Sperimentale*.

Il Nafion si è dimostrato efficace nella riduzione delle interferenze da parte di composti facilmente ossidabili. In più, si sono ottenuti una sensibilità di risposta più alta e un intervallo di risposta lineare più ampio, rispetto a quelli tipici dell'elettrodo basato sul sistema BSA+GA. Tale risultato indica che la membrana basata sul Nafion è, probabilmente, in grado di immobilizzare una quantità maggiore di enzima.

Di seguito si riportano, per gli elettrodi *Pt/HT/LOx/BSA+GA* e *Pt/HT/LOx/Nafion*, i responsi cronoamperometrici al lattato e le relative curve di calibrazione (Figura 4.62 A,B), gli studi di interferenza (Figure 4.63) e una tabella riassuntiva di confronto delle prestazioni dei due biosensori (Tabella 11). È comunque doveroso specificare che la riproducibilità dei biosensori, in entrambi i casi, è risultata poco soddisfacente, a causa della modalità di preparazione degli elettrodi. Poiché l'enzima, venduto in forma di liofilizzato, ha un costo commerciale molto alto, non è stato possibile intrappolarlo nella matrice di HT per elettrosintesi, procedura che, applicata all'enzima GOx, ha invece

garantito ottimi risultati dal punto di vista della riproducibilità [15], ma si è dovuto optare per la deposizione di una sua sospensione acquosa su una superficie elettrodica su cui era stata in precedenza elettrosintetizzata l'idrotalcite.

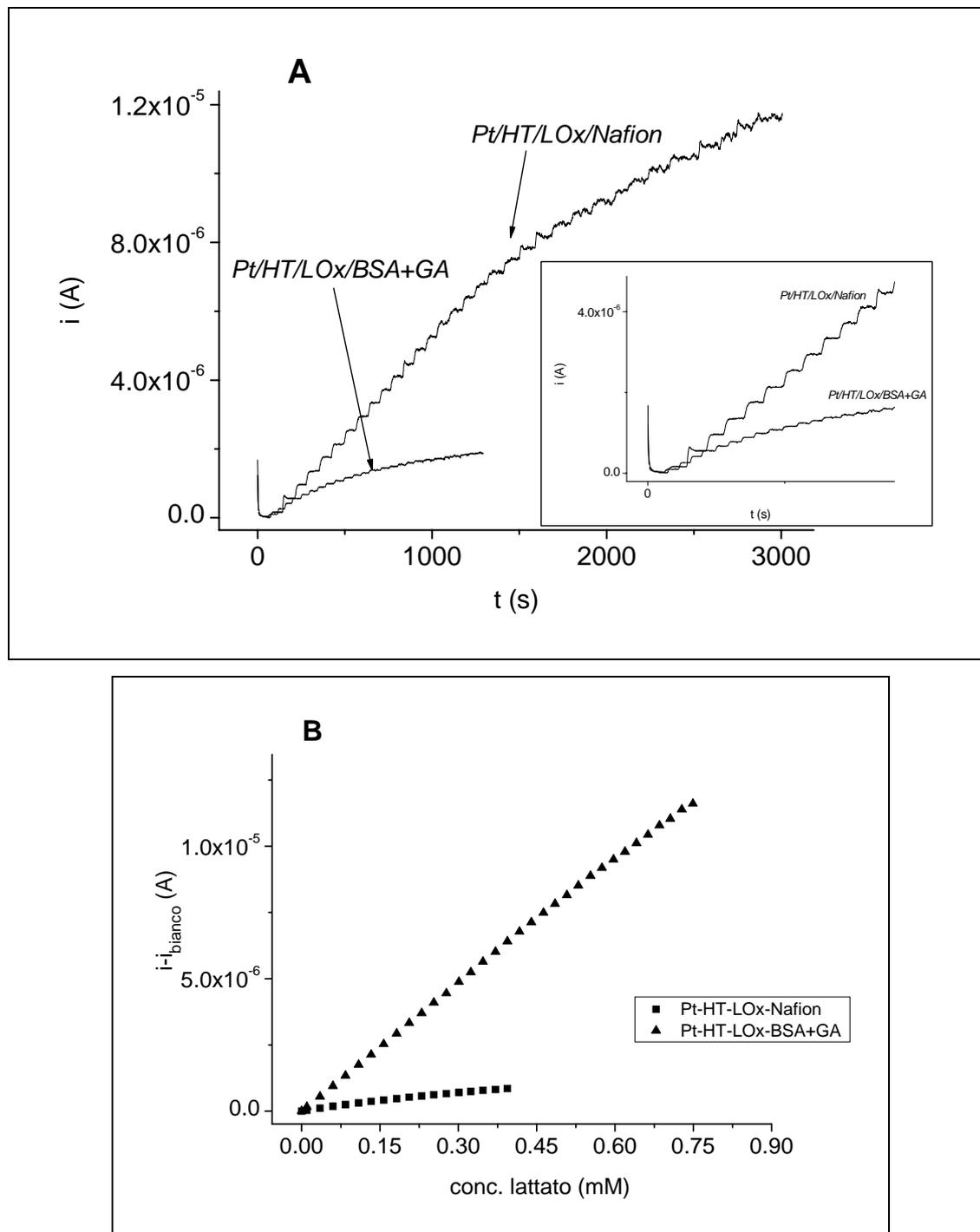


Figura 4.62 – A: Risposte cronoamperometriche al lattato degli elettrodi Pt-HT-LOx-BSA+GA e Pt-HT-LOx-Nafion a +0.35 V vs. SCE. Aggiunte di lattato 0.01 M (1^a : 20 μ L; successive: 50 μ L) a 20 mL di PBS 0.1 M, pH 7.0. L'insero mostra un ingrandimento della porzione del grafico compresa entro i primi 1000 s di analisi. B: Grafici di calibrazione (corrente corretta per sottrazione del bianco vs. concentrazione di lattato) corrispondenti ai responsi mostrati in A.

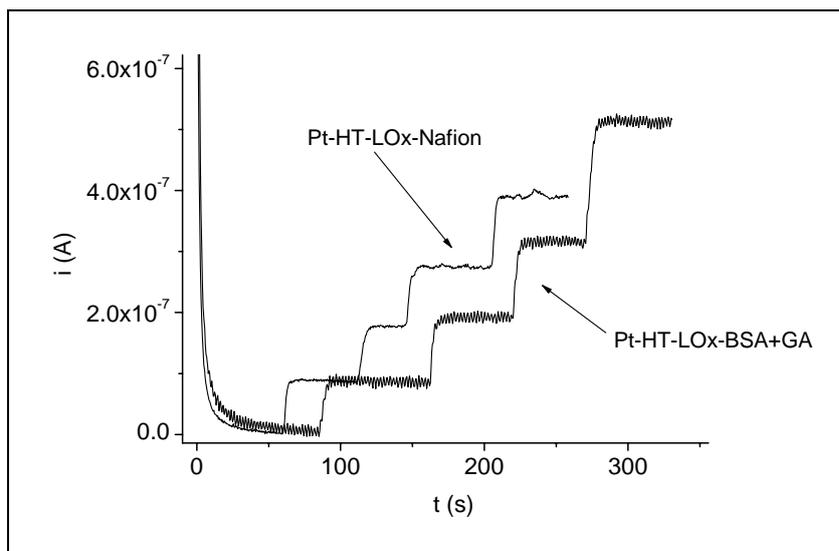


Figura 4.63– Confronto fra i responsi degli elettrodi Pt-HT-LOx-BSA+GA e Pt-HT-LOx-Nafion per lo studio della risposta degli interferenti. Il primo incremento di corrente corrisponde ad una concentrazione di lattato pari a 0.01 mM. I successivi 3 incrementi di corrente sono relativi ad aggiunte di miscele equimolari di lattato e composto interferente (entrambi 0.01 mM): AP (primo), UA (secondo), AA (terzo). I valori di corrente registrati dall'elettrodo Pt-HT-LOx-Nafion sono stati normalizzati rispetto all'incremento di corrente prodotto dal lattato nell'elettrodo Pt-HT-LOx-BSA+GA, preso come segnale di riferimento.

SENSORE	INTERVALLO DI RISPOSTA LINEARE (L.O.D.-L.O.L. *)	SENSIBILITÀ ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	RISPOSTA INTERFERENTI
Pt/HT/LOx/BSA+GA	32 μM - 0.2 mM	50	0.01 mM LA +0.01 mM AP: +32%; +0.01 mM UA: +50%; +0.01 mM AA: +137%
Pt/HT/LOx/Nafion	14 μM - 0.8 mM	91	0.01 mM LA +0.01 mM AP: +8%; +0.01 mM UA: +16%; +0.01 mM AA: +34%

Tabella 11 – Tabella riassuntiva delle prestazioni dei biosensori Pt-HT-LOx-BSA+GA e Pt-HT-LOx-Nafion.

*L.O.L. = limite di linearità.

4.4.3. TEST PRELIMINARE DI APPLICAZIONE AD UN CAMPIONE REALE

La possibilità di utilizzare il biosensore per la rivelazione del lattato in campioni reali è stata verificata analizzando un campione di siero bovino, come esempio di matrice complessa, impiegando un elettrodo di tipo Pt-HT-LOx-Nafion. Il siero non

conteneva lattato, secondo i dati di composizione dichiarati nel certificato di analisi allegato, pertanto il campione da analizzare è stato addizionato di lattato.

La determinazione è stata effettuata in cronoamperometria, sotto agitazione, secondo la seguente procedura operativa. Si è immerso un elettrodo appena preparato in una soluzione di siero bovino non contenente lattato, diluito con la soluzione tampone a pH 7.0, si è applicato il potenziale di lavoro e si è registrata la corrente anodica, fino a quando il segnale è risultato moderatamente stabile (nella matrice complessa si assisteva ad una deriva piuttosto marcata della linea di base). Si è presa questa corrente come segnale di background. A questo punto è stata aggiunta una singola aliquota di acido lattico, corrispondente ad una concentrazione pari a 0.02 mM, e si è registrato il conseguente incremento di corrente.

È stato preparato un secondo campione, aggiungendo direttamente acido lattico a 1 mL di siero bovino fino ad una concentrazione 0.4 mM. Il campione “caricato” è stato diluito 20 volte con tampone fosfato, per avere la stessa concentrazione di acido lattico (0.02 mM) dell’esperienza precedente. Il biosensore è stato immerso in questo secondo campione e si è registrata la corrente anodica, osservando, che la differenza fra la corrente registrata in tal caso e il segnale di background coincideva con l’incremento di corrente causato dall’aggiunta di lattato al campione di siero tout court (Figura 4.64).

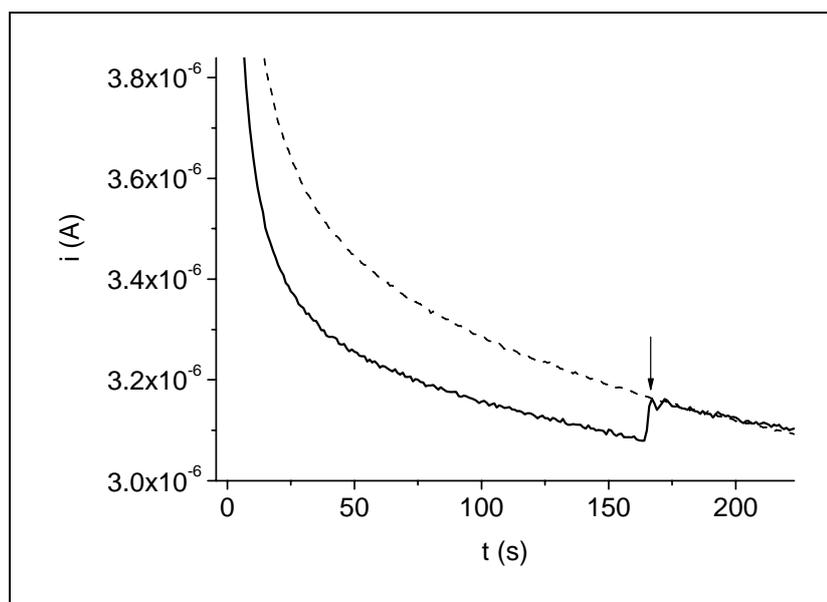


Figura 4.64 – Risposti cronoamperometrici di un elettrodo Pt-HT-LOx-Nafion per campioni di siero bovino diluiti 20 volte (con PBS 0.1 M, a pH 7.0), a +0.35 V. Curva continua: siero tal quale, a cui è aggiunto lattato (0.02 mM) appena si stabilizza il segnale di background (incremento di corrente indicato dalla freccia). Curva tratteggiata: campione di siero “caricato” con lattato (concentrazione finale 0.02 mM).

Questo risultato porta a concludere che il biosensore *Pt-HT-LOx-Nafion* è applicabile per l'analisi dell'acido lattico nel siero bovino, in quanto l'effetto matrice è trascurabile. Ciò è possibile per la presenza dell'HT, come modificante elettrodico, che protegge la superficie di Pt dall'avvelenamento causato dai numerosi componenti che costituiscono la matrice complessa.

BIBLIOGRAFIA

- [1] N.G. Patel, A. Erlenkötter, K. Cammann, G.-C. Chemnitz, *Sens. Actuators B: Chem.* **2000**, 67, 134.
- [2] A. Parra, E. Casero, L. Vázquez, F. Pariente, E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta* **2006**, 555, 308.
- [3] Suman, R. Singhal, A. L. Sharma, B. D. Malthotra, C. S. Pundir, *Sens. Actuators B: Chem.* **2005**, 107, 768.
- [4] K. Bridge, F. Davis, S. D. Collyer, S. P. J. Higson, *Electroanalysis* **2007**, 19, 567.
- [5] B. Prieto-Simón, E. Fàbregas, A. Hart, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2663.
- [6] R. Garjonyte, Y. Yigzaw, R. Meskys, A. Malinauskas, L. Gorton, *Sens. Actuators B: Chem.* **2001**, 79, 33.
- [7] M. Trojanowicz, O. Geschke, T. Krawczyński vel Krawczyk, K. Cammann, *Sens. Actuators B: Chem.* **1995**, 28, 191.
- [8] F. Palmisano, M. Quinto, R. Rizzi, P. G. Zambonin, *Analyst* **2001**, 126, 866.
- [9] F. Palmisano, R. Rizzi, D. Centonze, P.G. Zambonin, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, 15, 531.
- [10] G. Aydin, S. S. Celebi, H. Ozyoruk, A. Yildiz, *Sens. Actuators B: Chem.* **2002**, 87, 8.
- [11] D. Shan, S. Cosnier, C. Mousty, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3872.
- [12] C. Forano, S. Vial, C. Mousty, *Curr. NanoSci.* **2006**, 2, 283.
- [13] C. Mousty, C. Forano, S. Fleutot, J.-C. Dupin, *Electroanalysis* **2009**, 21, 399.
- [14] A. Mignani, E. Scavetta, D. Tonelli, *Anal. Chim. Acta* **2006**, 577, 98.
- [15] A. Mignani, E. Scavetta, L. Guadagnini, D. Tonelli, *Sens. Actuat. B* **2009**, 136, 196.

5. CONCLUSIONI

Nel lavoro di tesi sono state studiate diverse configurazioni di elettrodi modificati, per lo sviluppo di sensori e biosensori elettrochimici.

- Si sono caratterizzati elettrodi di carbone vetroso modificati, per via elettrochimica, con esacianoferrati di metalli di transizione. Sono state valutate le prestazioni per la rivelazione del perossido di idrogeno e la stabilità con il pH della soluzione di lavoro.

I risultati ottenuti hanno mostrato che l'esacianoferrato di Pd (PdHCF) non presenta apprezzabile attività elettrocatalitica. L'esacianoferrato di Cu (CuHCF) è un discreto catalizzatore, ma la sua stabilità in soluzioni debolmente acide è scarsa. Esacianoferrati misti di Cu e Pd (CuPdHCF) hanno invece garantito migliori prestazioni, in termini di sensibilità di risposta ad H_2O_2 e qualità del responso amperometrico, nonché un significativo aumento di stabilità a pH vicini alla neutralità. Le prestazioni sono state correlate alla composizione (percentuali relative di Cu e Pd) dei film di CuPdHCF.

Il ruolo chiave svolto dal Cu nell'esplicazione dell'attività elettrocatalitica è stato dimostrato e, in tale prospettiva, si è studiata e approfondita una metodologia sperimentale per realizzare l'intercalazione di ioni Cu^{2+} all'interno di film di CuHCF precedentemente depositati.

- I film studiati di CuHCF e CuPdHCF sono stati impiegati per supportare l'enzima glucosio ossidasi (GOx), e applicati alla rivelazione del glucosio in riduzione (biosensori di "prima generazione mediata"). La sensibilità di risposta, in funzione della composizione dei film, ricalca, nei casi esaminati, l'andamento riscontrato nelle prove di determinazione di H_2O_2 svolte precedentemente.
- La tecnica della microscopia a scansione elettrochimica (SECM) è stata impiegata con successo, nell'innovativa modalità operativa della competizione redox, per la visualizzazione dell'attività elettrocatalitica locale di spot microstrutturati di Blu di Prussia (PB) e per la caratterizzazione di superfici elettrodiche modificate con PB e GOx.

- Si sono valutate le prestazioni di elettrodi di Pt, modificati con un film di idrotalcite (HT) e con l'enzima lattato ossidasi (LOx), per la determinazione del lattato (biosensori di "prima generazione"). È stato dimostrato che la presenza dell'HT, come modificante elettrodico, riduce l'effetto di avvelenamento ("fouling") della superficie elettrodica e consente la rivelazione del lattato in matrici reali complesse.

Elenco delle pubblicazioni scientifiche

1. *Microscopy techniques for the characterization of modified electrodes in the development of glucose biosensors*, Lorella Guadagnini, Barbara Ballarin, Adriana Mignani, Erika Scavetta, Domenica Tonelli, *Sens. Act. B, Chem.* **2007**, *126*, 492-498.
2. *Glucose biosensors based on electrodes modified with ferrocene derivatives intercalated into Mg/Al layered double hydroxides*, Marco Colombari, Barbara Ballarin, Irene Carpani, Lorella Guadagnini, Adriana Mignani, Erika Scavetta, Domenica Tonelli, *Electroanalysis* **2007**, *19*, 2321-2327.
3. *Anti-interferent properties of oxidized nickel based on layered double hydroxide in glucose amperometric biosensors*, Erika Scavetta, Lorella Guadagnini, Adriana Mignani, Domenica Tonelli, *Electroanalysis* **2008**, *20*, 2199-2204.
4. *Comparative study of protective membranes for glucose biosensors based on electrodeposited hydrotalcites*, Adriana Mignani, Lorella Guadagnini, Erika Scavetta, Domenica Tonelli, *Sens. Actuators: B, Chem* **2009**, *136*, 196-202.
5. *Visualization of electrocatalytic activity of microstructured metal hexacyanoferrates by means of redox competition mode of scanning electrochemical microscopy (RC-SECM)*, Lorella Guadagnini, Artjom Maljusch, Xingxing Chen, Sebastian Neugebauer, Domenica Tonelli, Wolfgang Schuhmann, *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 3753-3758.
6. *Cu K-edge EXAFS on copper(I) complexes containing dihydridobis(3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl)borate and bis(1,2,4-triazol-1-yl)acetate ligand: Evidence for the Cu–O interaction*, Marco Giorgetti, Lorella Guadagnini, Steven G. Fiddy, Carlo Santini, Maura Pellei, *Polyhedron* **2009**, *28*, 3600-3606.
7. *Lactate biosensor based on hydrotalcite-like compounds: performances and application to serum samples*, Irene Carpani, Lorella Guadagnini, Domenica Tonelli, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 2401-2409.
8. *Glyphosate and glufosinate detection at electrogenerated NiAl-LDH thin films*, Aicha Khenifi, Zoubir Derriche, Claude Forano, Vanessa Prevot, Christine Mousty, Erika Scavetta, Barbara Ballarin, Lorella Guadagnini, Domenica Tonelli, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *654*, 97-102.

9. *Ni(OH)₂ versus Ni/Al layered double hydroxides as matrices to immobilize glucose oxidase*, Lorella Guadagnini, Adriana Mignani, Erika Scavetta, Domenica Tonelli, *Electrochim. Acta* **2009**, *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 1217-1220.
10. *Electrocatalytic performances of pure and mixed hexacyanoferrates of Cu and Pd for the reduction of hydrogen peroxide*, Lorella Guadagnini, Marco Giorgetti, Fabrizio Tarterini, Domenica Tonelli, *Electroanalysis* **2010**, accettato.
11. *Improved performances of electrodes based on Cu²⁺-loaded copper hexacyanoferrate for hydrogen peroxide detection*, Lorella Guadagnini, Domenica Tonelli, Marco Giorgetti, sottoposto a *Electrochimica Acta*.

RINGRAZIAMENTI

Desidero, prima di tutto, esprimere la mia gratitudine e stima nei confronti della prof.ssa Domenica Tonelli, che mi ha guidato e aiutato durante i tre anni del percorso formativo di Dottorato di Ricerca, dimostrando una pazienza e una disponibilità inesauribili.

Un grazie particolare va al dott. Marco Giorgetti, la cui esperienza e competenza nel campo degli esacianoferrati dei metalli di transizione mi ha consentito di instaurare una collaborazione professionale arricchente e proficua.

Ringrazio il prof. Wolfgang Schuhmann, capo del Laboratorio di Elettroanalitica e Sensori dell'Università della Ruhr a Bochum (Germania), presso cui ho svolto un soggiorno di ricerca di sei mesi, per avermi dato l'opportunità di migliorare notevolmente le mie competenze nell'utilizzo della microscopia SECM, ed avermi considerato un membro effettivo del suo gruppo di ricerca durante la mia permanenza.

Un grazie di cuore al dott. Fabrizio Tarterini, per l'esecuzione attenta e competente delle analisi SEM/EDX.

Ringraziamenti doverosi sono rivolti ai miei colleghi, passati e attuali, del laboratorio di Chimica Analitica dell'Università di Bologna e al gruppo di ricerca dell'Università di Bochum, per i bei momenti lavorativi e ricreativi vissuti insieme.

Non posso mancare, infine, di ringraziare i miei genitori e gli amici di Bologna e di Forlì, per aver condiviso con me ogni piccolo, "grande" traguardo professionale raggiunto.