

SCUOLA DI SCIENZE
Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Studi preliminari per la realizzazione di una cella
a biocombustibile alimentata a NADH e ossigeno

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Ruggero Rossi

RELATORE

Chiar.mo Prof. Leonardo Setti

CORRELATORE

Francesco Errani

Sessione II

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUZIONE | 4 |
| 1.1 RICERCA E INNOVAZIONE PER UN FUTURO LOW-CARBON | 4 |
| 1.2 COMMERCIO INTERNAZIONALE E SVILUPPO COMPETITIVO NELLE TECNOLOGIE DELLE FONTI ENERGETICHE RINNOVABILI | 5 |
| 1.3 IL PACCHETTO CLIMA – ENERGIA | 5 |
| 1.4 SMART GRID | 8 |
| 1.5 CELLE A COMBUSTIBILE | 18 |
| 1.5.1 <i>L'Hydrogen Economy</i> | 20 |
| 1.6 FONTI ENERGETICHE RINNOVABILI | 24 |
| 1.6.1 <i>Energia da biomasse</i> | 24 |
| 1.7 CELLE A BIOCMBUSTIBILE | 25 |
| 1.7.1 <i>Enzimi redox</i> | 36 |
| 1.7.2 <i>Mediatori redox</i> | 38 |
| 1.7.2.1 <i>Blu di metilene</i> | 42 |
| 1.7.3 <i>NADH e NAD⁺</i> | 43 |
| 1.7.4 <i>Glicolisi e ciclo di Krebs</i> | 44 |
| 2 SCOPO | 49 |
| 3 MATERIALI E METODI | 51 |
| 3.1 APPARATI | 51 |
| 3.1.1 <i>Descrizione di una cella a combustibile</i> | 51 |
| 3.1.2 <i>Realizzazione della pila a combustibile</i> | 51 |
| 3.1.2.1 <i>Ponte salino</i> | 53 |
| 3.1.3 <i>Pila standard Zinco/Rame</i> | 54 |
| 3.1.4 <i>Analisi superficiali</i> | 57 |
| 3.1.5 <i>Pila standard in soluzione Iodio/Ferro</i> | 58 |
| 3.1.6 <i>Saggio spettrofotometrico della cinetica di reazione</i> | 61 |
| 3.1.6.1 <i>Tampone Fosfato</i> | 61 |
| 3.1.6.2 <i>Blu di metilene</i> | 62 |

| | |
|--|------------|
| 3.1.6.3 NADH | 62 |
| 3.1.6.4 Diaforasi | 62 |
| <i>3.1.7 Studi di stabilità delle specie coinvolte nella reazione di ossidoriduzione</i> | <i>63</i> |
| <i>3.1.8 Miniaturizzazione della pila a biocombustibile</i> | <i>64</i> |
| 3.1.8.1 Pila a biocombustibile alimentata a NADH/Ferro | 64 |
| 3.1.8.2 Pila a biocombustibile alimentata a NADH/Aria | 66 |
| <i>3.1.9 Pila a biocombustibile alimentata a NADH/Ossigeno</i> | <i>67</i> |
| 3.2 STRUMENTI | 69 |
| <i>3.2.1 Misurazioni elettrochimiche</i> | <i>69</i> |
| 3.2.1.1 Curve I(V) | 70 |
| 3.2.1.2 Cronoamperometrie | 71 |
| 4 RISULTATI E DISCUSSIONI | 72 |
| 4.1 PILA STANDARD ZINCO/RAME E TARATURA DEL SISTEMA DI CARATTERIZZAZIONE | 72 |
| 4.2 PILA STANDARD IN SOLUZIONE | 83 |
| <i>4.2.1 Analisi superficiali</i> | <i>83</i> |
| <i>4.2.2 Pila standard iodio/ferro</i> | <i>86</i> |
| 4.3 SAGGIO SPETTROFOTOMETRICO DELLA CINETICA DI REAZIONE TRA NADH E BLU DI METILENE | 99 |
| 4.4 STUDI DI STABILITÀ DELLE SPECIE COINVOLTE NELLA REAZIONE DI OSSIDORIDUZIONE | 105 |
| 4.5 PILA A BIOCOMBUSTIBILE ALIMENTATA A NADH/FERRO | 108 |
| 4.6 PILA A BIOCOMBUSTIBILE ALIMENTATA A NADH/ARIA | 118 |
| 4.7 PILA A BIOCOMBUSTIBILE ALIMENTATA A NADH/OSSIGENO | 130 |
| 5 CONCLUSIONI | 144 |
| 6 BIBLIOGRAFIA | 147 |

1 INTRODUZIONE

1.1 Ricerca e innovazione per un futuro low-carbon

La recente crisi economica, le incertezze legate ai costi e all'approvvigionamento dell'energia, il crescente livello delle emissioni e il rischio di cambiamenti climatici, mettono seriamente in discussione la sostenibilità dell'attuale sistema economico - produttivo mondiale.

Gli interventi prioritari da assumere, a livello globale, per affrontare tali problematiche, riguardano in primo luogo la diffusione di tecnologie e di comportamenti per un uso razionale dell'energia. Ma se gli interventi sull'efficienza, in particolare negli usi finali dell'energia, costituiscono una condizione necessaria per affrontare le sfide dell'energia e del clima, una prospettiva di lungo termine non può essere affrontata se non accelerando l'impegno nella ricerca e nello sviluppo di tecnologie, che consenta da una parte un ricorso pulito alle fonti fossili, e dall'altra il pieno utilizzo delle fonti rinnovabili. La definizione di una strategia di lungo periodo nel settore dell'energia, e in particolare in quello delle rinnovabili, è condizione necessaria per ridurre le numerose barriere che ne ostacolano lo sviluppo. In questo senso, le politiche che verranno adottate dovranno realizzare il necessario equilibrio tra strumenti che consentano la creazione di un'adeguata domanda di tecnologie per le rinnovabili - con particolare attenzione al livello di efficacia dei meccanismi di incentivazione - e strumenti in grado di stimolare l'innovazione e lo sviluppo tecnologico. Sul perseguimento di questi obiettivi peserà l'entità degli investimenti, pubblici e privati, che verranno destinati allo sviluppo e all'industrializzazione di sistemi tecnologici innovativi ma, soprattutto, la capacità di focalizzare su opzioni tecnologiche prioritarie questi investimenti, in una logica di cooperazione tra strutture della ricerca e sistema industriale. In quest'ottica, l'obiettivo comunitario assegnato all'Italia per il 2020, che prevede una copertura del 17% di consumi finali con energia da fonti rinnovabili, rappresenta uno stimolo allo sviluppo e alla diffusione di nuove tecnologie che, rispondendo ad importanti ed urgenti questioni che si pongono oggi sul piano energetico ed ambientale, possono essere in grado di promuovere la crescita, economicamente sostenibile, del paese.

1.2 Commercio internazionale e sviluppo competitivo nelle tecnologie delle fonti energetiche rinnovabili

L'attenzione crescente con cui i governi delle maggiori economie stanno guardando all'uso di fonti di energia rinnovabile per la sicurezza energetica e la salvaguardia ambientale, prefigura un importante passaggio dello sviluppo economico nel segno di un rinnovato dinamismo tecnologico. La diffusione delle tecnologie per la produzione di energia da fonti rinnovabili incide infatti in maniera sostanziale sulla capacità dei Paesi industrializzati di soddisfare i canoni della sostenibilità energetica ed ambientale, ma non meno rilevanti sono i suoi riflessi sul versante della sostenibilità economica e sociale, data l'importanza delle trasformazioni produttive indotte e l'emergere con esse di nuovi equilibri tra la domanda e l'offerta delle risorse economiche nazionali. Non è dunque un caso che la riflessione sui possibili sviluppi di tali tecnologie si sia gradatamente estesa da valutazioni sul costo e sull'efficacia delle singole misure, ad una sempre più circostanziata considerazione della dimensione strutturale del cambiamento in atto. In questo senso la "scommessa" di quei Paesi che per primi hanno promosso l'uso delle energie rinnovabili si è ben presto tradotta in azioni mirate ad incentivare autonomi percorsi nazionali di sviluppo tecnologico. La forza sempre maggiore con cui si sono andate imponendo le questioni della sicurezza energetica e dei cambiamenti climatici hanno del resto dato ragione di queste vedute, ed è così che, entrando nel vivo delle adesioni al Protocollo di Kyoto, non è possibile ignorare la posizione dell'Unione Europea sempre più protesa a "ratificare" le linee di politiche già di fatto avviate. È questo il senso del SET - plan, con il quale alla fine del 2007 sono state delineate le azioni per la promozione delle clean energy technologies all'interno degli Stati membri, e a seguire, appena un anno dopo, del varo del "Pacchetto Clima" che assegna alle fonti energetiche rinnovabili un ruolo preminente nella lotta al cambiamento climatico.¹

1.3 Il pacchetto clima – energia

La Commissione europea ha proposto il 10 gennaio 2007 un pacchetto completo di misure per istituire una nuova politica energetica per l'Europa, finalizzata a combattere i cambiamenti climatici e a rafforzare la sicurezza energetica e la competitività dell'Unione Europea. Il pacchetto di proposte definisce una serie di obiettivi ambiziosi con riferimento

alle emissioni di gas serra e all'energia rinnovabile e punta a creare un vero mercato interno dell'energia rendendo sempre più efficace la normativa. Nell'ambito di tale pacchetto, la Commissione ha presentato la comunicazione "Limitare il surriscaldamento dovuto ai cambiamenti climatici a +2 gradi Celsius - La via da percorrere fino al 2020 e oltre".

La comunicazione e la scheda d'impatto che l'accompagna indicano come l'obiettivo descritto nel titolo sia realizzabile sotto il profilo tecnico ed economicamente sostenibile, e suggeriscono che l'Unione europea adotti i provvedimenti necessari al proprio interno e assuma una posizione leader in ambito internazionale per garantire che l'innalzamento della temperatura media a livello mondiale non superi di oltre 2°C i livelli dell'era preindustriale. Visto che la produzione e l'impiego di energia sono le principali fonti delle emissioni di gas a effetto serra, per realizzare questo obiettivo il Consiglio ha sottolineato la necessità di un approccio integrato alle politiche climatica ed energetica.²

Il 23 gennaio 2008 la Commissione europea ha adottato un Pacchetto di proposte che darà attuazione agli impegni assunti dal Consiglio europeo in materia di lotta ai cambiamenti climatici e promozione delle energie rinnovabili. Le misure previste accresceranno significativamente il ricorso alle fonti energetiche rinnovabili in tutti i paesi ed imporranno ai governi obiettivi giuridicamente vincolanti. Grazie a una profonda riforma del sistema di scambio delle quote di emissione, che imporrà un tetto massimo alle emissioni a livello comunitario, tutti i principali responsabili delle emissioni di CO₂ saranno incoraggiati a sviluppare tecnologie produttive pulite.

Il pacchetto legislativo è entrato in vigore nel giugno 2009 e sarà valido dal gennaio 2013 fino al 2020.

La direttiva prevede, a livello europeo:

1. la riduzione delle emissioni di gas serra del 20%;
2. l'innalzamento al 20% della quota di energia prodotta da fonti di origine rinnovabile;
3. il raggiungimento del tetto del 20% di risparmio energetico.

Il pacchetto comprende anche provvedimenti sui limiti alle emissioni delle automobili e sul sistema di scambio di quote di emissione (Emissions Trading Scheme).

L'obiettivo è ovviamente quello di contrastare i cambiamenti climatici e promuovere l'utilizzo delle fonti energetiche rinnovabili tramite obiettivi vincolanti per i Paesi membri.

La prima esigenza per l'UE era sicuramente quella di trovare una modalità per impegnarsi nel periodo "post-Kyoto", senza attendere improbabili accordi globali: l'impegno europeo voleva essere nelle intenzioni, esempio e traino in vista della COP (Conference of the Parties to the United Nations Framework Convention on Climate Change) di Copenhagen del dicembre 2009, dove si presupponeva di riuscire a raggiungere un accordo per il contrasto al cambiamento climatico anche sulla scia dell'esperienza europea. Come si sa un accordo non è stato raggiunto ma l'UE ha voluto ugualmente promuovere il proprio impegno unilaterale, rilanciandolo oltre il -20% di emissioni entro il 2020 e portandolo al -30% per il 2030 e a -50% nel 2050, rispetto al 1990.

Quindi, anche se non accompagnato da un impegno globale, il pacchetto clima - energia rimane un buon insieme di provvedimenti per contrastare il cambiamento climatico ed aumentare l'efficienza energetica.³

1.4 Smart Grid

Gli obiettivi europei del pacchetto clima - energia sono stati la forza trainante di un innovativo concetto di efficienza energetica, legato alla necessità del sistema di distribuzione dell'energia di adattarsi all'ampliamento della generazione distribuita da fonti rinnovabili e la diffusione di nuovi impianti, grandi e piccoli.

Con l'ampliarsi della generazione distribuita da fonti rinnovabili, anche in ambito domestico, si fa spazio una rete di produzione aggiuntiva che si deve integrare a quella tradizionale, di conseguenza per il distributore non sarà più sufficiente avere un controllo sulla produzione nazionale, ma sarà necessario monitorare, gestire e integrare anche a livello locale la distribuzione di energia prodotta in bassa e in media tensione e proveniente da fonti rinnovabili.

La rete elettrica non sarà più solo un canale per trasmettere e distribuire energia elettrica dalle grandi centrali ai clienti finali, ma diventa una "Smart Grid", ovvero una rete intelligente in grado di accogliere flussi di energia bidirezionali, di fare interagire produttori e consumatori, di determinare in anticipo le richieste di consumo e di adattare con flessibilità la produzione e il consumo di energia elettrica. Una rete in grado di comunicare scambiando informazioni sui flussi di energia, gestendo con migliore efficienza i picchi di richiesta, evitando interruzioni di elettricità e riducendo il carico dove è necessario.

Formalmente per Smart Grid si intende una rete elettrica in grado di integrare intelligentemente le azioni di tutti gli utenti connessi: produttori, consumatori, o prosumers (producers and consumers) al fine di distribuire energia in modo efficiente, sostenibile, economicamente vantaggioso e sicuro.

La Smart Grid utilizzerà prodotti e servizi innovativi assieme a tecnologie evolute di monitoraggio, controllo e comunicazione, al fine di:

- integrare la generazione distribuita da fonti rinnovabili;
- fornire ai clienti gli strumenti per ottimizzare i propri consumi e migliorare il funzionamento del sistema globale (domanda attiva);
- diffondere un'infrastruttura di ricarica per la mobilità elettrica;
- ridurre significativamente l'impatto ambientale;

- aumentare il grado di affidabilità e sicurezza del sistema elettrico.

In Figura 1 si riporta una schematizzazione del concetto di Smart Grid applicata ad una vasta area territoriale.

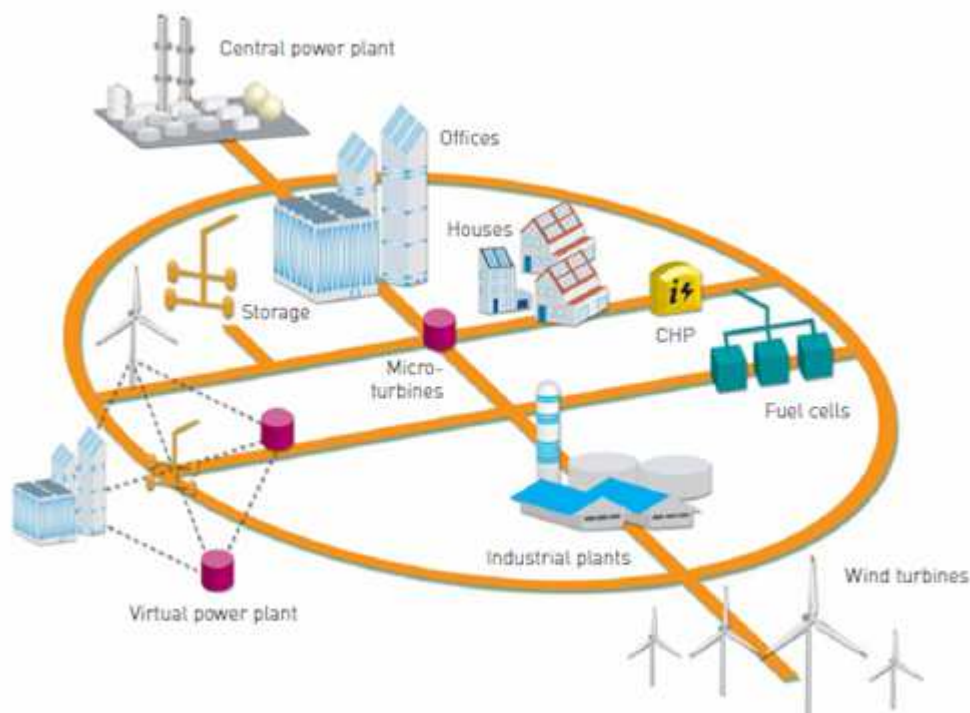


Figura 1: SmartGrid: il funzionamento dell'intero sistema prevede la coesistenza di generatori centralizzati e distribuiti. I generatori distribuiti possono essere aggregati per formare microgrid o centrali elettriche "virtuali" per facilitarne l'integrazione sia nel sistema fisico che nel mercato.

Cosa saranno esattamente le SmartGrids è ancora difficile dirlo, tuttavia ci si aspetta un'evoluzione sia sul piano della generazione e distribuzione dell'energia elettrica, sia sul piano del controllo dei sistemi: questi dovranno reagire agli eventi esterni e perseguire obiettivi di efficienza in modo autonomo ed in tempo reale.

La rete elettrica di oggi è stata progettata come una rete sostanzialmente passiva che trasporta l'energia secondo una sola direzione: da *poche grandi* centrali di generazione a *tanti piccoli* punti di consumo presso gli utenti finali.

La nuova rete dovrà fare grande uso di fonti rinnovabili e di sistemi di microgenerazione, assicurando così un'efficace dispersione sul territorio di *piccoli punti* di produzione e consumo, che, accoppiati ad una rete intelligente, permetteranno di soddisfare il fabbisogno energetico. La microgenerazione permette di migliorare l'efficienza di un sistema elettrico avvicinando in termini spaziali la produzione e il consumo di energia, riducendo così le perdite intrinseche del sistema di distribuzione.

Tuttavia la generazione distribuita si riesce oggi ad integrare finché si tratta di quantitativi modesti, ma una diffusione massiva comporterebbe un degrado importante dell'efficienza e della qualità dell'energia distribuita. La rete elettrica nazionale dovrà quindi essere riprogettata per promuovere l'uso diffuso di microgenerazione e dovrà quindi essere in grado di gestire flussi energetici bidirezionali.

L'uso di fonti rinnovabili pone anche un problema sul piano del controllo in quanto: i sistemi di microgenerazione sono privati, in grandi quantità e diversità di tipologie, e ciò rende difficile un controllo centralizzato da parte del gestore della rete di distribuzione di energia; la capacità di generazione è molto variabile, dipende dalle condizioni atmosferiche locali, ed è difficile da prevedere.

Sul piano del controllo, inoltre, la rete elettrica dovrà assomigliare molto ad una Internet of Energy, dove ogni dispositivo elettrico e ogni sistema di microgenerazione sarà connesso in rete e in grado di comunicare e ricevere dati e reagire in tempo reale ad eventi e stimoli che arrivino da altri dispositivi o dalla rete elettrica stessa: una rete energetica disseminata di sensori, attuatori, nodi di comunicazione, sistemi di controllo e monitoraggio.

Ogni casa, ogni utente, dovrà poter potenzialmente diventare un *prosumer* di energia elettrica, che compra, ma anche vende energia, in un mercato aperto ai grandi distributori così come ai piccoli utenti. Il prezzo dell'energia, sia per chi la consuma sia per chi la vende, varierà nel tempo e diventerà la principale variabile in grado di bilanciare la domanda all'offerta di energia elettrica. È presumibile che ogni utente di questo mercato sarà rappresentato da un agente software, che agirà in modalità autonoma e proattiva verso la massimizzazione di obiettivi di profitto di ogni singolo utente. È una vera e propria rivoluzione rispetto al sistema di bilanciamento attuale basato su un controllo centralizzato e con reazioni molto spesso affidate all'intervento dell'operatore umano. Piuttosto diffusi sono scenari di riferimento di *price to device* dove il costo dell'energia varia dinamicamente nel

tempo: i contatori lo comunicano agli elettrodomestici che si coordinano per reagire ed adattare di conseguenza il profilo di consumo, ad esempio ritardando il ciclo di riscaldamento dell'acqua della lavatrice ad un momento in cui l'energia costa meno (Figura 2).

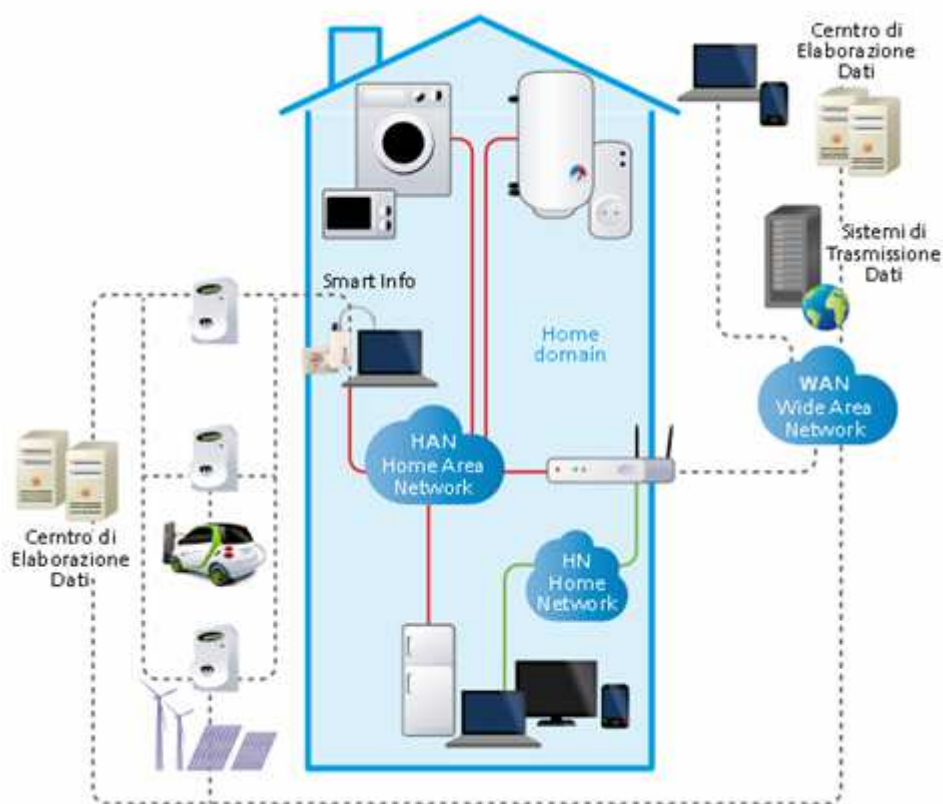


Figura 2: tecnologia sviluppata da Enel nella progettazione delle case da inserire nella Smart Grid.

La gestione intelligente dell'energia prevede perciò lo sviluppo di un'infrastruttura di comunicazione che dia la possibilità a tutti gli attori di disporre di un flusso di informazioni completo che permetta a tutti gli utenti di partecipare attivamente al mercato dell'energia. Su questo principio si basa la costruzione di "abitazioni intelligenti", che impiegano avanzate soluzioni tecnologiche per un uso più razionale dell'energia in casa, con lo scopo di migliorare il comfort abitativo garantendo risparmio energetico, tutela e salvaguardia delle risorse naturali.⁴

L'innovazione portata dalla SmartGrid ha colpito molto l'opinione pubblica, tanto che nel dicembre 2004 la comunità scientifica e diversi soggetti industriali, durante la prima International Conference on the Integration of Renewable Energy Sources and Distributed Energy Resources hanno suggerito la creazione di una European Technology Platform per la Smart Grid del futuro (ETP SG).

L'ETP SG ha iniziato la sua attività nel 2005, lo scopo era formulare e promuovere una visione per lo sviluppo delle reti elettriche europee che guardano verso il 2020 e oltre.

Nell'aprile 2006 l'ETP SG ha presentato in un documento un piano per lo sviluppo delle Smart Grids. Il piano, sia per reti di trasmissione che di distribuzione, è guidato dagli effetti combinati della liberalizzazione del mercato e dal cambiamento nelle tecnologie di generazione, muovendosi verso il raggiungimento degli obiettivi ambientali e il futuro utilizzo di energia elettrica.

L'ETP SG ha pubblicato nel 2007 la Strategic Research Agenda (SRA), che descrive le principali aree da indagare, nel breve-medio periodo in Europa. Da allora, i punti contenuti in questa agenda hanno ispirato numerosi programmi di ricerca e sviluppo all'interno dell'UE e delle istituzioni nazionali.

Alla fine del 2008 è stato pubblicato lo Strategic Deployment Document, un documento che descrive le priorità e la tempistica per la diffusione dell'innovazione nelle reti elettriche e dei benefici che tale innovazione consegnerà a tutti i soggetti interessati.

Nel 2012, la SRA è stata aggiornata inserendo gli obiettivi da raggiungere al 2035. Il nuovo SRA 2035 servirà come chiave per l'attuale programma UE, con l'obiettivo di incentivare e progredire le Smart Grids come sistema europeo di gestione dell'energia.⁵

Identificando le Smart Grid come un processo evolutivo della rete, sono stati identificati nove distinti scenari di maturazione progressiva. Gli scenari sono livelli di progresso della rete, da quello “non smart”, o Smart Grid Zero (SG0), a quello più evoluto di Smart Grid Otto (SG8), come illustrato in Figura 3.

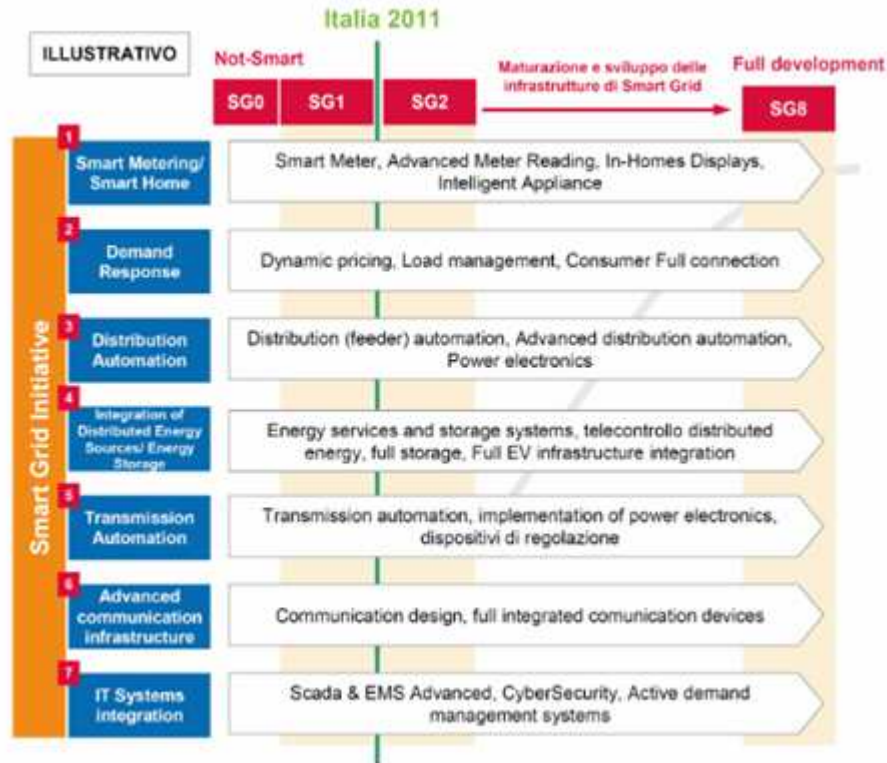


Figura 3: modello informativo degli scenari di evoluzione delle Smart Grid. In evidenza la situazione italiana.

L'Italia, insieme a Francia, Regno Unito e Germania è tra i “leading investor” nei progetti dimostrativi, mentre la Danimarca risulta più attiva nella Ricerca e Sviluppo. Ma in molti Paesi partono iniziative contro l’installazione dei contatori smart.⁶

L'Italia, data la sua situazione di privilegio per quanto riguarda la presenza di contatori intelligenti ed altre infrastrutture necessarie a uno sviluppo della Smart Grid, si colloca già con una evoluzione di SG1 completata.

Gli investimenti in questo nuovo settore nel nostro Paese saranno compresi tra i 5,2 e i 7,6 miliardi di dollari per il prossimo passo tecnologico che si dovrà compiere (SG2), per crescere poi in modo continuativo. Per raggiungere un’implementazione pressoché completa delle Smart Grid si coprirà un mercato cumulativo tra i 68 e 106 miliardi di dollari (SG8), inclusi gli investimenti già effettuati. L’incertezza dei valori aumenta ovviamente con lo sviluppo degli scenari a causa della sempre maggiore incertezza tecnologica delle soluzioni tecniche che andranno via via affermandosi. Il picco di investimenti lo si prevede in SG7 ed

è dovuto alla preponderante implementazione di elettrodomestici intelligenti (smart appliances) sulla rete domestica fino al full building automation.⁷

Di conseguenza, da un punto di vista infrastrutturale e di prodotto, le Smart Grid non sono un “one single product”, bensì consistono in un aggregato organico di tecnologie che sostengono l’evoluzione della rete elettrica e dei suoi utilizzi. Da qui la necessità da parte degli operatori nel settore di una integrazione a livello industriale, di filiera e di ricerca (le cosiddette “cross industry opportunities”). Le imprese devono cogliere l’occasione di entrare in tempo in questo mercato in crescita, attraverso lo sviluppo di prodotti in linea con l’evoluzione del settore, partnership con altre imprese o acquisizioni finalizzate all’aumento della propria esperienza nel settore. Nei prossimi anni gli investimenti aumenteranno lungo tutti i settori correlati allo sviluppo delle Smart Grid: l’industria italiana può cogliere questa opportunità, valorizzando al meglio le proprie eccellenze e competenze.⁷

Il problema del bilanciamento fra domanda ed offerta di energia (il cosiddetto demand response) è uno dei punti chiave di quello che è il progetto delle SmartGrid: la potenza richiesta dagli utenti della rete nell’arco di un giorno è variabile: sarà massima nelle ore centrali della giornata, periodo durante il quale raggiungerà un picco e minima nelle ore notturne (Figura 4).

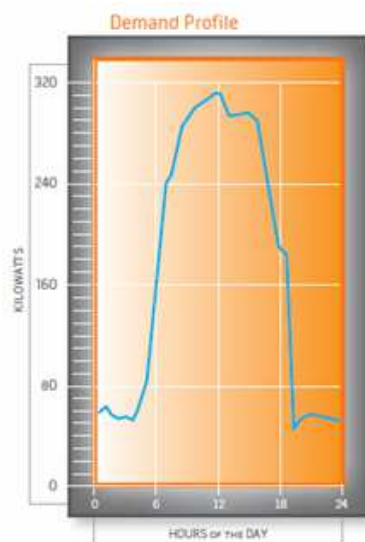


Figura 4: profilo di carico giornaliero tipico per i consumi di elettricità.

Tuttavia, un'efficace previsione di quelli che potrebbero essere gli effettivi consumi di una determinata zona del pianeta è assolutamente impossibile. Il dover garantire elettricità nel periodo di picco richiede di progettare e costruire centrali elettriche che verranno utilizzate solo in quei periodi della giornata (peaker plants), riducendo contemporaneamente i consumi di picco, a causa dell'impossibilità di immagazzinare grandi quantitativi di energia elettrica. Questo scenario non permette perciò una reale indipendenza energetica dai combustibili tradizionali, e prevede la costruzione di centrali che utilizzano tecnologie antiquate, difficili da inserire sul territorio, e che causano un degrado della qualità dell'aria e l'emissione di gas serra.

Inoltre le peaker plants rappresenterebbero un costo continuo, anche se dovessero lavorare in maniera discontinua.⁸

Per cercare di risolvere questo problema sono state messe in atto molte iniziative internazionali mirate ad abilitare sistemi di incentivazione alla riduzione dei picchi di consumo tramite schemi di tariffazione dinamica multioraria, che ricalcano l'andamento del mercato dell'energia con l'obiettivo di spostare i consumi dalla zona di picco della curva alle zone di valle.

In funzione di parametri come l'intensità della radiazione solare o la nuvolosità, i sistemi responsabili della produzione di energia come i pannelli fotovoltaici, immetteranno in rete una quantità variabile di energia, e secondo la legge della domanda e dell'offerta, il prezzo dell'energia varierà di conseguenza, quest'ultimo sarà sempre disponibile e costantemente aggiornato, in modo da permettere al consumatore finale di scegliere il momento migliore in cui far funzionare i propri apparecchi.

Uno dei cardini su cui si basa l'innovazione della Smart Grid è la diffusione su tutto il territorio nazionale di microsistemi di generazione dell'energia, il modo migliore per centrare questo obiettivo è quello di trasformare ogni abitazione in una piccola unità capace di produrre elettricità e condividerla in rete. La generazione di energia, come illustrato in Figura 5, può passare attraverso:

- l'installazione di pannelli fotovoltaici;
- la climatizzazione attraverso la costruzione di pompe di calore geotermiche;

- la progettazione di unità domestiche di cogenerazione (CHP) per l'accumulo di elettricità sotto forma di energia chimica contenuta nel combustibile.



Figura 5: sistemi domestici di efficienza energetica e generazione elettrica.

In conclusione, cercare la soluzione della crisi energetica e climatica nello sviluppo di energie rinnovabili ed efficienza energetica è una necessità oggettiva ed anche una grande opportunità, come molte nazioni e la stessa Unione europea hanno ormai ben capito.

Anche la strada delle energie rinnovabili non è, però, priva di ostacoli. Consideriamo ad esempio l'energia solare. Il Sole in un'ora fa giungere sulla Terra l'energia che l'umanità consuma in un anno; l'energia solare è anche inesauribile e ben distribuita. Con essa è possibile ottenere tutte le forme di energia utili: calore (ad esempio, con i pannelli termici), elettricità (con pannelli fotovoltaici o sistemi a concentrazione) e combustibili (oggi con le biomasse, domani con la fotosintesi artificiale). Il flusso dell'energia solare è però molto diluito ed intermittente su scala locale, per cui bisogna sviluppare processi e strutture capaci di ovviare a questi difetti.

La maggior parte delle energie rinnovabili, ma in particolare fotovoltaico, solare a concentrazione, eolico, idroelettrico e geotermico producono direttamente elettricità, alcune in modo fluttuante. Per facilitare la transizione energetica è quindi necessario sviluppare un'efficiente rete di distribuzione e raccolta dell'energia elettrica attraverso lo sviluppo delle Smart Grid ed allo stesso tempo installare sistemi capaci di immagazzinarla sotto altre forme, specialmente come energia chimica. In questo modo sarebbe possibile sia accumulare

l'energia prodotta in eccesso, sia avere una disponibilità immediata di un vettore energetico da impiegare per generare elettricità in base alle richieste della rete. L'energia accumulata potrà poi infatti essere riconvertita in energia elettrica, mediante dispositivi detti celle a combustibile.⁹

1.5 Celle a combustibile

Una cella a combustibile è un dispositivo in grado di generare una corrente elettrica continua convertendo l'energia chimica di un combustibile direttamente in energia elettrica. Le celle a combustibile differiscono dai sistemi convenzionali di produzione di energia elettrica, come illustrato in Figura 6, in quanto i materiali attivi come il combustibile e il comburente non sono contenuti all'interno della cella stessa, ma vengono alimentati dall'esterno.



Figura 6: conversione di energia. Confronto tra celle a combustibile e sistemi tradizionali.

Il principale vantaggio delle celle a combustibile è che non necessitano di un ciclo di calore intermedio (combustione → scambio termico → generazione vapore → movimento turbine → elettricità), come la maggior parte delle altre tecniche di generazione di elettricità, permettendo di ottenere rendimenti di conversione più elevati rispetto a quelli delle macchine termiche convenzionali.¹⁰

La costruzione della prima cella a combustibile risale al 1839, anno in cui l'inglese William Grove riportò i risultati di un esperimento nel corso del quale era riuscito a generare energia elettrica in una cella contenente acido solforico, dove erano stati immersi due elettrodi, costituiti da sottili fogli di platino, in contatto rispettivamente con idrogeno ed ossigeno.

Il meccanismo di funzionamento delle celle a combustibile è simile a quello delle batterie, la produzione di energia elettrica avviene attraverso un processo elettrochimico: un combustibile, una sostanza capace di ossidarsi, viene alimentata all'elettrodo, lì cede i propri elettroni che vengono convogliati verso un altro elettrodo in un comparto separato fisicamente, dove una sostanza capace di ridursi, detta comburente, acquisisce gli elettroni.

Nelle fuel cells si assiste perciò allo svolgimento di una reazione di ossidazione, nel comparto anodico, dove vengono liberati elettroni, ed una reazione di riduzione, nel comparto catodico, dove gli elettroni vengono consumati.

Lo sviluppo della reazione di ossidoriduzione in due comparti separati fisicamente comporta un'eccedenza di cariche positive nel comparto anodico e una lacuna nel comparto catodico, il protrarsi di questa situazione porterebbe all'esaurimento della corrente elettrica in quanto gli elettroni dovrebbero abbandonare una semicella carica positivamente che invece li attrae per dirigersi verso una semicella carica negativamente che li respinge. Diventa perciò fondamentale garantire l'elettroneutralità della cella, a questo riguardo entra in gioco l'elettrolita: quest'ultimo permette il passaggio selettivo di ioni da una semicella all'altra o fornisce direttamente gli ioni ai due comparti ristabilendo l'elettroneutralità delle semicelle.

Questi sistemi generano energia elettrica a bassa tensione, solitamente attorno ad un Volt, ma ponendo più elementi in serie tramite un procedimento detto stack elettrochimico, è possibile aumentare la tensione dell'impianto.

La maggior parte delle celle a combustibile sviluppate finora utilizzano idrogeno come combustibile ed aria come comburente, questi sistemi sono ad oggi in commercio e impiegano gas naturale come fonte di idrogeno tramite reforming, ci sono attualmente circa 150 celle installate e operative in tutti gli Stati Uniti, dove vengono impiegate come unità domestiche di microgenerazione con efficienza elevata, fino all'85% in calore ed energia.

Esistono diverse tipologie di celle, le più comuni sono schematizzate in Figura 7, con diverse caratteristiche e diverso grado di sviluppo, normalmente vengono classificate in base all'elettrolita utilizzato e variano di conseguenza le temperature di funzionamento.

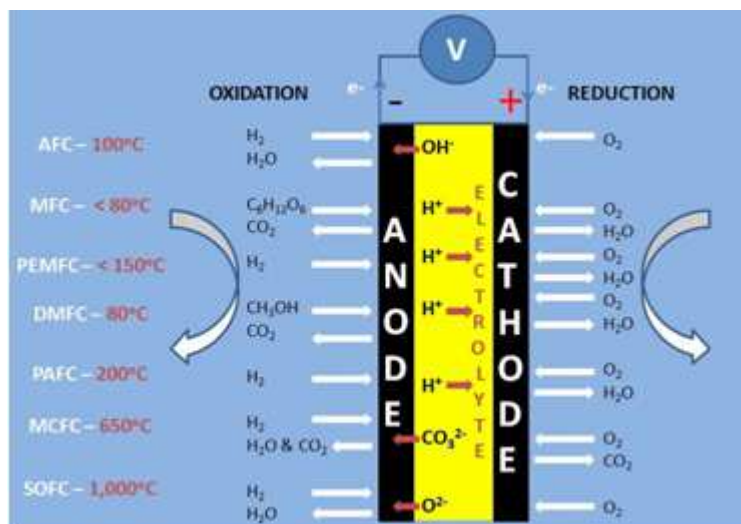


Figura 7: rappresentazione schematica delle varie tipologie di Fuel Cells attualmente in commercio o in fase di ricerca e sviluppo.¹¹

Come dispositivi portatili di generazione di energia, le celle a combustibile alimentate a idrogeno presentano alcuni svantaggi: le condizioni di reazione sono generalmente piuttosto spinte, con temperature e pressioni elevate, in soluzioni estremamente acide o alcaline. La maggior parte impiega elettrodi a base di platino, un metallo costoso e poco disponibile, che viene facilmente avvelenato da CO, coprodotto della sintesi di idrogeno per reforming del metano. La cella a metanolo diretto (*DMFC: Direct Methanol Fuel Cell*) sembra attualmente essere la più promettente per le applicazioni portatili fra le celle a combustibile chimiche.¹²

1.5.1 L'Hydrogen Economy

Le celle a combustibile sono fra i sistemi più promettenti per la produzione di energia elettrica, sia per le loro positive caratteristiche energetiche ed ambientali che per l'ampiezza delle possibili applicazioni. La tecnologia trova impiego in settori che vanno dalla generazione distribuita per le aziende elettriche, alla cogenerazione residenziale ed industriale, alla generazione portatile e alla trazione.

La tecnologia delle celle a combustibile è disponibile da almeno 150 anni e sono attualmente in commercio una notevole quantità di apparecchi che la impiegano, già nell'ottobre del 1959, Harry Ihrig, un ingegnere della Allis-Chalmers, mostrò un trattore da 20 cavalli alimentato da pile a combustibile. Pochi anni dopo, nella prima metà degli anni sessanta,

un'industria Statunitense, la General Electric, produsse un sistema basato sulle celle a combustibile che aveva il fine di generare energia elettrica, destinato alle navicelle spaziali Gemini ed Apollo della NASA.^{13, 14}

Attualmente l'elettricità per lo Shuttle è generata tramite celle a combustibile, ed alcuni di questi sistemi provvedono anche alla creazione di acqua per l'equipaggio.

Dal grande potenziale tecnologico di questa innovazione e dalle sue considerazioni in funzione dell'andamento economico mondiale si sono gettate le basi della "hydrogen economy" (Figura 8).



Figura 8:illustrazione degli elementi fondanti la "Hydrogen Economy".

Il termine è stato coniato nel 1970 dallo scienziato John Bockris durante una conferenza dal titolo "The Hydrogen Economy: An Ultimate Economy?"¹⁵ al General Motors Technical Center. Si fonda sullo sviluppo e l'implementazione di un sistema integrato che impiega come vettore energetico l'idrogeno, che si ritiene possa essere utilizzato come combustibile nei motori di automobili e come fonte di energia stoccabile per edifici e sistemi elettronici portatili.

La quantità di idrogeno libero disponibile sulla Terra non è tuttavia elevata, è perciò necessario produrlo a partire da altre specie più comuni, in questo senso sono stati fatti dei notevoli progressi, in particolare, la via di sintesi che si è rivelata più produttiva è lo steam reforming degli idrocarburi.

Da quanto detto è palese che l'idrogeno non rappresenti affatto una fonte di energia rinnovabile, e se sono tanti i sostenitori dell'innovativo sviluppo dell'hydrogen economy, sono altrettanti coloro che ritengono che quest'ultima non rappresenti un'opzione degna di nota in un futuro energetico sostenibile.

L'economia dell'idrogeno è stata definita infatti, da scienziati del settore, un'economia di spreco.¹⁶

In un recente studio è stato dimostrato come la grande quantità di energia richiesta per isolare l'idrogeno da composti naturali (acqua, gas naturale e biomassa), la quantità di elettricità e gas richiesta per le fasi di compressione e liquefazione ed infine il costo associato al trasferimento del vettore energetico all'utente finale, più l'energia persa durante la conversione in elettricità nella celle a combustibile per efficienze inferiori al 100%, incida pesantemente sull'economia dell'intero processo.

L'impiego dell'idrogeno come combustibile permette infatti di recuperare solamente circa il 25% dell'energia consumata durante la fase di produzione – un valore inaccettabile economicamente. Le celle a combustibile tradizionali troverebbero perciò applicazione in settori di nicchia come la trazione di sottomarini e di veicoli spaziali (Figura 9).

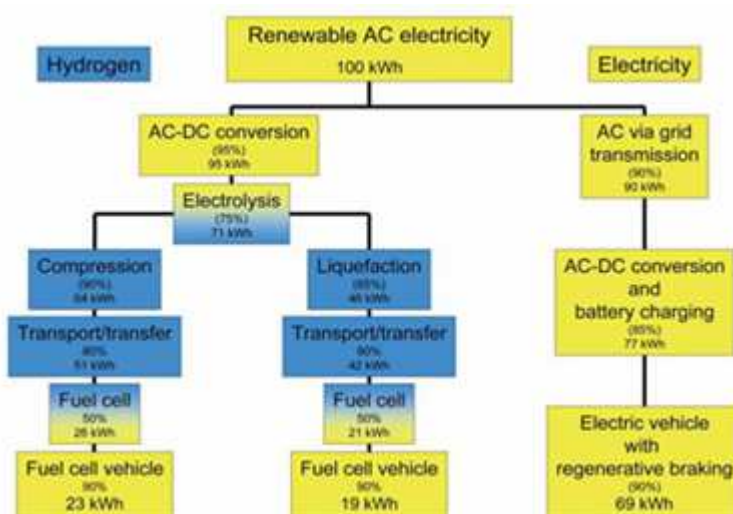


Figura 9: l'illustrazione compara la richiesta di energia utile da trasferire ad un veicolo alimentato ad idrogeno (sinistra) rispetto ad uno alimentato ad elettricità (destra).

Anche la produzione di idrogeno per elettrolisi dell'acqua, inoltre, dipende dalla disponibilità di risorse quali acqua ed energia, entrambe sempre più rare e legate a questioni geopolitiche, tanto quanto lo sono il greggio e il gas naturale.

Nell'ottica di sviluppare una nuova rete di distribuzione dell'energia, basata sul vettore energetico idrogeno, sarebbero necessari investimenti mastodontici per poter convertire l'attuale sistema elettrico, cui sarebbero associati tutti i problemi di sicurezza legati al trasporto di una specie estremamente reattiva ed infiammabile, come liquido o gas compresso.

Attualmente si ritiene¹⁷ che, nonostante la tecnologia per creare un'economia dell'idrogeno sia matura, quest'ultima non avrà mai un senso economico, perché incapace di risolvere il problema energetico alla radice.

Le due tematiche chiave di un futuro energetico sicuro e sostenibile sono la raccolta di energia da fonti rinnovabili e lo sviluppo della più alta efficienza energetica da produttore a consumatore.

In particolare ci si aspetta che nel futuro più prossimo la maggior parte dell'energia elettrica provenga da fonti energetiche rinnovabili, questa considerazione implica la creazione di un'efficiente *electron economy*, attraverso le Smart Grid.

1.6 Fonti energetiche rinnovabili

Le fonti energetiche rinnovabili sono identificate, nel campo dell'ingegneria energetica, come tutte le risorse naturali che per loro caratteristica intrinseca *si rigenerano almeno alla stessa velocità con cui vengono consumate, o non sono "esauribili" nella scala dei tempi "umani"*.¹⁸ Sono dunque forme di energia alternative alle tradizionali fonti fossili (che sono invece parte delle energie non rinnovabili) e molte di esse hanno la peculiarità di essere anche energie pulite.

Le risorse rinnovabili, sia di materia che di energia, sono risorse naturali che, per caratteristiche naturali o per effetto della coltivazione dell'uomo, si rinnovano nel tempo e risultano, quindi, disponibili per la sopravvivenza umana pressoché indefinitamente cioè non esauribili.

Le risorse rinnovabili presentano numerosi vantaggi, di cui i maggiori sono senza dubbio l'assenza di emissioni inquinanti durante il loro utilizzo, per questo sono dette "fonti pulite", e la loro inesauribilità. L'utilizzo di queste fonti non ne pregiudica la disponibilità nel futuro e sono preziosissime risorse per creare energia riducendo al minimo l'impatto ambientale. In questo modo si tutela la natura nel rispetto delle prossime generazioni e si limitano i costi di produzione e distribuzione di energia.

Le principali fonti di energia rinnovabile sono le seguenti:

- l'irraggiamento solare;
- il vento;
- le biomasse;
- le maree e le correnti marine in genere;
- i salti d'acqua.

1.6.1 Energia da biomasse

In campo energetico, con il termine biomassa si intende la frazione biodegradabile di prodotti, rifiuti e residui di origine biologica provenienti dall'agricoltura, dalla silvicoltura e dalle industrie connesse, comprese la pesca e l'acquacoltura, nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani. Le biomasse, ad oggi, vengono principalmente impiegate nella

produzione di composti o di mangimi al fine di evitarne lo smaltimento come rifiuti speciali, in quanto caratterizzati da un'importante carica organica.

L'obiettivo delle nuove tecnologie in materia di biomasse è quello di recuperare l'energia solare immagazzinata naturalmente in composti organici prodotti dalla natura attraverso la fotosintesi. Trarre energia dalle biomasse consente di eliminare gli scarti prodotti dalle attività agroforestali e valorizzarli con la produzione di gas di sintesi, metano ed energia elettrica.

Ogni anno in Italia si producono una media di 12 milioni di tonnellate di scarti agro-industriali, la sola frazione organica arriva a 9 milioni.

Allo stato attuale non esiste un mercato consolidato per il riutilizzo di questi scarti. Esistono però aziende che stanno lavorando, con notevole lungimiranza, per perfezionare un'attività di recupero finalizzata a ottenere molecole ad alto valore aggiunto. Un'attività che senza ombra di dubbio può tradursi in una interessante opportunità di supporto al reddito sia per il mondo agro-industriale, che per quello agricolo.

Tali sottoprodotti vengono utilizzati per lo più a fini di produzione energetica soprattutto convogliata nella produzione di biogas e/o in quella del compost da distribuire sui terreni come ammendante organico.¹⁹

La combustione delle biomasse libera nell'ambiente la quantità di carbonio assimilata dalle piante durante la loro crescita e una quantità di zolfo e di ossidi di azoto nettamente inferiore a quella rilasciata dai combustibili fossili a parità di energia prodotta.

Considerando i consumi odierni delle fonti fossili di energia, il loro esaurimento è previsto in tempi relativamente brevi, diversi per tipo risorsa, ma nel loro complesso contenuti in circa 150 anni. Le biomasse, ottenute da coltivazioni sviluppate in maniera ciclica, costituiscono invece una risorsa rinnovabile e teoricamente inesauribile. Esse sono inoltre compatibili con una crescita economica ambientalmente sostenibile perché non contribuiscono ad accrescere l'effetto serra. Un maggiore impiego energetico delle biomasse produrrebbe consistenti benefici ambientali, occupazionali e di politica energetica.

1.7 Celle a biocombustibile

Le celle a biocombustibile si inseriscono all'interno delle tecnologie di sfruttamento delle biomasse assieme a biodigestori e termovalorizzatori.

I termovalorizzatori sono impianti principalmente utilizzati per lo smaltimento di rifiuti solidi mediante un processo di combustione ad alta temperatura che genera come prodotti finali un effluente gassoso, ceneri e polveri. Il calore sviluppato durante la combustione dei rifiuti viene recuperato e utilizzato per produrre vapore, poi impiegato per la produzione di energia elettrica. In Italia ci sono attualmente 55 termovalorizzatori, anche noti come impianti "waste-to-energy" o WTE.²⁰

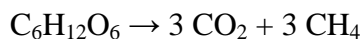
I biodigestori sono sistemi di trattamento di rifiuti semisolidi (contenuto in solidi dal 15% al 30% di materiale secco), che prevedono una digestione anaerobica della biomassa accompagnata da produzione finale di energia sotto forma di biogas, compost e rifiuti liquidi. Alla fine del 2012 in Italia erano operativi ben 994 impianti di questo tipo, come numero di centrali attive la regione Lombardia era in testa con 374 impianti, seguita dall'Emilia Romagna con 143.²¹

Come si può notare non è attualmente disponibile in commercio un efficace meccanismo di produzione di energia a partire da rifiuti di natura liquida.

Da queste considerazioni è nata l'idea di sviluppare una cella a biocombustibile, quest'ultima, esattamente come le celle tradizionali, lavorerebbe con una fase liquida, proveniente però da scarti agroindustriali o reflui urbani.

Questa tecnologia potrebbe potenzialmente risolvere i problemi legati alla produzione di energia da fonti rinnovabili come il fotovoltaico e l'eolico, metodi di generazione discontinui e strettamente vincolati alle condizioni ambientali, grazie alla possibilità di accumulare e stoccare il combustibile in fase liquida, per sfruttarlo in base alla richiesta energetica del mercato.

In questo modo sarebbe possibile ottenere energia utile direttamente dalle specie chimiche contenute nei reflui, senza dover passare attraverso un ciclo di calore intermedio o una digestione ad alta temperatura: l'energia chimica naturalmente presente all'interno delle molecole organiche verrà direttamente trasformata in energia elettrica, con la possibilità di raggiungere efficienze energetiche elevate. Infatti, nei biodigestori si assiste (anche) alla seguente reazione:



Conseguentemente, dei 24 e⁻ potenzialmente sfruttabili della molecola di glucosio se ne ricavano solamente 12, immagazzinati nella specie CH₄, quest'ultimo viene però impiegato in processi di combustione con efficienza variabile, ma sempre inferiore al 100%, perciò, dei 24 e⁻ iniziali, se ne ricavano dai 6 ai 10.

In una cellula vivente tutti i 24 e⁻ del glucosio vengono sfruttati, con un'efficienza unitaria, e accumulati in intermedi impiegati per generare energia utile all'organismo.

Una cella a biocombustibile si pone l'obiettivo di mimare il processo di produzione di elettroni di una cellula, per poi sfruttarli generando energia elettrica.

La capacità delle biofuel cells di lavorare su una grande varietà di substrati combustibili accoppiata all'opportunità di ottenere efficienze energetiche molto elevate permetterebbero la loro applicazione, oltre che come sistemi di trattamento di reflui urbani, da cui non solo si genererebbe energia, ma verrebbero inoltre almeno in parte purificati, anche a monte o a valle di altri sistemi di trattamento di biomasse. In particolare, potrebbero essere impiegate a valle dei digestori anaerobici per sfruttare completamente il contenuto energetico della biomassa alimentata processando anche la frazione liquida in uscita dal digestore aumentando così l'efficienza globale del processo.

Le celle a biocombustibile sfruttano sostanze di origine naturale, da risorse rinnovabili, e le convertono in prodotti non dannosi con contemporanea generazione di elettricità e calore.

Grazie alla loro natura versatile, le biofuel cells non sono limitate all'uso di idrogeno o metanolo come combustibile, e possono generare energia elettrica direttamente da biomasse o scarti agroalimentari processando un'elevata quantità di substrati organici.

Le celle a biocombustibile vengono classificate in sistemi che impiegano organismi viventi, come batteri o alghe, o che utilizzano catalizzatori estratti dalle cellule, come enzimi, apparati a cascata enzimatica e, più recentemente, mitocondri.

L'impiego di cellule viventi come catalizzatori nelle celle a combustibile microbiche (MFCS), rappresenta un'area di ricerca che ha suscitato notevole interesse nel corso dell'ultimo ventennio, grazie principalmente alla possibilità di convertire biomasse direttamente in energia elettrica, senza passare per un ciclo di calore intermedio, che abbasserebbe l'efficienza totale del processo.^{22, 23, 24}

Nonostante la tecnologia delle MFCS, nelle condizioni attuali, possa difficilmente trovare rilevanti applicazioni industriali, sono interessanti le applicazioni di nicchia, emergenti per questo nuovo settore tecnologico. Ad esempio, queste celle a combustibile microbiche sono state proposte per la fornitura di energia a dispositivi posti in regioni remote o ambienti estremi come quello marino²⁵, per combinare il trattamento dei rifiuti o di raffineria tramite digestione microbica anaerobica con la produzione di energia elettrica, o ancora possono agire come bio-sensori autoalimentati, che monitorano in tempo reale i livelli di BOD5²⁶ nelle acque reflue degli impianti di trattamento. Inoltre mostrano un notevole potenziale anche i sistemi microbici che utilizzano rifiuti o scarti agro-industriali come carburanti per ottenere un potenziale elettrico in uscita o che permettono di ottenere sostanze chimiche ad elevato valore aggiunto, come l'idrogeno.²⁷ Le celle a combustibile biologiche possono perciò utilizzare biocatalizzatori, enzimi, o interi organismi cellulari in due diversi modi: il biocatalizzatore può generare i substrati combustibili per la cella attraverso trasformazioni catalitiche o processi metabolici, oppure può partecipare direttamente alla catena di trasferimento elettronico tra i substrati combustibili e le superfici degli elettrodi.

Una cella a combustibile microbica (MFC) è un sistema costituito da due scompartimenti, separati da una membrana selettiva al passaggio di cationi, che garantisce l'elettroneutralità dei due comparti. Gli elettroni generati dal metabolismo dei microrganismi, mediante un mediatore vengono ceduti all'anodo della cella a combustibile e raggiungono poi il catodo attraverso il circuito, dove riducono l'ossidante. L'intero processo è schematizzato in Figura 10:

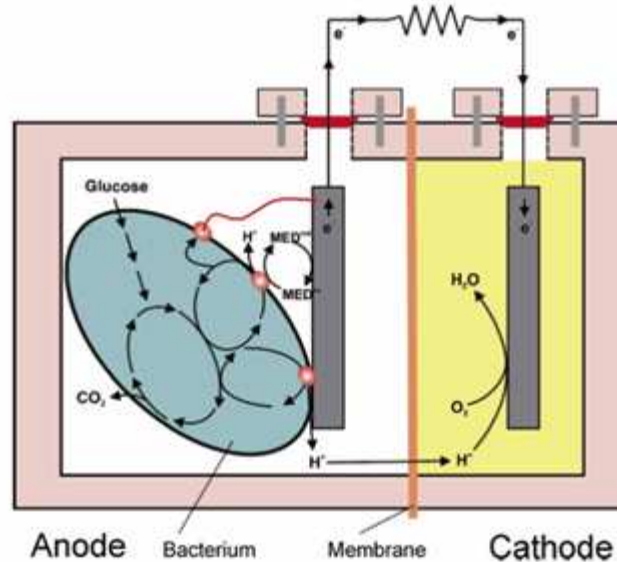


Figura 10: principio di funzionamento di una MFC (non in scala).²⁶

Contrariamente alle celle a combustibile tradizionali, le biofuel cells lavorano in condizioni blande, con soluzioni a pH neutro o debolmente acido e temperatura ambiente.

Le performance delle MFCS sono fortemente dipendenti da (i) la natura del substrato e la velocità del metabolismo anaerobico, e (ii) la natura e il tasso di trasferimento di elettroni dal microorganismo all'anodo.

Il compito fondamentale del microorganismo è quello di trasformare un substrato elettrochimicamente inattivo in una specie accessibile all'ossidazione elettrochimica ed infine la sua conversione in energia elettrica. Per sviluppare questa trasformazione è necessario avvalersi del metabolismo microbico, o più precisamente, del catabolismo.

Gli organismi eterotrofi recuperano l'energia necessaria alla propria sopravvivenza dall'ossidazione di composti organici o, più precisamente, dall'energia libera di Gibbs di ossidazione (ΔG_{ox}).

A seconda del coinvolgimento di sostanze esogene (esterne all'organismo) implicate nell'ossidazione, possono essere distinte due importanti vie metaboliche: la respirazione e la fermentazione.

Durante la respirazione gli elettroni liberati dall'ossidazione vengono trasferiti mediante un meccanismo redox a cascata, per essere infine ceduti ad un accettore di elettroni terminale

esterno. Tanto più il potenziale dell'accettore di elettroni è negativo, tanto più sarà alto il guadagno energetico per l'organismo:

$$\Delta G_o' = -nF [E_o'(\text{donatore}) - E_o'(\text{accettore})]$$

- E_o' rappresenta il rispettivo potenziale standard biologico;
- $\Delta G_o'$ indica l'entità della variazione di energia in condizioni standard biologiche.

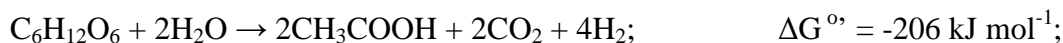
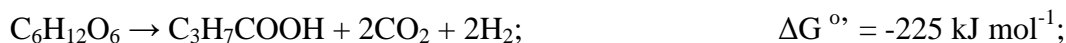
La respirazione aerobica è il cammino che garantisce il più alto guadagno di energia ma è associata ad ambienti in cui è disponibile l'ossigeno:



In condizioni anossiche gli organismi anaerobi possono utilizzare altre sostanze endogene, organiche o inorganiche, come accettori terminali di elettroni. Esempi di tali sostanze possono essere nitrati, solfati, CO_2 , e ioni metallici.^{28, 29, 30}

A causa dei potenziali redox meno positivi di questi ossidanti rispetto all'ossigeno, il guadagno energetico per gli organismi che impiegano tali sostanze endogene è sensibilmente inferiore rispetto a quello ottenibile dalla respirazione aerobica.

In assenza di sostanze ossidanti esogene, molti microrganismi intraprendono la strada della fermentazione, una sorta di disproporzionamento, in cui parti del substrato organico si comportano come accettori di elettroni e si riducono mentre allo stesso tempo altre parti vengono ossidate.²⁸



Le reazioni riportate sopra dimostrano come la fermentazione del glucosio a butirato o acetato sia un percorso con un basso guadagno di energia, in cui solo il 7-8% del contenuto

energetico del glucosio viene trasformato in energia per essere utilizzato dai microrganismi. Questo basso sfruttamento energetico è causato da un'incompleta ossidazione del substrato.

Esistono diversi requisiti alla base di un efficace trasferimento elettronico tra il microrganismo e la superficie degli elettrodi. Dato che questi ultimi sono entità fisiche incapaci di penetrare la membrana batterica della cellula, il requisito più importante è che gli elettroni possano essere trasferiti dall'interno della membrana cellulare fino alla superficie esterna attraverso un trasferimento fisico di mediatori ridotti o un hopping elettronico catalizzato da enzimi attraverso la membrana.

Indipendentemente dal meccanismo con cui vengono trasferiti gli elettroni è necessaria la presenza di specie redox attive in grado di collegare elettronicamente la cellula batterica all'elettrodo.

Per garantire un efficace trasferimento elettronico è necessario soddisfare i seguenti requisiti:

1. contattare fisicamente la superficie dell'elettrodo;
2. impiegare specie elettrochimicamente attive che devono possedere potenziali di ossidazione bassi rispetto alla superficie dell'elettrodo;
3. il potenziale standard delle specie che agiscono da trasferitori deve essere il più vicino possibile al potenziale redox del substrato primario e significativamente inferiore rispetto a quello dell'ossidante.

Le celle a combustibile microbiche vengono solitamente differenziate in base al meccanismo con cui gli elettroni si spostano:

- DET: direct electron transfer;
- MET: mediated electron transfer.

Il DET è un meccanismo che prevede un contatto fisico diretto tra la membrana cellulare del microrganismo e l'anodo della cella, senza che alcuna specie redox venga coinvolta nel trasferimento elettronico. Il trasferimento diretto di elettroni dipende dalla presenza nella membrana del microrganismo di proteine capaci di trasferire gli elettroni dall'interno delle cellule batteriche fino alla superficie esterna, ciò garantisce il trasferimento elettronico fino ad un accettore esterno.

Il DET richiede perciò un contatto fisico tra il microrganismo e l'anodo, conseguentemente solo i batteri nel primo monostrato della superficie anodica saranno elettrochimicamente attivi e le performance della MFC sarà limitata dalla massima densità di cellule nel monostrato.

Alcuni scienziati ritenevano che il DET fosse l'unica scelta possibile per un'efficiente generazione di corrente in una cella microbica a combustibile. Attualmente, tuttavia, le performance dei sistemi DET si sono dimostrati essere notevolmente inferiori a sistemi basati su un trasferimento mediato di elettroni.³⁰ Il meccanismo MET rappresenta un'efficace maniera per collegare il metabolismo microbico all'anodo delle fuel cell, in questo senso sono stati proposti parecchi approcci, classificati generalmente in base alla natura delle specie redox impiegate come mediatori:

1. MET *via* mediatori redox artificiali;
2. MET *via* metaboliti secondari;
3. MET *via* metaboliti primari.

1. Nel 1930 B. Cohen dichiarò che alcune colture batteriche coltivate in condizioni anaerobiche, interfacciate a MFCS, sebbene mostrassero un potenziale fortemente negativo, producessero una corrente generalmente bassa.³¹ Le scarse performance di queste MFCS furono attribuite alla mancanza di specie elettrochimicamente attive e sufficientemente mobili.

Come soluzione a questo problema è stata proposta l'introduzione di sostanze organiche o inorganiche come benzochinone o potassio ferricianuro, capaci di facilitare il trasferimento elettronico dalle colture batteriche fino alla superficie dell'elettrodo, i più comuni mediatori impiegati nella costruzione di MFCS sono schematizzati in Figura 11.

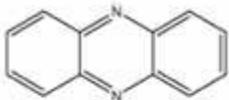
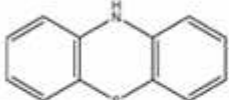
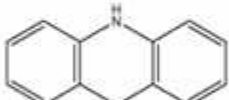
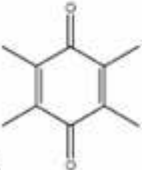
| Substance class | Redox mediator | Redox potential $E^{0'}/V$ |
|--|-------------------------------|----------------------------|
|  Phenazines | Neutral Red | -0.32 |
| | Safranine | -0.29 |
| | Phenazine ethosulfate | 0.06 |
|  Phenothiazines | New Methylene Blue | 0.02 |
| | Toluidine Blue O | 0.03 |
| | Thionine | 0.06 |
| | Phenothiazinone | 0.13 |
|  Phenoxazines | Resorufin | -0.05 |
| | Gallocyanine | 0.02 |
|  Quinones | 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone | -0.14 |
| | Anthraquinone-2,6-disulfonate | -0.18 |

Figura 11: classici mediatori redox eterogenei per MFCS.

Il più grande svantaggio derivante dall'uso di mediatori redox artificiali è, oltre alle basse densità di corrente generalmente estraibili dalla cella, la necessità di una regolare aggiunta della specie estranea, che è tecnologicamente impraticabile e ambientalmente discutibile.

2. Spesso i microrganismi crescono in condizioni in cui non sono disponibili nell'immediata vicinanza della membrana né accettori di elettroni solubili né solidi (per DET). Una condizione tipica è la presenza di un biofilm spesso, dove, ad esempio, la diffusione dell'ossigeno nella membrana è limitata e la cellula non è in contatto diretto con un accettore di elettroni. Il microrganismo può in questi casi utilizzare una sostanza esterna al batterio stesso, solitamente acidi umici o metalli chelati, che si comportino come spole tra le specie riducenti e quelle ossidanti, come visibile in Figura 12. In assenza di questi composti il microrganismo può sintetizzare autonomamente dei mediatori a basso peso molecolare che gli permetterebbero di procedere il ciclo metabolico.^{32, 33, 34} Queste specie vengono dette metaboliti secondari e il meccanismo è chiamato MET via metaboliti secondari, la produzione di queste navette elettroniche è, però, energeticamente costosa, ciò comporta ulteriori perdite biologiche.

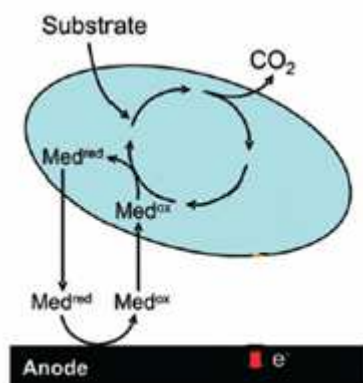


Figura 12: illustrazione schematica del Mediated Electron Transfer.

3. Il MET via metaboliti primari è strettamente associato alla degradazione del substrato ossidativo: la quantità totale di equivalenti riducenti prodotti corrisponde alla quantità di metaboliti ossidati generati dall'interazione con l'anodo. Per essere utilizzabile come riducente per l'ossidazione anodica il metabolita deve soddisfare determinati requisiti: il suo potenziale redox dev'essere quanto più possibile negativo e accessibile all'ossidazione elettrochimica nelle MFCS. In linea di principio, due importanti vie metaboliche anaerobiche possono portare alla formazione di metaboliti ridotti adatti all'utilizzo nel MET via metaboliti primari nelle MFCS : respirazione anaerobica e fermentazione.

Tutti i processi sopra si avvalgono dell'utilizzo di un mediatore, quest'ultimo è un accettore terminale reversibile di elettroni, che può scambiare elettroni sia negli strati aerobici del biofilm, sia con un elettrodo solido inorganico, da cui viene riossidato e torna disponibile ad ulteriori processi ossidoriduttivi.

Una molecola può quindi servire per migliaia di cicli redox. Di conseguenza, l'impiego di piccole quantità di questi composti permette all'organismo di smaltire gli elettroni prodotti a velocità elevate.

Il guadagno di energia per i microrganismi ($\Delta G^{\circ}_{\text{biol}}$) è legato al metabolismo microbico, quindi, la perdita di energia elettrica per una MFC, è un passaggio voluto e necessario. Esso consente il mantenimento della vitalità batterica (un prerequisito per la lunga durata di

funzionamento della cella a combustibile) ed è spesso la forza trainante per l'organismo, che lo spinge a intraprendere determinati meccanismi di trasferimento elettronico. La Figura 13 illustra le perdite energetiche ed elettrochimiche associate ad ogni fase del trasferimento elettronico.

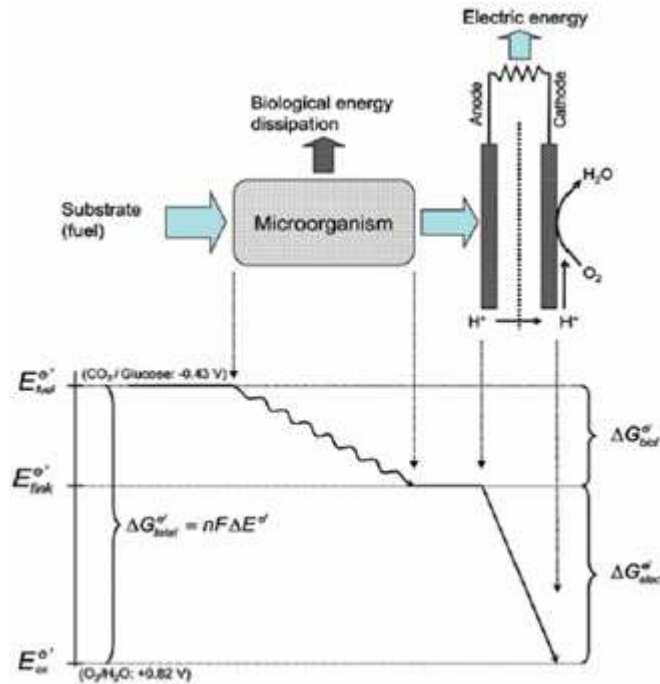


Figura 13: schematizzazione del flusso energetico in una cella a combustibile microbica.

D'altra parte, se il guadagno di energia biologica diventa troppo grande, la produzione di energia elettrica ($\Delta G^{0'}_{elec}$) può calare bruscamente e, come conseguenza, si assiste a una forte crescita cellulare e alla formazione indesiderata di biomassa. A causa di ciò, devono essere rilevati efficaci percorsi di trasferimento elettronico e adatte vie metaboliche che consentono il funzionamento della MFC accoppiato alla massima produzione di energia elettrica.

In conclusione si può affermare che i vantaggi derivanti dallo sviluppo di una cella microbica alimentata a biocombustibile sono notevoli, soprattutto se valutati in funzione dell'*economia degli elettroni*, o Smart Grid, di cui si è discusso sopra.

L'utilizzo di microrganismi permette inoltre di risolvere le problematiche connesse alla lavorazione di biomasse, specie solitamente caratterizzate dalla presenza di molecole diverse al proprio interno e con produzioni solitamente stagionali.

Un impianto pilota costituito da 12 celle collegate tra loro con capacità di 1m^3 è stato installato nel 2009 in una birreria australiana, nel Queensland. Queste MFC trattano le acque reflue derivanti dalla produzione della birra e non solo permettono di ottenere potenza elettrica in uscita utile per alimentare i macchinari impiegati nel processo produttivo ma fornisce anche acqua purificata che può essere riciclata tal quale.³⁵

Un esempio di cella biocatalitica enzimatica, già realizzata all'interno del Dipartimento di Chimica Industriale, nell'ambito del progetto Spinner Energy 24, utilizza come substrati perossido di idrogeno e glucosio.³⁶

Le celle enzimatiche (EFC) impiegano come catalizzatori enzimi redox solubili per ossidare il substrato, sfortunatamente la maggior parte di questi enzimi non prendono direttamente parte a trasferimenti elettronici con supporti conduttivi, per questo motivo, in accoppiamento a questi ultimi, si utilizza una vasta gamma di mediatori elettronici che garantiscono il contatto elettrico tra il biocatalizzatore e l'elettrodo.

La riduzione biocatalizzata dell'acqua ossigenata è stata ampiamente studiata in presenza di varie tipologie di perossidasi (horseradish peroxidase, microperoxidase-11).³⁷

L'ossidazione elettrochimica dei combustibili, se non realizzata tramite microrganismi, può essere catalizzata da differenti classi di enzimi redox, tra cui ossidasi o deidrogenasi, in base alle quali variano i prodotti generati, i substrati di partenza e le performance della cella.

Generalmente, deidrogenasi come la Glucosio Deidrogenasi, GDH, necessitano di cofattori NAD^+ per catalizzare l'ossidazione del glucosio ed elettrodi capaci di catalizzare l'ossidazione del NADH e la rigenerazione di NAD^+ .

1.7.1 Enzimi redox

Gli enzimi redox che prendono parte alle reazioni oggetto di studio possono essere separati e purificati dai microrganismi viventi in cui sono contenuti e impiegati come biocatalizzatori nelle celle a combustibile al posto dell'intero microrganismo.

Gli enzimi sono però composti chimici sensibili e costosi, dunque è necessario adottare speciali tecniche di stabilizzazione ed utilizzo.

L'enzima specifico che ossida il substrato combustibile può essere messo direttamente in contatto elettrico con l'elettrodo della cella a combustibile. Tuttavia, gli enzimi redox mancano, come già accennato, di una comunicazione elettrica diretta ed efficace con l'elettrodo, a causa dell'isolamento del centro redox dal supporto conduttivo da parte della matrice della proteina. Per ovviare a questo problema si ricorre, solitamente, all'utilizzo di mediatori di trasferimento elettronico.

In conclusione, riguardo all'utilizzo degli enzimi nelle celle a biocombustibile, occorre utilizzare biocatalizzatori ossidanti nel compartimento anodico, accoppiati a mediatori diffusionali.

In questo lavoro di tesi ci si è concentrati sulla fase di trasferimento elettronico tra NADH ed elettrodo, processo catalizzato da Diaforasi (Figura 14).

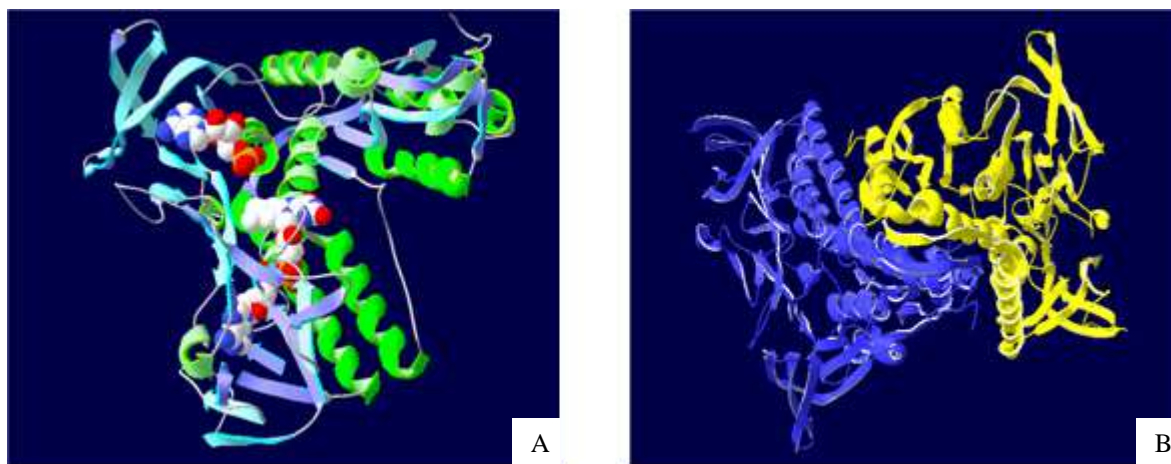


Figura 14: Diaforasi monomero con evidenziata la struttura terziaria: le α -eliche in verde e β -sheet in blu, in figura A sono inseriti anche i coenzimi NAD e FAD. In B è visibile la Diaforasi dimero con evidenziata la struttura terziaria (visualizzazione CPK).

L'enzima Diaforasi da *Clostridium kluyveri* è una flavoproteina che fa parte di una più ampia classe di enzimi ossidoriduttivi NADH dipendenti e con un'abbondante possibilità di scelta di recettori come cosubstrato.

1.7.2 Mediatori redox

Come le microbial fuel cells, anche le celle enzimatiche presentano il problema dell'isolamento elettrochimico del centro redox, questo isolamento spaziale preclude in genere la possibilità di trasferimento elettronico diretto alla superficie dell'elettrodo.

Un fondamentale prerequisito per lo sviluppo di sistemi integrati enzima/elettrodo è il controllo del processo di trasferimento elettronico tra il componente biologico e la superficie dell'elettrodo che dipende in maniera molto significativa dalla distanza del centro redox dell'enzima dalla superficie del trasduttore adoperato.

Materie biologiche e trasduttori elettronici sono, infatti, sistemi di natura differente e ciò comporta inevitabilmente una difficoltà di comunicazione fra i due componenti in esame.

Se consideriamo il centro redox enzimatico e l'elettrodo come una coppia accettore-donatore, diventa chiaro che i vari strati di proteina che circondano il centro attivo, rappresentano un ostacolo notevole al processo di trasferimento elettronico. L'isolamento elettrochimico del sito attivo dell'enzima da parte della proteina stessa generalmente preclude la possibilità di un trasferimento elettronico diretto con gli elettrodi.

Una soluzione a questo problema è l'utilizzo di mediatori redox, liberi in soluzione o supportati.

I mediatori sono degli agenti di trasferimento elettronico che possono agire da substrato per molti enzimi redox. sostituendo gli ossidanti o riducenti naturali e infine partecipare alle reazioni ossidoriduttive con gli enzimi stessi migliorandone così la comunicazione elettronica verso l'elettrodo (Figura 15).

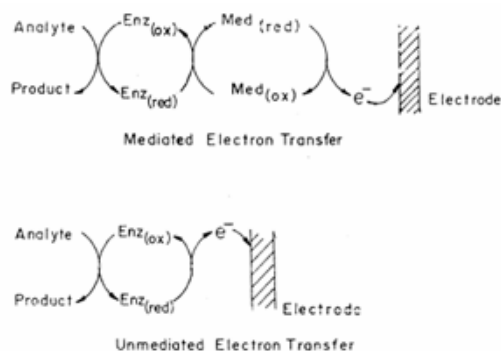


Figura 15: schema del processo di trasferimento elettronico mediato e non mediato nelle Enzimatic Fuel Cells.

L'utilizzo di mediatori elettronici diffusionali quali ferroceni, chinoni, complessi dell'osmio o sali biperidinici, è risultato un metodo molto efficiente nel diminuire la distanza efficace tra i centri accettore e donatore, contribuendo oltremodo a limitare i problemi dovuti ad interferenti redox presenti nell'ambiente di reazione.

Questi mediatori hanno un gran numero di strutture diverse e quindi di proprietà diverse, inclusi i potenziali standard di ossidoriduzione.

Nel processo di trasferimento di carica tra il centro redox e l'elettrodo, il mediatore di trasferimento elettronico si ossida e si riduce, ciclicamente. Quest'ultimo, quindi, deve risultare stabile in entrambe le forme, ossidata e ridotta ed ogni reazione parassita tra il mediatore e l'enzima o l'ambiente deve essere eliminata.

Per essere efficace nel suo ruolo, il mediatore non deve competere col substrato naturale dell'enzima o con altre sostanze, in modo da non deviare il flusso di elettroni da e verso l'elettrodo, inoltre deve garantire una reazione rapida con l'enzima, riducendo o ossidando quest'ultimo. Per questo motivo, un mediatore deve presentare un'elettrochimica nota e reversibile.

Sono stati sviluppati diversi approcci e molti sistemi bioelettrochimici per aumentare il contatto elettrico tra gli enzimi e le superfici degli elettrodi attraverso l'uso di mediatori redox.

Lo sviluppo di queste efficienti metodologie di contatto elettrico ha portato alla costruzione di numerosi biosensori amperometrici e sistemi bioelettrocatalitici inclusi bioreattori e celle a biocombustibile.

Il trasferimento elettronico mediato può essere influenzato da un meccanismo di tipo diffusionale, in cui il mediatore elettronico viene ossidato e ridotto alla superficie dell'elettrodo, come illustrato in Figura 16.

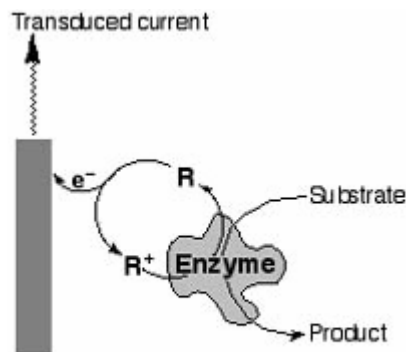


Figura 16: collegamento elettrico di un enzima ossidativo attraverso un mediatore diffusionale che trasporta elettroni dal sito attivo dell'enzima all'elettrodo.

La diffusione del mediatore in prossimità del centro attivo dell'enzima all'interno della matrice della proteina è controllata dalle proprietà idrofobiche / idrofiliche del mediatore e dell'enzima, dalla dimensione e dalla forma del mediatore e dalle interazioni elettrostatiche tra mediatore ed l'enzima, in ogni caso il mediatore necessita di una via di diffusione libera tra il supporto conduttivo e le molecole di enzima.

Ferrocene, coloranti organici, ferrocianuro, complessi del rutenio e altri substrati elettrochimicamente attivi vengono comunemente impiegati come mediatori diffusionali.

In particolari condizioni alcuni derivati del ferrocene presentano notevoli inconvenienti legati alla diminuzione di solubilità in certi intervalli di potenziali di lavoro, a causa di questo genere di ostacoli e per ottenere un sistema più stabile e solido si preferisce solitamente immobilizzare il mediatore stesso sulla superficie elettrodica in maniera tale da sviluppare un trasferimento eterogeneo.

Sulla superficie dell'elettrodo possono essere inoltre immobilizzati anche gli enzimi redox, in sistemi monostrato o multistrato, utilizzando reagenti bifunzionali capaci di dare luogo a legami covalenti tra gli strati o sfruttando interazioni tra enzima e supporto.

Tuttavia, il contenuto in enzima di un singolo strato è generalmente basso e ciò si traduce in un basso segnale in uscita, dunque, è necessario un aumento del contenuto di enzima per ottenere una corrente rilevabile, ciò può essere fatto mediante deposizione controllata di più strati enzimatici, permettendo così di ottenere un segnale elettrochimico più forte e controllabile mediante ottimizzazione del numero di strati.

Il più importante parametro legato alla scelta del mediatore è un'elevata costante di trasferimento elettronico, generalmente indicata con K_{et} , quest'ultima varia da mediatore a mediatore ed è funzione del tipo di enzima impiegato.

Fortunatamente, i mediatori di carica sono molecole contenenti anelli aromatici e con ampia risonanza, quindi, assorbono la radiazione visibile o UV e si prestano a rivelazioni spettrofotometriche.

1.7.2.1 Blu di metilene

NomeIUPAC:

3,7-bis(Dimethylamino)-phenazathioniumchloride Tetramethylthioninechloride.

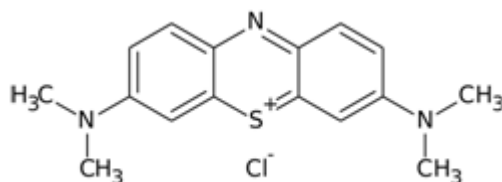


Figura 17: struttura molecolare del Blu di metilene.

Il metilene blu (Figura 17) è una molecola eterociclica aromatica, si presenta in forma solida a temperatura ambiente, con alta solubilità in acqua e largamente impiegato in chimica e biologia.

L'impiego principale dal punto di vista chimico è come indicatore in reazioni redox, infatti il blu di metilene in ambiente riducente si decolora svolgendo in pieno il ruolo di indicatore.

In biologia, invece, questa molecola viene utilizzata come marcatore per il saggio Gram o come marcatore per vedere l'RNA al microscopio.

Il blu di metilene viene anche utilizzato per rivelare la vitalità di un ceppo di lieviti, infatti se viene decolorato indica il progredire del metabolismo cellulare in quanto gli enzimi ossidoriduttivi coinvolti riducono il substrato blu, decolorandolo, altresì se il blu di metilene non viene decolorato questo non simboleggia la morte cellulare ma l'inattività o la denaturazione degli enzimi dediti alla riduzione di tale sostanza. Vista la grande applicazione in campo biologico e quindi la facilità di riduzione da parte di enzimi cellulari e la semplicità con cui l'ossigeno riesce a riossidarlo, il blu di metilene è stato scelto come mediatore per la costruzione della cella a biocombustibile, dovrà trasportare gli elettroni generati dall'ossidazione del NADH fino all'elettrodo.

1.7.3 NADH e NAD⁺

Scoperto nel 1904 da Harden e Young, in una miscela di composti ottenuta da estratti deproteinizzati di lievito, fu successivamente isolato nel 1936 da von Euler, Walburg e Christian.

Dalla coppia redox NADH/NAD⁺ (Figura 18), dipendono oltre cinquecento differenti reazioni legate alla sola famiglia enzimatica delle ossidoriduttasi.

Questo cofattore funge da accettore di ione idruro H⁻, prodotto da reazioni catalizzate dalla classe di enzimi deidrogenasi piridiniche. Poiché tali reazioni sono reversibili e sono dipendenti dal pH, ne consegue che il NADH può anche venire riossidato a seconda delle necessità.

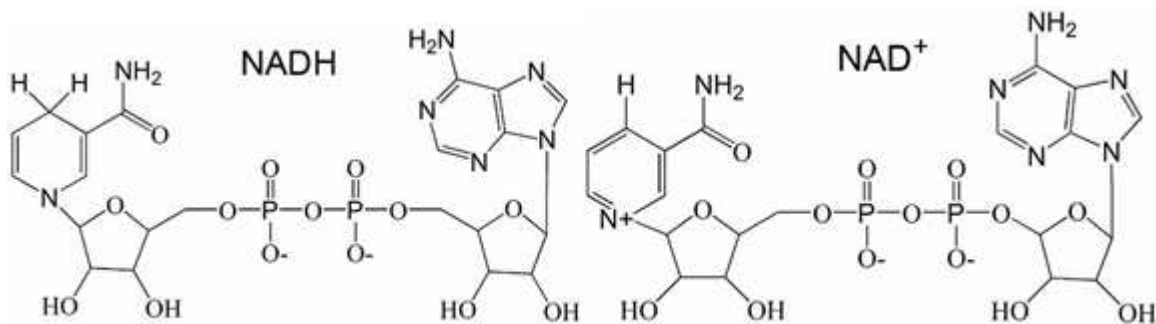


Figura 18: struttura molecolare di NADH e NAD⁺.

La coppia redox NADH / NAD⁺ è presente, tra i vari processi, anche in quelli catabolici di molti nutrienti tra cui gli zuccheri: nella glicolisi, nel ciclo di Krebs e nella fosforilazione ossidativa. Il principale vantaggio derivante dall'utilizzo di questo cofattore è legato al valore negativo del potenziale di riduzione standard della reazione:



Combinato con le principali semireazioni di interesse biologico consente di avere un ΔE° complessivamente positivo con il conseguente svolgimento della reazione di ossidoriduzione desiderata.

1.7.4 Glicolisi e ciclo di Krebs

I processi catabolici sono generalmente ossidativi ed esoergonici: ad essi è associata la produzione di energia, tipico esempio è la reazione di ossidazione del glucosio:



I processi anabolici sono generalmente riduttivi ed endoergonici, richiedono perciò un apporto di energia.

Negli organismi viventi questi processi vengono svolti in maniera complementare: si impiegano specie ad alto contenuto energetico, come il glucosio, che vanno incontro a degradazioni ossidative durante il catabolismo, l'energia accumulata in questa fase, sotto forma di ATP, viene poi consumata nei processi anabolici tramite biosintesi riduttive.

In molti organismi l'energia che occorre per la sintesi di ATP deriva da un processo ossidativo, effettuato da un sistema di trasporto specializzato, detto "catena respiratoria", quest'ultimo viene differenziato in respirazione aerobica od anaerobica nei casi in cui gli organismi vivano, rispettivamente, in presenza od in assenza di ossigeno atmosferico. Tutte le respirazioni, sia aerobiche che anaerobiche, avvengono a livello di catene trasportatrici di elettroni, nelle cellule, infatti, molecole "combustibile" vengono ossidate, trasferendo gli elettroni prodotti ai coenzimi piridinici NAD^+ e flavinici FAD , che, al termine del processo, si trovano sotto forma ridotta NADH e FADH_2 (Figura 19).

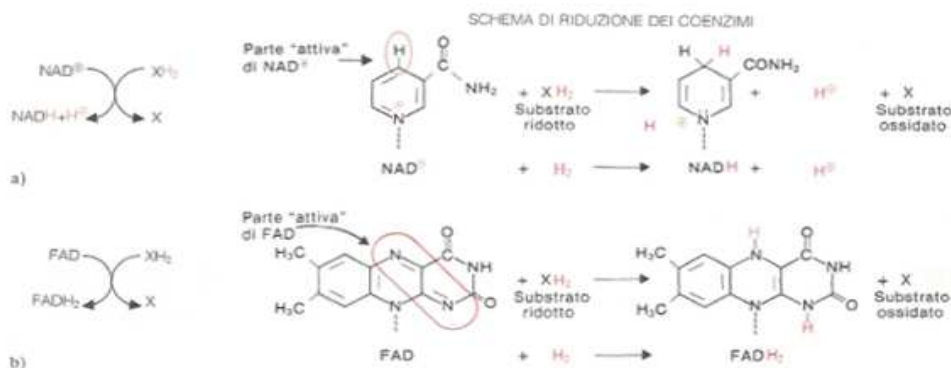
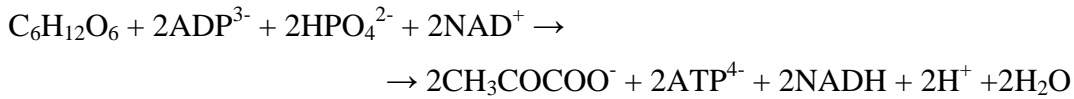


Figura 19: coenzimi agenti delle ossidazioni biologiche e relative schematizzazioni: a) NAD^+ deidrogena soprattutto carboni con funzioni ossigenate. b) FAD deidrogena i legami carbonio-carbonio.³⁸

Tra le vie cataboliche dei carboidrati si prendono in esame glicolisi e ciclo di Krebs. La glicolisi, schematizzata in Figura 20, è un'importante via, che inizia dal glucosio. La stechiometria della reazione globale è:



La molecola con formula bruta $\text{CH}_3\text{COCOO}^-$ è una molecola di piruvato, in condizioni anaerobiche, perciò, una molecola di glucosio viene scissa in due molecole di piruvato, generando allo stesso tempo specie ad alto contenuto energetico, come ATP e NADH.

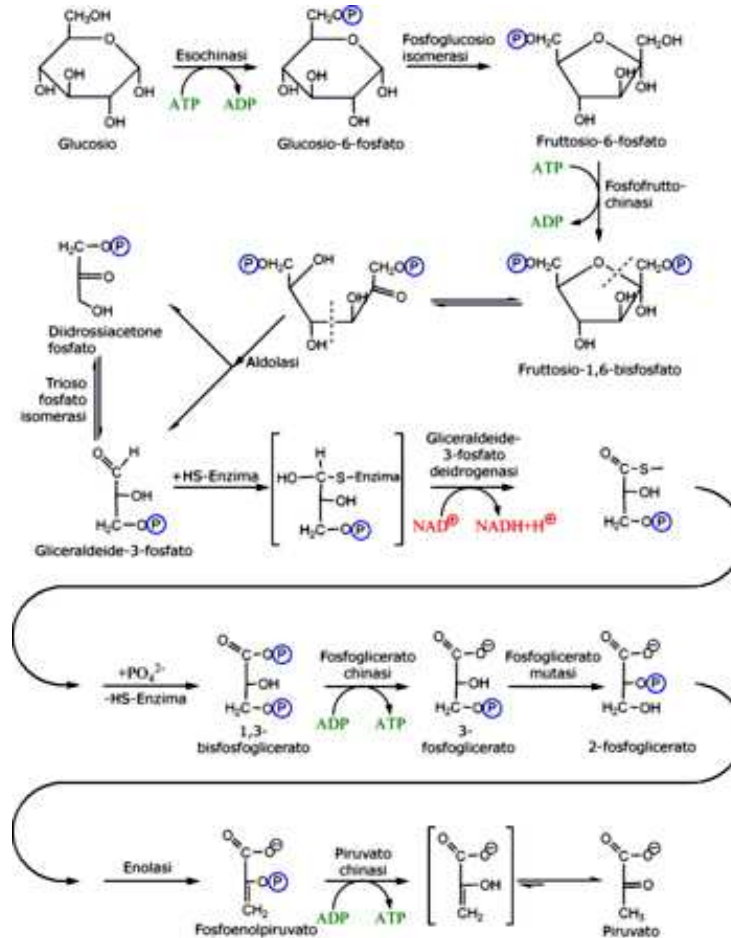


Figura 20: schematizzazione del processo di Glicolisi.

Le due molecole di piruvato generate nel processo di glicolisi approdano poi al ciclo di Krebs, illustrato in Figura 21.

Il ciclo di Krebs è un ciclo metabolico di importanza fondamentale in tutte le cellule che utilizzano ossigeno nel processo di respirazione cellulare. Negli organismi aerobi, il ciclo di Krebs è l'anello di congiunzione delle vie metaboliche responsabili della degradazione dei carboidrati, dei grassi e delle proteine, in anidride carbonica ed acqua. A questo processo è associata la produzione di energia sotto forma di ATP.

Il ciclo di Krebs è una via metabolica anfibolica, poiché partecipa sia a processi catabolici che anabolici. Il ciclo fornisce infatti anche molti precursori per la produzione di alcuni amminoacidi e di altre molecole fondamentali per la cellula.

L'equazione globale a partire da piruvato è:

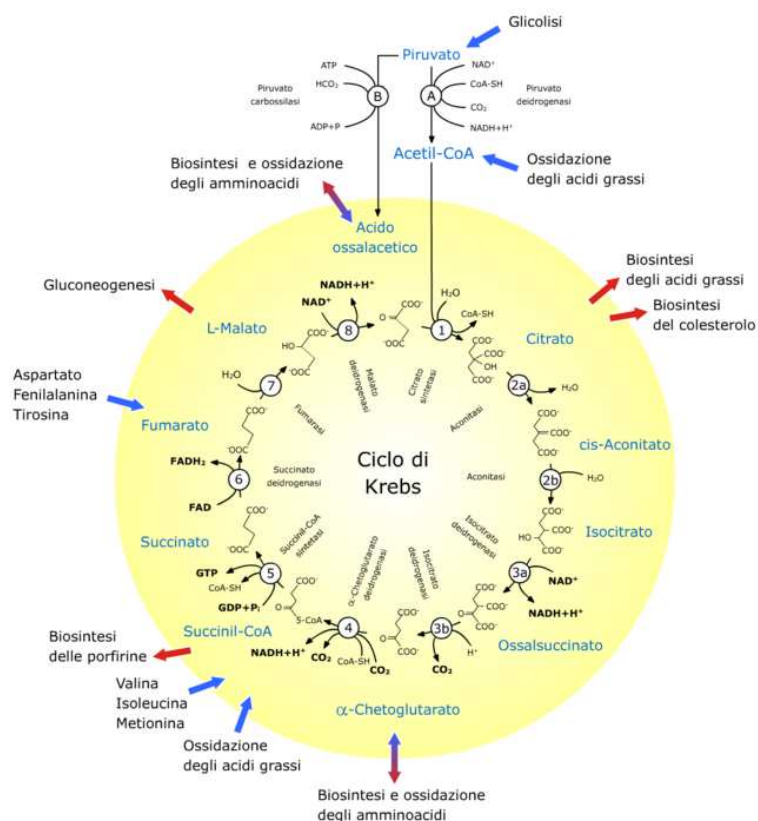
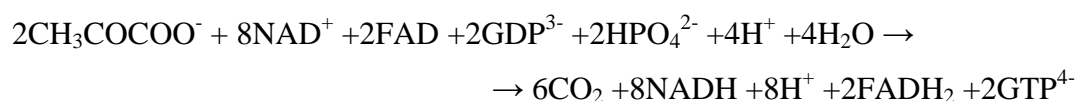


Figura 21: schematizzazione del ciclo di Krebs.

In totale da due distinti processi vengono prodotte ben 10 molecole di NADH e 2 di FADH₂, per un totale di 24 elettroni, che la cellula trasferisce all'ossigeno attraverso la catena respiratoria, impiegando l'energia rilasciata per la sintesi di 23 molecole di ATP durante la fosforilazione ossidativa.

Se si potesse interrompere quest'ultimo passaggio e recuperare dalla cellula stessa le 12 molecole di coenzima ridotte, per utilizzarle per generare elettricità, si otterrebbe un sistema estremamente efficiente di produzione di energia a partire da fonti rinnovabili, scarti agroalimentari o acque reflue.

Come riportato sopra l'energia ricavabile dalla combustione del glucosio è pari a 2868 kJ mol⁻¹ e nell'organismo se ne ricavano 38 molecole di ATP (Figura 22).

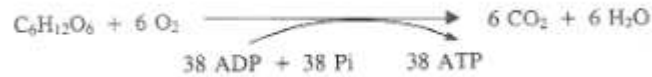


Figura 22: schematizzazione del processo di fosforilazione ossidativa.

Il ΔG della catena respiratoria si calcola secondo la formula:

$$\Delta G = - n F \Delta E^{\circ}$$

- n: numero di elettroni scambiati;
- F: costante di Faraday;
- ΔE° : differenza dei potenziali di riduzione standard delle due semireazioni.



$$- \Delta E^{\circ} = 0,82 - (-0,32) = + 1,14 \text{ V;}$$

In totale vengono prodotte 38 molecole di ATP corrispondenti ad un guadagno energetico di:

$$(38 \times 30,6 \text{ kJ mol}^{-1}) = 1161 \text{ kJ mol}^{-1}; \quad \textit{energia utile};$$

$$(2868 \text{ kJ mol}^{-1} - 1161 \text{ kJ mol}^{-1}) = 1707 \text{ kJ mol}^{-1}; \quad \text{energia dissipata;}$$

Il rendimento del processo di fosforilazione ossidativa si può calcolare dal rapporto tra energia incamerata sotto forma di ATP ed energia totale sviluppata:

$$\text{resa} = [(1161 \text{ kJ mol}^{-1} \times 100) / 2868 \text{ kJ mol}^{-1}] = 40,5\%.$$

Il resto dell'energia liberata nel processo della fosforilazione ossidativa viene dissipata sotto forma di calore.

Il calcolo empirico sviluppato non tiene tuttavia conto del fatto che le concentrazioni degli intermedi metabolici siano lontane dalle concentrazioni 1M tipiche dello stato standard. Se si considera l'effettiva concentrazione di ATP, ADP e fosfato in una cellula, il recupero energetico legato alla produzione dei 38 ATP è superiore al 65%.³⁸

2 SCOPO

In un mondo dominato dal petrolio e dallo strapotere di chi ne gestisce l'estrazione e la commercializzazione, nasce la forte esigenza di affrancarsi da questa schiavitù politica, economica ed etica.

Questa fonte di energia, che ha trainato lo sviluppo dell'umanità per oltre un secolo, sta da tempo mostrando i suoi limiti e i risvolti negativi che l'accompagnano, in termini di inquinamento ambientale ed effetti negativi sulla salute umana.

Le fonti energetiche rinnovabili offrono, potenzialmente, una soluzione a questo problema e lo sviluppo di una tecnologia innovativa promette la possibilità di sfruttare quelle fonti di energia delle quali l'uomo ha sempre compreso l'importanza, pur non potendo disporre a sufficienza per mancanza di idonei strumenti di trasformazione.

Queste fonti sono inesauribili perché regolate direttamente o indirettamente da fenomeni esterni al nostro pianeta e pulite perché la loro trasformazione non genera inquinamento.

In questo campo, le celle a biocombustibile sono ottimi candidati come sistemi di generazione di elettricità caratterizzati da alta efficienza e basso impatto ambientale.

Le celle a biocombustibile sono dispositivi che utilizzano enzimi o microrganismi per la conversione diretta di specie chimiche ad alto contenuto energetico in trasportatori di carica capaci di scambiare elettroni con gli elettrodi.³⁹ La forza motrice della pila è direttamente legata al processo ossidoriduttivo.

Abbondanti materiali organici di scarto come alcoli, acidi organici o carboidrati possono essere impiegati come substrati per il processo ossidativo.

Scopo del presente lavoro di ricerca è lo sviluppo in vitro di un processo elettrochimico che mimi la fosforilazione ossidativa, interfacciato ad una cella a biocombustibile, nell'ottica di sostituire il procedimento artificiale a quello naturale. Ciò permetterebbe di veicolare gli elettroni generati dal metabolismo cellulare su un circuito esterno, sfruttandoli come fonte di energia elettrica.

In particolare si è studiato ed ottimizzato il meccanismo di ossidazione del NADH, accoppiato alla reazione di riduzione dell'ossigeno.

L'enzima utilizzato per la realizzazione di tale dispositivo è la Diaforasi; questo, ossidando il NADH nel comparto anodico, immette elettroni nel circuito esterno attraverso un mediatore redox, capace di veicolarli fino alla superficie dell'elettrodo. Da qui gli elettroni giungono al compartimento catodico dove riducono l'ossidante disciolto in soluzione (Figura 23).

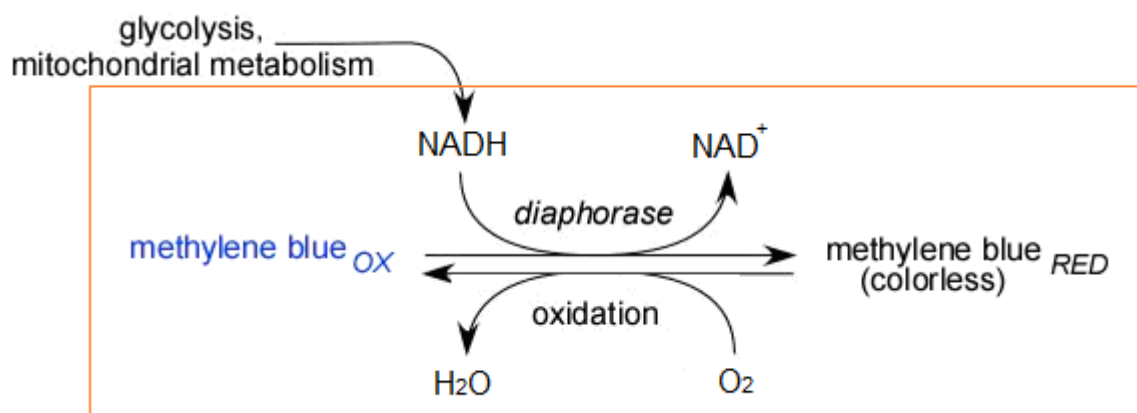


Figura 23: processo elettrochimico oggetto di studio. Il riquadro rosso rappresenta il meccanismo sviluppato.

Il lavoro di tesi è stato quindi strutturato in una prima fase di taratura della strumentazione utilizzata nelle misurazioni elettrochimiche attraverso lo sviluppo di una pila standard.

In seguito, si è caratterizzato un processo elettrochimico interfacciato ad una pila a combustibile, che preveda tutte le specie chimiche libere in soluzione ed elettrodi inorganici.

Si è quindi studiata, per via spettrofotometrica, la reazione da sviluppare nel comparto anodico della pila NADH/O₂.

Infine, si è interfacciata la reazione, precedentemente studiata, alla pila a biocombustibile, sviluppando il processo biomimetico della fosforilazione ossidativa.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Apparati

3.1.1 Descrizione di una cella a combustibile

Una cella a combustibile è un dispositivo capace di convertire energia chimica in energia elettrica, in questo dispositivo viene condotta una reazione di ossidoriduzione tra un componente riducente ed un ossidante.

Il riducente si ossida perdendo elettroni ed allo stesso tempo l'ossidante li acquista riducendosi. Configurando opportunamente la cella è possibile intercettare il flusso di elettroni e sfruttarlo generando una corrente elettrica continua legata alla concentrazione ed al tipo delle specie costituenti la cella stessa.

Le celle a combustibile propriamente dette prevedono l'alimentazione dei reagenti coinvolti nella reazione di ossidoriduzione dall'esterno della cella stessa, tuttavia, essendo questo uno studio preliminare svolto con l'obbiettivo di comprendere approfonditamente i meccanismi di scambio elettronico all'elettrodo, non ci si è concentrati sull'aspetto ingegneristico del dispositivo ma piuttosto sull'aspetto elettrochimico. Di conseguenza si sono costruiti apparati che prendono il nome di pile a combustibile, ciononostante, in questo lavoro di tesi, i termini pila e cella saranno usati in maniera complementare.

3.1.2 Realizzazione della pila a combustibile

La realizzazione della pila a combustibile prevede l'assemblaggio di quattro componenti diversi:

- Semicella anodica, nella quale avviene la reazione di ossidazione della specie riducente, chiamato anche combustibile;
- Semicella catodica, nella quale avviene la reazione di riduzione dell'ossidante, anche detto comburente;
- Ponte salino contenente l'elettrolita;
- Multimetro (SourceMeter Keithley serie 2400).

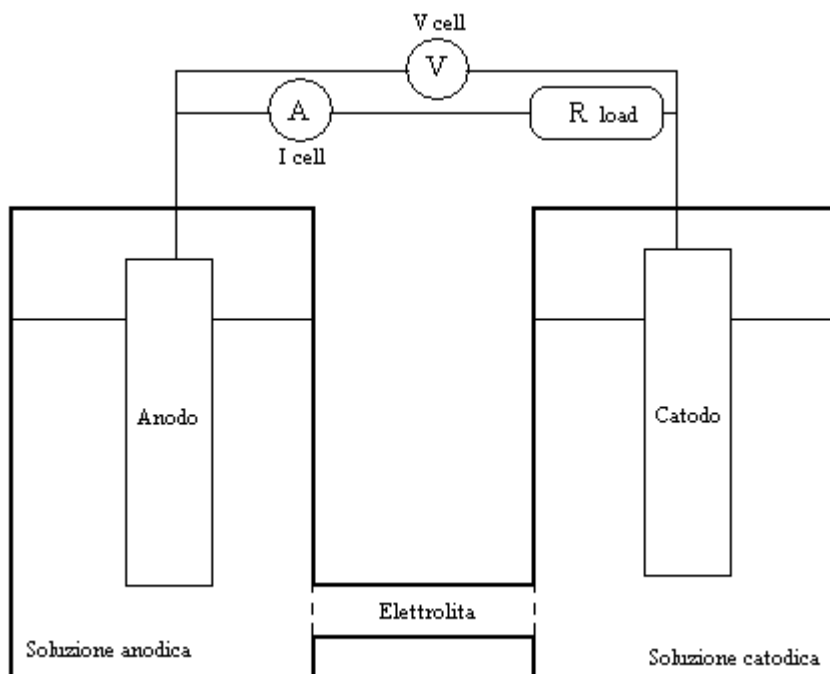


Figura 24: rappresentazione schematica della pila a combustibile progettata.

L'intero apparato, mostrato in Figura 24, è costituito da due provette graduate (30 mm x 115 mm) in polipropilene, da 50 ml, collegate attraverso il ponte salino. Il collegamento si sviluppa praticando un foro dello stesso diametro del tubo contenente l'elettrolita il più in basso possibile nelle due provette in modo tale da garantire la bagnabilità del ponte da parte delle soluzioni nelle semicelle e mantenere un adeguato battente idrostatico sul ponte stesso per evitarne la fuoriuscita o il danneggiamento.

La cella così configurata prevede anche la possibilità di gorgogliare gas in soluzione attraverso tubazioni in vetro sinterizzato collegate alle linee, si è scelto di utilizzare il vetro sinterizzato per garantire una congrua dispersione della fase gassosa evitando così la formazione di bolle di dimensioni troppo grandi che avrebbero alterato l'area dell'elettrodo in contatto con la soluzione e disturbato la misurazione generando eccessive oscillazioni e la mancanza di riproducibilità di alcune misure.

Lo strumento di misura viene connesso attraverso due coccodrilli agli elettrodi immersi nelle soluzioni anodica e catodica, i coccodrilli non devono però entrare in contatto con le soluzioni per evitare che questi ultimi possano catalizzare a loro volta delle reazioni elettrochimiche alterando così il segnale registrato.

3.1.2.1 Ponte salino

Il ponte salino viene realizzato preparando una soluzione di cloruro di potassio 20% p/v in acqua distillata (KCl, >99%, Riedel de Häen) che viene portata ad ebollizione, in seguito si aggiunge Agar (Agar-agar, Sigma-Aldich) in quantità tale da ottenere una concentrazione di Agar in soluzione pari al 10% p/v.

Si ottiene una sospensione torbida che viene versata a caldo all'interno di un tubo cavo in plastica rigida una cui estremità viene tappata con del parafilm. Una volta riempito il tubo si lascia raffreddare fino alla completa gelificazione dell'Agar.

L'elevata concentrazione di Agar comporta l'ottenimento di un ponte molto viscoso e rigido, ciò è sicuramente un vantaggio perché il sistema ottenuto è più stabile e resistente a sollecitazioni meccaniche o a differenze di pressione nelle due camere che collega, tuttavia, l'elevata viscosità dell'elettrolita si traduce in un'elevata resistenza al trasporto di carica.

Quest'ultima, infatti, per un conduttore ionico, è descritta dalla seguente relazione:

$$j = \sigma \frac{dV}{dx} \quad \text{dove:}$$

j: flusso di carica;

dV/dx: gradiente di potenziale;

σ : conduttività.

Dalla relazione scritta sopra si ricava:

$$dV = j \frac{dx}{\sigma};$$

espressione del tutto analoga alla legge di Ohm $V = I R$; si deriva perciò che il trasporto di carica in un conduttore elettrico o ionico rappresenta una resistenza che si traduce in una caduta di potenziale.

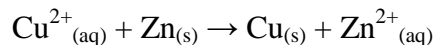
Il valore di conduttività a sua volta dipende dalla viscosità attraverso la formula:

$$\sigma_i = (|z_i| F) c_i u_i$$

dove u_i è la mobilità della specie carica e c_i la sua concentrazione, da ciò si nota come la viscosità dell'elettrolita influenzi il trasporto delle specie cariche.

3.1.3 Pila standard Zinco/Rame

La pila zinco/rame (Figura 25), capace di svolgere la seguente reazione di ossidoriduzione:



è composta da:

- un compartimento anodico formato da un elettrodo di zinco (Zinc, foil, 0,25mm thick, 99,9%, Sigma-Aldrich) di 5cm² immerso in 25ml di una soluzione di ZnSO₄ 1M.
- un compartimento catodico costituito da un elettrodo di rame (Copper, foil, 0,25mm thick, 99,9%, Sigma-Aldrich) di 5cm² immerso in 25 ml di una soluzione di CuSO₄ 1M.

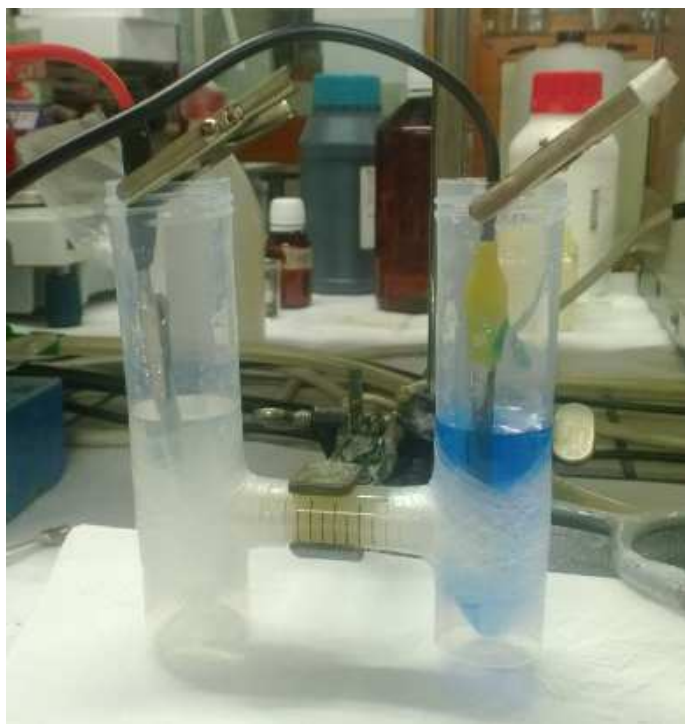


Figura 25: fotografia della pila zinco/rame durante lo svolgimento delle misure elettrochimiche. A sinistra si osserva l'elettrodo di Zn immerso nella soluzione di ZnSO₄ incolore mentre a destra l'elettrodo di rame è inserito nella soluzione blu intensa di CuSO₄

La superficie di entrambi gli elettrodi è stata ripulita con carta abrasiva a grana media per attivare la superficie metallica eliminando eventuali ossidi o interferenti presenti sull'area dell'elettrodo e subito immersa in soluzione.

Le soluzioni contenute nei due compartimenti non vengono sottoposte ad alcuna agitazione, in questo modo è possibile andare a valutare la risposta del sistema a sollecitazioni ripetute come le curve corrente/tensione registrate.

Solfato di zinco

Le soluzioni di zinco solfato 1M vengono preparate con 28,75g di $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Zinc sulfate heptahydrate, >98%, Sigma-Aldrich), portando a volume in un matraccio da 100ml con acqua distillata. La stabilità dello ione Zn^{2+} in soluzione acquosa è attestata dalla Figura 26.

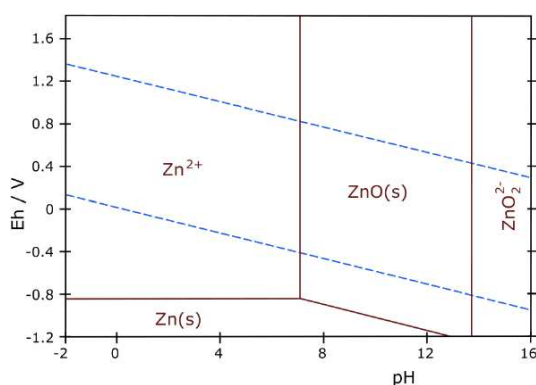


Figura 26: Diagramma di Pourbaix dello Zinco.

Solfato di rame

Le soluzioni di rame solfato 1M vengono preparate aggiungendo 2ml di H_2SO_4 0,1M a 24,97g di $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cuivrique sulfate, >99%, Carlo Erba) portando a volume con acqua distillata in un matraccio da 100ml. L'aggiunta di H_2SO_4 è necessaria per mantenere il pH acido, al di sotto di 4, per evitare la presenza in soluzione di specie diverse dallo ione Cu^{2+} , come si può dedurre dalla Figura 27.

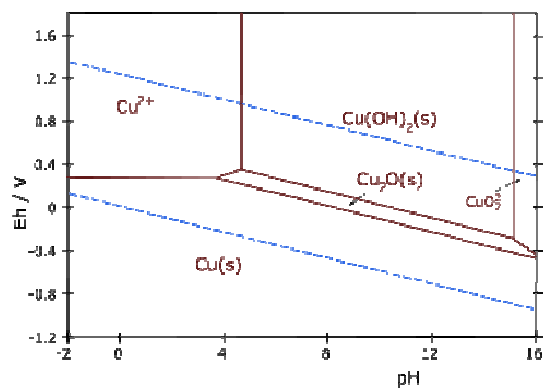


Figura 27: Diagramma di Pourbaix del Rame.

Gli esperimenti eseguiti prevedono:

1. un'indagine preliminare del potenziale di cella (V_{oc});
2. la registrazione di sei curve $I(V)$, con una scansione di potenziale tra 0V e il valore ottenuto dall'indagine precedente, arrotondato per eccesso;

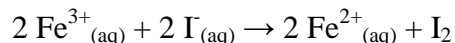
3.1.4 Analisi superficiali

Come prima analisi si è eseguito un tentativo di determinazione dell'area superficiale degli elettrodi impiegati nella costruzione della biofuel cell mediante SORPTY 1750.

Per una miglior caratterizzazione degli elettrodi di grafite si sono poi impiegati diversi metodi di analisi superficiale tra cui analisi al microscopio elettronico a scansione con sonda EDS ed al microscopio a forza atomica.

3.1.5 Pila standard in soluzione Iodio/Ferro

Si costruisce una pila capace di svolgere la seguente reazione:



Particolare attenzione verrà posta alla fase di preparazione delle soluzioni anodica e catodica in quanto le soluzioni di Fe(III) sono fotosensibili e devono essere preparate ad opportuni pH al fine di evitare la presenza di altre specie in soluzione o precipitazioni indesiderate, per la scelta del pH sono stati utilizzati i diagrammi di Pourbaix delle specie oggetto di studio (Figura 28):

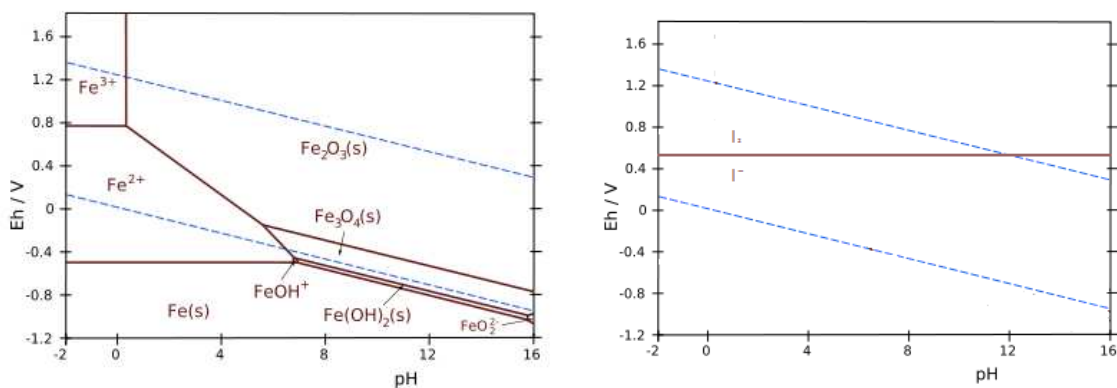


Figura 28: Diagrammi di Pourbaix di Ferro (a sinistra) e Iodio (a destra).

Per quanto riguarda la soluzione anodica vista l'elevata reattività delle soluzioni di KI nei confronti di O₂ e CO₂ si è resa necessaria la preparazione di soluzioni fresche prima di ogni prova.

La pila iodio / ferro è concepita come un simulacro di una cella a biocombustibile, a differenza di quest'ultima però non necessita di alcun catalizzatore e utilizza solamente specie in soluzione, si indaga perciò il comportamento della pila nel più ampio spettro di condizioni possibili:

1. si valuta la risposta della pila per uguali variazioni di concentrazione di I⁻ e Fe(III);
2. si valuta la risposta del sistema a variazioni di concentrazione di solo una delle specie tra I⁻ e Fe(III) mentre l'altra viene mantenuta a concentrazione costante ed unitaria.

In particolare si utilizzeranno concentrazioni in soluzione delle specie I⁻ e Fe(III) pari a: 1M, 0,5M, 0,1M, 0,05M, 0,01M, 5mM e 0,5mM.

Tutti gli esperimenti eseguiti prevedono:

- a. un'indagine preliminare del potenziale di cella (V_{oc});
- b. la registrazione di sei curve $I(V)$, con una scansione di potenziale tra 0V e il valore ottenuto dall'indagine precedente, arrotondato per eccesso;
- c. un'ulteriore misurazione del potenziale (V_{oc}) dopo le sollecitazioni delle sei curve corrente/tensione;
- d. lo sviluppo di una cronoamperometria della durata di 900 secondi acquisendo un punto ogni 500 millisecondi, impostando il valore di potenziale applicato dallo strumento sul potenziale di massima potenza ottenuto dall'ultima curva $I(V)$.

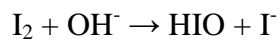
Per la realizzazione della cella si utilizzano due elettrodi di grafite (Cixi-Weilite, Gasket Material - Flexible Graphite Sheet & Rolls), di circa $3,3\text{cm}^2$, immersi rispettivamente in 25 ml di soluzione di KI e Fe(III).

La semicella catodica, contenente la soluzione di Fe(III) viene tappata e avvolta in un foglio di alluminio con lo scopo di proteggerla da fonti dirette di luce. La semicella anodica, invece, viene solamente tappata con un tappo a vite forato al centro per permettere il passaggio del collegamento elettrico.

Come nella pila sviluppata precedentemente, per mantenere l'elettroneutralità tra le due semicelle, i due comparti vengono collegati da un ponte salino.

Ioduro di potassio

La soluzione madre di ioduro di potassio 1M viene preparata inserendo 16,60g di KI (Potassium iodide, >99%, Riedel-De Haën) in un matraccio da 100ml portando a volume con acqua distillata. Durante la preparazione delle soluzioni è fondamentale accertarsi che il pH della soluzione sia leggermente inferiore a 7, in caso contrario viene aggiustato aggiungendo HCl 0,01M. L'aggiunta di acido è necessaria per impedire che la concentrazione di ioni OH^- in soluzione sia troppo elevata causando la reazione di dismutazione dello iodio prodotto dalla reazione di ossidazione:



Ferro Cloruro

La soluzione madre di ferro cloruro 1M viene preparata solubilizzando 27,06g di $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Ferro cloruro ico hexahidrato, >99%, Carlo Erba) in un matraccio da 100ml portato a volume con HCl 0,1M. Il matraccio dev'essere conservato al riparo da fonti dirette di luce.

3.1.6 Saggio spettrofotometrico della cinetica di reazione

È possibile seguire la cinetica della reazione di trasferimento elettronico tra NADH e mediatore determinando per via spettrofotometrica la velocità di decolorazione di una soluzione di blu di metilene ossidato con e senza Diaforasi in presenza di NADH.

Il blu di metilene ossidato possiede infatti un massimo di assorbimento nella zona del visibile, a 664 nm, mentre il blu di metilene ridotto è incolore. Il procedere della reazione di scambio elettronico tra NADH e blu di metilene ossidato comporta la scomparsa del picco caratteristico a 664 nm e viene perciò seguito a quella lunghezza d'onda eseguendo una Time Drive della durata di 120 minuti con 5 misurazioni al minuto tramite uno spettrofotometro Uvikon 923 (Bio-teck Instrument srl, Milano).

Le soluzioni di reazione impiegate sono composte da NADH 5mM e blu di metilene 0,0250mM in tampone fosfato 0,1M a pH 7,8; in una prova si utilizza anche Diaforasi libera in soluzione, 1 unità su ml. Prima di qualunque analisi le soluzioni vengono degasate per 5' a 20°, impostando la modalità degas in un bagno ad ultrasuoni Elmasonic S 30 H.

Per le letture spettrofotometriche è stato utilizzato come bianco una soluzione con la medesima composizione della matrice ma priva di blu di metilene.

La determinazione degli spettri di assorbimento viene effettuata in cuvette di quarzo (Hellma) con cammino ottico di 1cm, che vengono tappate per limitare l'ossidazione del blu di metilene ridotto da parte dell'ossigeno nell'aria.

3.1.6.1 Tampone Fosfato

Tutte le prove che comportassero l'utilizzo di NADH, blu di metilene o Diaforasi sono state effettuate in soluzioni tamponate a pH 7,8 di tampone fosfato 0,1M. Quest'ultimo viene ottenuto utilizzando due soluzioni:

- A. Soluzione 0,2M di Sodio fosfato monobasico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, >99%, Carlo Erba); la soluzione viene preparata disciogliendo 27,60 g di solido in 1l di acqua distillata.
- B. Soluzione 0,2M di Sodio fosfato dibasico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, >99%, Sigma-Aldrich); la soluzione viene preparata disciogliendo 28,39 g di solido in 1l di acqua distillata.

Per ottenere il pH desiderato si aggiungono 8,5 ml della soluzione A a 91,5 ml della soluzione B e si porta il volume totale a 200ml con acqua distillata.

Per la verifica del pH si utilizza un pHmetro Crison micropH2001 con elettrodo a vetro Hamilton.

3.1.6.2 Blu di metilene

Le soluzioni di mediatore vengono preparate utilizzando Metilenu (Methilenblau, >99%, Riedel-De Haën) in tampone fosfato 0,1M a pH 7,8.

3.1.6.3 NADH

Le soluzioni vengono preparate utilizzando NADH (β -nicotinamide adenine dinucleotide reduced disodium salt hydrate, >94%, anhydrous basis, Sigma-Aldrich) in tampone fosfato 0,1M a pH 7,8.

3.1.6.4 Diaforasi

Le soluzioni di enzima vengono preparate utilizzando Diaforasi (Diaphorase from *Clostridium kluveri*, 27,3 U/mg, lyophilized powder, Worthington) in tampone fosfato 0,1M a pH 7,8.

3.1.7 Studi di stabilità delle specie coinvolte nella reazione di ossidoriduzione

Si sono eseguite analisi di stabilità delle specie coinvolte nella cinetica di reazione. Sono state preparate delle soluzioni concentrate di NADH (10mM), blu di metilene (10mM) e Diaforasi (100U/ml) e si è indagata la cinetica di reazione tramite Time Drive con lo spettrofotometro, valutando per le soluzioni stoccate per tempi differenti la velocità di decolorazione. Il procedere della reazione di scambio elettronico tra NADH e blu di metilene ossidato comporta la scomparsa del picco caratteristico a 664 nm.

Le analisi sono state eseguite in cuvette di quarzo Hellma con capacità di 1,1ml, le soluzioni non sono state degasate prima della registrazione dello spettro per non alterare in alcun modo le proprietà delle specie presenti.

Si eseguono delle Time Drive alla lunghezza d'onda di 664nm della durata di 120 minuti acquisendo 5 valori di assorbanza al minuto; si effettuano due esperimenti al giorno, il primo prevede la presenza di Diaforasi e le seguenti concentrazioni delle specie all'interno della cuvetta:

- NADH: 5mM;
- Blu di metilene: 0,025mM;
- Diaforasi: 1U/ml.

Nel secondo invece si studia la cinetica di reazione in assenza di enzima, e le concentrazioni in soluzione sono:

- NADH: 5mM;
- Blu di metilene: 0,025mM.

Per le letture spettrofotometriche è stato utilizzato come bianco una soluzione di tampone fosfato 0,1M a pH 7,8, anch'esso viene stoccato assieme alle soluzioni oggetto di studio.

Si sono preparate le soluzioni madre e si sono registrati gli spettri immediatamente, dopo 24 e dopo 48 ore; le soluzioni, quando non utilizzate, sono state lasciate in frigorifero alla temperatura di 7 °C, in vial avvolti da un foglio di alluminio per proteggerle da qualsiasi fonte diretta di luce.

3.1.8 Miniaturizzazione della pila a biocombustibile

Si è deciso di ottimizzare la geometria di cella per lavorare con quantità più elevate di riducente.

Per evitare di consumare quantità elevate di reagenti costosi e poco disponibili come il NADH o la Diaforasi si è progettata una nuova configurazione di cella riducendo i volumi di un fattore dieci per poter utilizzare soluzioni dieci volte più concentrate.

Come per le altre semicelle si impiegano due comparti, catodico ed anodico, collegati da un tubo cavo di plastica di 1cm di diametro contenente il ponte salino; i due comparti sono due provette di plastica con capacità di 5ml. La pila deve prevedere la possibilità di alimentare nel comparto anodico un flusso di azoto: si pratica un foro sul fondo della provetta contenente la soluzione anodica, all'interno del quale si inserisce un rubinetto con setto in vetro sinterizzato per permettere il gorgogliamento di N₂. Quando si svilupperà la pila NADH/O₂ la stessa soluzione sarà adottata anche nel compartimento catodico in cui però verrà alimentato azoto, aria o ossigeno.

3.1.8.1 Pila a biocombustibile alimentata a NADH/Ferro

Si costruisce una pila alimentata a NADH impiegando nel comparto catodico FeIII, specie già ampiamente caratterizzata negli studi precedenti.

La cella miniaturizzata, visibile in Figura 29, è costituita da:

- comparto anodico, formato da un foglio di grafite (Cixi-Weilite, Gasket Material - Flexible Graphite Sheet & Rolls) di circa 4,5cm² come elettrodo immerso in 2,5ml di una soluzione a pH 7,8 di tampone fosfato 0,1M contenente NADH 5mM e blu di metilene 5mM.

Le aggiunte di Diaforasi vengono fatte a partire da una soluzione 100U/ml fino a raggiungere una concentrazione di enzima in soluzione pari a 10U/ml nei 2,5ml.

- comparto catodico costituito da un foglio di grafite (Cixi-Weilite, Gasket Material - Flexible Graphite Sheet & Rolls) di circa 4,5cm² come elettrodo immerso in 2,5ml di una soluzione di Fe(III) a concentrazione variabile.



Figura 29: fotografia della pila a combustibile alimentata a NADH e FeIII miniaturizzata.

A causa dell'elevata reattività delle specie in soluzione nei confronti di fonti dirette di luce si avvolge con un foglio di alluminio sia il comparto anodico che catodico.

3.1.8.2 Pila a biocombustibile alimentata a NADH/Aria

Per la realizzazione della cella si utilizzano due elettrodi di grafite (Cixi-Weilite, Gasket Material - Flexible Graphite Sheet & Rolls) immersi rispettivamente in 2,5 ml di soluzione. La soluzione anodica è una soluzione a pH 7,8 di tampone fosfato 0,1M contenente NADH 5mM e blu di metilene 5mM.

Le aggiunte di Diaforasi vengono fatte sempre a partire da una soluzione madre 100U/ml fino a raggiungere una concentrazione di enzima in soluzione pari a 10U/ml nei 2,5ml.

La soluzione catodica è una soluzione a pH 7,8 di tampone fosfato 0,1M in cui viene fatto gorgogliare azoto, aria o ossigeno attraverso un tubo di vetro con un'estremità in vetro sinterizzato che viene posta a contatto con la soluzione.

3.1.9 Pila a biocombustibile alimentata a NADH/Ossigeno

Si è costruita una pila a biocombustibile capace di svolgere nella semicella anodica la reazione di ossidazione del NADH a NAD^+ .

Da precedenti lavori di tesi^{36, 40} in questo ambito si sono scelte determinate concentrazioni delle specie in soluzione. La scelta della concentrazione di blu di metilene è legata anche alla possibilità di osservare visivamente il procedere della reazione di riduzione del blu di metilene ossidato ad opera di NADH e Diaforasi.

Nella prima fase di questo lavoro sono state testate pile alimentate a biocombustibile interfacciate alla configurazione di cella già ampiamente impiegata per le pile zinco/rame e iodio/ferro.

La cella alimentata a NADH prevede l'assemblaggio di:

- un compartimento anodico composto da elettrodi di:

Alluminio (Aluminium foil, thickness 1,00mm , 99,9%, Sigma-Aldrich);

Platino;

Grafite (Cixi-Weilite, Gasket Material - Flexible Graphite Sheet & Rolls).

immersi in 25ml di una soluzione di NADH 0,4mM e blu di metilene 0,08mM, gli esperimenti sviluppati in presenza di Diaforasi si sono eseguiti con una concentrazione di enzima pari a 0,4U/ml.

Le soluzioni vengono preparate in tampone fosfato 0,1M a pH 7,8.

La configurazione della cella viene opportunamente modificata per permettere l'alimentazione nella semicella anodica di N_2 con l'obiettivo di eliminare o abbassare il più possibile la quantità di ossigeno in soluzione ed obbligare gli elettroni a fluire nel circuito esterno impedendo lo svolgimento della reazione di ossidoriduzione solo nel comparto anodico.

Nel comparto anodico si gorgoglia N_2 con un flusso di 25 l/h per cinque minuti prima di eseguire qualunque tipo di misurazione, il flusso viene mantenuto per tutta la durata dell'esperimento.

- un compartimento catodico costituito da elettrodi dello stesso tipo del comparto anodico, immersi in 25 ml di una soluzione di tampone fosfato 0,1M a pH 7,8.

In questa semicella si alimenta ossigeno che viene fatto gorgogliare in soluzione con un flusso di 34 l/h per tutta la durata dell'esperimento.

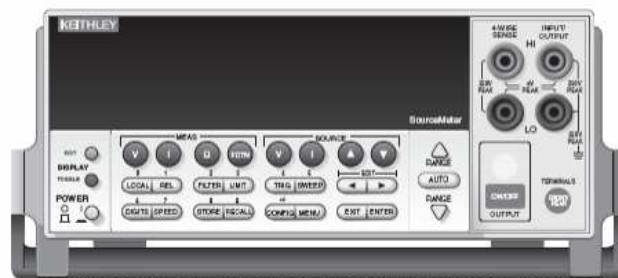
3.2 Strumenti

3.2.1 Misurazioni elettrochimiche

Le analisi elettrochimiche vengono condotte utilizzando un SourceMeter Keithley serie 2400 (Figura 30), interfacciato ad un computer.

Questo strumento integra un power source a corrente continua con un multimetro e può fornire una potenza di 20W con tensioni da $\pm 5\mu\text{V}$ (sourcing) e da $\pm 1\mu\text{V}$ (measuring) fino a $\pm 200\text{V}$ e correnti da $\pm 10\text{pA}$ a $\pm 1\text{A}$. Permette misure di resistenza a 2, 4 e 6 terminali fino a 1700 letture al secondo via interfaccia GPIB.

SourceMeter front panel



SourceMeter rear panel

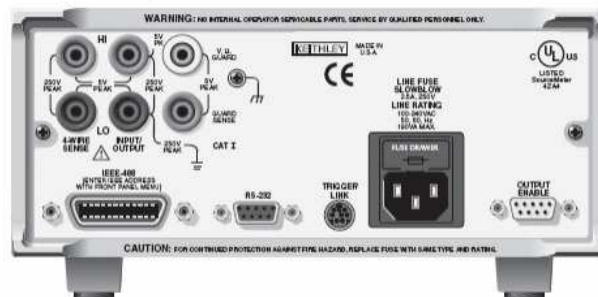


Figura 30: pannello frontale e posteriore del Multimetro Keithley 2400.

Funziona da generatore di tensione o di corrente e prevede la possibilità di connessione a due o quattro fili (Figura 31), in questo lavoro di tesi si è utilizzato esclusivamente il collegamento a quattro fili.

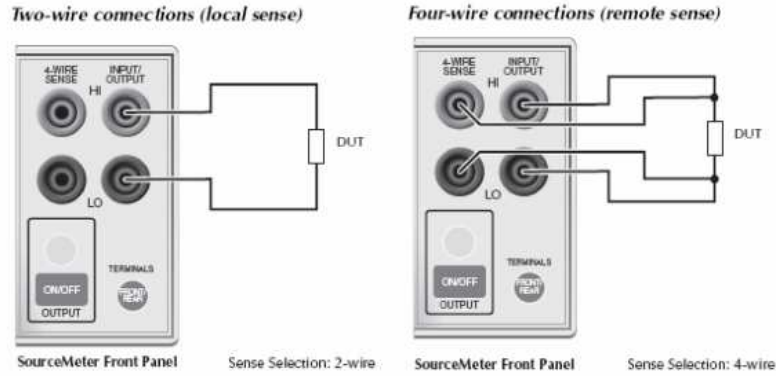


Figura 31: collegamento a due e quattro fili del SourceMeter.

Lo strumento è stato utilizzato per eseguire curve I/V e cronoamperometrie.

3.2.1.1 Curve I(V)

Per la totalità delle misurazioni sviluppate durante il periodo di tesi si impiega la modalità Sweep Voltage del SourceMeter: si impostano i valori di voltaggio iniziali e finali e si registra la corrente generata dalla pila per ogni valore di potenziale. Impostando il numero di punti da registrare e lo sweep delay si settano rispettivamente l'ampiezza degli step in termini di voltaggio e il tempo che intercorre tra l'acquisizione di un punto ed il successivo, come schematizzato in Figura 32.

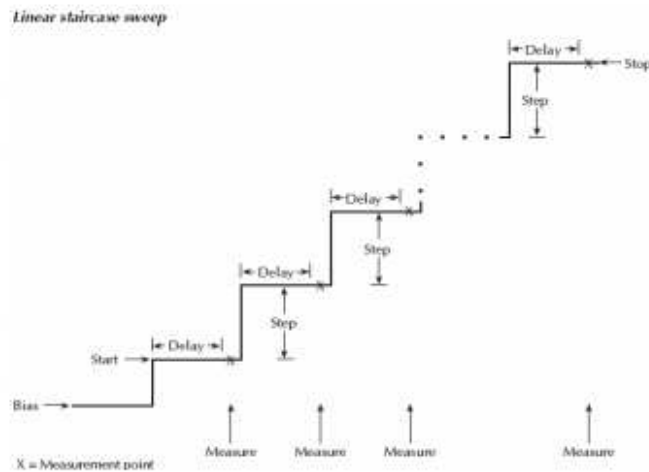


Figura 32: rappresentazione schematica del meccanismo di misurazione elettrochimico.

Il bias level è il livello iniziale immediatamente precedente all'avvio dell'analisi. Il segnale di uscita (corrente) cambierà in funzione della rampa di voltaggio impostata ed ogni singolo gradino durerà il tempo necessario all'esecuzione di una misura fino al valore finale settato nello strumento.

3.2.1.2 Cronoamperometrie

Questo tipo di esperimento viene condotto registrando la corrente erogata dalla cella in funzione del tempo per un voltaggio noto. Mediante questo tipo di analisi è possibile rilevare il segnale elettrochimico conseguente al funzionamento del sistema catalitico e relazionarlo così alla concentrazione di analita sulla superficie dell'elettrodo.

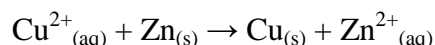
Questo tipo di esperimento viene sviluppato impostando la modalità Sweep Voltage mantenendo costanti i valori di voltaggio iniziali e finali e settando il numero di punti da acquisire ed i punti per unità di tempo in modo da ottenere un esperimento che si sviluppasse nell'arco di tempo desiderato.

4 RISULTATI E DISCUSSIONI

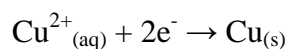
4.1 Pila standard Zinco/Rame e taratura del sistema di caratterizzazione

È stato studiato il comportamento di una pila “standard” zinco/rame come sistema di riferimento per tarare la strumentazione impiegata durante il periodo di tesi e valutare la messa a punto dei parametri operativi.

La reazione di ossidoriduzione completa può essere scritta come:



Che rappresenta la somma delle due semireazioni di riduzione e di ossidazione:



Per effetto di questa reazione lo zinco metallico di cui è costituito l'elettrodo nella semicella anodica, si ossida e viene liberato in soluzione come ioni Zn^{2+} mentre allo stesso tempo gli ioni Cu^{2+} , in soluzione nel compartimento catodico, si riducono e si depositano sulla superficie dell'elettrodo sotto forma di rame metallico.

L'elettroneutralità dei due comparti viene mantenuta grazie agli ioni K^{+} e Cl^{-} contenuti nel ponte salino.

La pila così costituita può essere approssimata ad un generatore reale di tensione e schematizzata nella seguente maniera:



Modello teorico

I generatori elettrici sono dispositivi destinati a produrre energia elettrica a partire da una diversa forma di energia.⁴¹

Per caratteristica esterna di un generatore si intende la funzione $V = f(I)$ ovvero la tensione d'uscita in funzione della corrente erogata e viceversa.

Le curve $V = f(I)$ rappresentano la metodologia di caratterizzazione più comune per le pile a combustibile e identificano la corrente sviluppata da un dispositivo elettronico per tensione assegnata attraverso i relativi morsetti. Solitamente la corrente viene normalizzata rispetto all'area superficiale dell'elettrodo e si riporta la densità di corrente (in Ampère su centimetri quadrati), per permettere un confronto tra celle con elettrodi di dimensioni differenti.

Se al generatore non è applicato nessun carico e non vi è nessun collegamento di cortocircuito tra i contatti metallici, si produrrà ai suoi estremi una differenza di potenziale massima di circuito aperto, espressa in Volt, denominata V_{OC} , e in questa condizione la corrente sarà nulla. La V_{OC} è un parametro macroscopico caratteristico della cella, correlato alla termodinamica attraverso i potenziali standard di riduzione e di ossidazione delle specie coinvolte nello scambio di elettroni. Tuttavia, il valore di V_{OC} , può essere molto differente dal valore di forza elettromotrice della pila calcolato per via termodinamica perché le condizioni di lavoro delle celle a combustibile possono essere molto diverse dalle condizioni standard.

In stato di cortocircuito, invece, tra i due poli della cella si registra una corrente massima denominata I_{SC} (corrente di cortocircuito), con una tensione nulla agli estremi, che dipende essenzialmente dalla concentrazione delle specie chimiche sulla superficie dell'elettrodo ed è influenzata in maggior misura dalla cinetica della reazione di ossidoriduzione. Oltre a questo parametro si può definire la densità di corrente J_{SC} (espressa in A/cm^2), ovvero la corrente di cortocircuito generata rispetto alla superficie degli elettrodi.

La curva $V = f(I)$ mostra di tutti i punti di lavoro possibili della cella, la potenza generata è facilmente calcolabile misurando la tensione e la corrente istantanee di ogni punto di lavoro:

$$P = I V$$

Dalla curva $V = f(I)$ è possibile ottenere tramite la relazione sopra riportata, la *curva di potenza* in cui si riporta la potenza sviluppata da un sistema in funzione della corrente o del voltaggio.

I generatori ideali, schematizzati in Figura 33, (cioè privi di dissipazioni interne di potenza o di corrente), presentano un caratteristico andamento della curva $I = f(V)$, il classico schema

di circuito rappresenta il generatore in serie ad una resistenza esterna R_u variabile tra ∞ (funzionamento a vuoto del generatore) e 0 (funzionamento in cortocircuito del generatore):

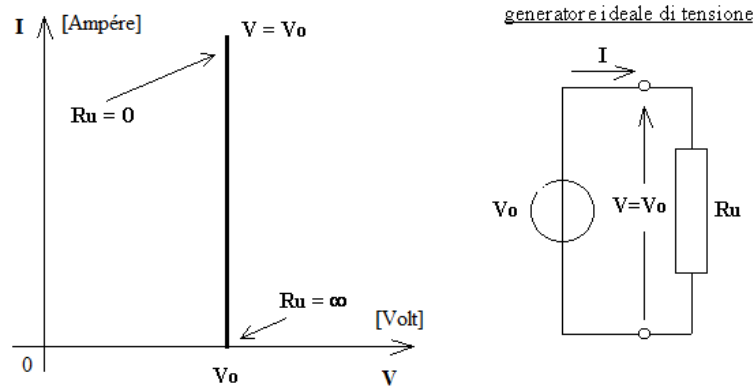


Figura 33: rappresentazione schematica di un generatore ideale di tensione e grafico $I(V)$ corrispondente.

Per il generatore ideale di tensione la caratteristica esterna sarà una retta orizzontale di equazione $V = \text{f.e.m.}$ in quanto la sua tensione d'uscita è rigorosamente uguale alla sua forza elettromotrice, qualsiasi sia la resistenza dell'utilizzatore alimentato e quindi qualsiasi sia la corrente erogata.

I dispositivi reali (Figura 34) si differenziano da quelli ideali a causa di fenomeni dissipativi interni: la pila zinco/rame, come qualunque altra pila elettrochimica, rappresenta un generatore reale di tensione.

Il circuito equivalente di un generatore reale di tensione prevede una resistenza interna R_o , causa principale delle perdite interne di potenza e della diminuzione della tensione d'uscita all'aumentare della corrente erogata.

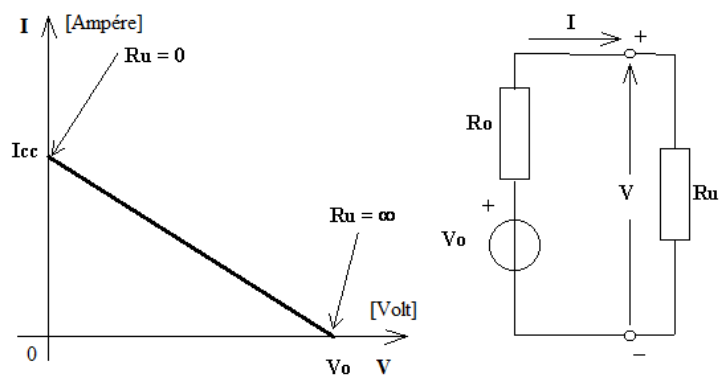


Figura 34: rappresentazione schematica di un generatore reale di tensione e grafico $I(V)$ corrispondente.

L'equazione della caratteristica esterna $V = f(I)$ si determina applicando la legge di Ohm al tronco di circuito comprendente il generatore:

$$V = V_0 - R_0 \times I$$

si tratta dell'equazione di una retta sul piano cartesiano (V,I) avente pendenza negativa, la pendenza è tanto più accentuata quanto più è grande la resistenza interna del generatore. L'intersezione con l'asse delle ascisse rappresenta il punto di funzionamento a vuoto, essendo nulla la corrente erogata, quindi con resistenza dell'utilizzatore di valore infinito, e la tensione d'uscita è in tal caso pari alla f.e.m. del generatore (a meno di perdite di tensione). L'intersezione con le ordinate rappresenta il punto di funzionamento in cortocircuito essendo nulla la tensione d'uscita, quindi con resistenza dell'utilizzatore di valore nullo.

Per una generica condizione di funzionamento del generatore si ha una tensione d'uscita che risulta inferiore alla f.e.m. del generatore stesso di una quantità pari a $(R_0 \times I)$ che rappresenta la caduta di tensione del generatore dovuta alla sua resistenza interna.

Perciò, per ciascun carico intermedio inserito nel circuito di resistenza R , il generatore sviluppa una tensione compresa tra zero e V_{OC} ed una corrente I , tale per cui:

$$V = I \times R$$

La pila, non essendo un generatore ideale di tensione, fornisce un potenziale dipendente dal carico, ovvero dalla resistenza esterna R_u , per cui l'andamento della curva $I(V)$ è determinato dalle caratteristiche di corrente e potenziale della pila. Siccome la corrente è funzione: della struttura della pila, del mezzo, delle concentrazioni dei componenti in soluzione e dei regimi diffusivi, allora la curva $I(V)$ può darci indicazioni circa i fattori limitanti della cella.

Quest'ultima è caratterizzata da una forza elettromotrice f.e.m. e da una resistenza interna R_o .

Per ciascun punto di lavoro della caratteristica si determina la potenza P_G generata dal dispositivo, come prodotto ($V \times I$). Riportando in grafico i valori di P_G corrispondenti a ciascun punto di lavoro, si traccia la parabola di Figura 35.

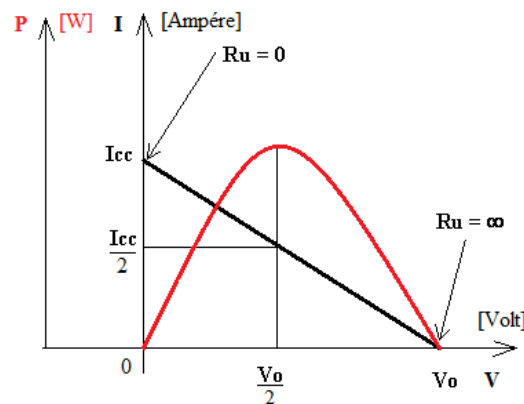


Figura 35: caratteristica del dispositivo e curva di potenza.

Il vertice della parabola fornisce il valore della potenza massima, che si trova in corrispondenza del punto di lavoro di coordinate:

$$V = V_o / 2 \quad \text{e} \quad I = I_{SC} / 2$$

La massima potenza erogabile dal generatore risulta perciò:

$$P_G = (V_o / 2) \times (I_{SC} / 2) = (V_o \times I_{SC}) / 4$$

Tuttavia, se la corrente generata dalla pila fluisce attraverso un circuito, e questa incontra una resistenza R , sia interna che esterna, parte dell'energia elettrica viene dispersa sotto forma di calore per effetto Joule. Il lavoro totale generato dalla pila può essere descritto come:

$$P_G = P_{\text{heat}} + P_{\text{electric}} = P_{\text{heat}} + V \times I$$

Dalla prima legge di Ohm: $V = I \times R$, di conseguenza la potenza elettrica generata si può scrivere come:

$$P_{\text{electric}} = V I = I^2 R = V^2 / R$$

La potenza P_U dissipata dal carico R raggiunge il valore massimo in determinate condizioni operative della cella elettrochimica (in termini di corrente e potenziale), che rappresentano le coordinate del punto di massima potenza. Questo avviene al voltaggio V_M , prossimo al potenziale di circuito aperto V_{OC} , con una quantità di corrente corrispondente a I_M .

Si definisce rendimento di un generatore il rapporto tra la potenza P_U , dissipata dal carico R_u , e la potenza P_G generata dalla pila.

$$\eta = P_U / P_G = (V_M I) / (\text{f.e.m.} \cdot I) = V_M / \text{f.e.m.} = R_u / (R_i + R_u)$$

Poiché V_M è sempre minore di f.e.m., allora η è sempre inferiore ad 1.

La potenza P_G generata dalla pila è data dalla somma della potenza P_U consumata dal carico e di quella P_D dissipata nella resistenza interna del generatore ($P_G = P_U + P_D$); si può così facilmente dedurre che la potenza dissipata è:

$$P_D = I^2 R_o$$

E il rendimento del generatore si può scrivere come:

$$\eta = P_U / P_G = (P_G - P_D) / P_G = 1 - (P_D / P_G) = 1 - (R_o (I / f.e.m.))$$

che evidenzia il fatto che il rendimento è tanto minore quanto più è grande la corrente I sviluppata dal generatore.

Il fattore di riempimento (FF) è un parametro solitamente impiegato per valutare l'efficienza dei dispositivi fotovoltaici ed è definito come il rapporto tra la potenza massima ottenibile dal dispositivo e il prodotto di I_{SC} per V_{OC} . Identifica le perdite resistive della cella e rappresenta un parametro fondamentale nella valutazione delle prestazioni delle celle solari. Dispositivi con elevato FF presentano bassi valori di resistenza interna, quindi solo una piccola porzione della corrente generata viene dissipata in perdite interne.

Il parametro, per il sistema oggetto di studio, è definito nel seguente modo:

$$FF = (I_M V_M) / (I_{SC} V_{OC}/4)$$

Il parametro FF descrive quindi la quadratura della curva I(V) e rappresenta l'efficienza del generatore elettrico oggetto di studio rispetto al generatore reale (Figura 36).

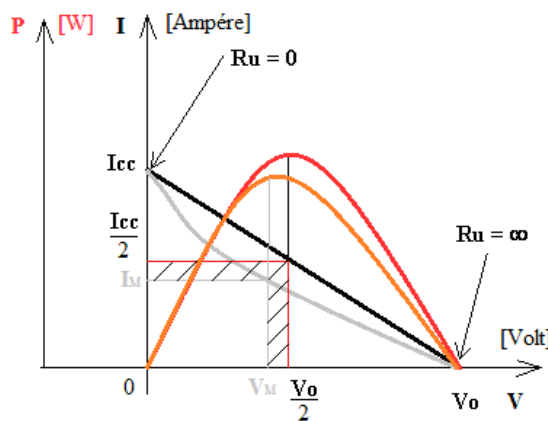


Figura 36: schematizzazione dei parametri caratteristici impiegati per il calcolo dell'efficienza.

La massima densità di potenza ($I_M \times V_M$) è data dal rettangolo grigio interno; il rettangolo rosso esterno ha un'area pari a $(I_{SC} \times V_{OC}/4)$ e se FF fosse pari a 1, allora la curva I(V) seguirebbe il rettangolo esterno.

Modello reale

La pila zinco/rame viene sottoposta alla registrazione di sei curve I(V) (Figura 37), la scansione viene eseguita da 0 V a +1,3 V:

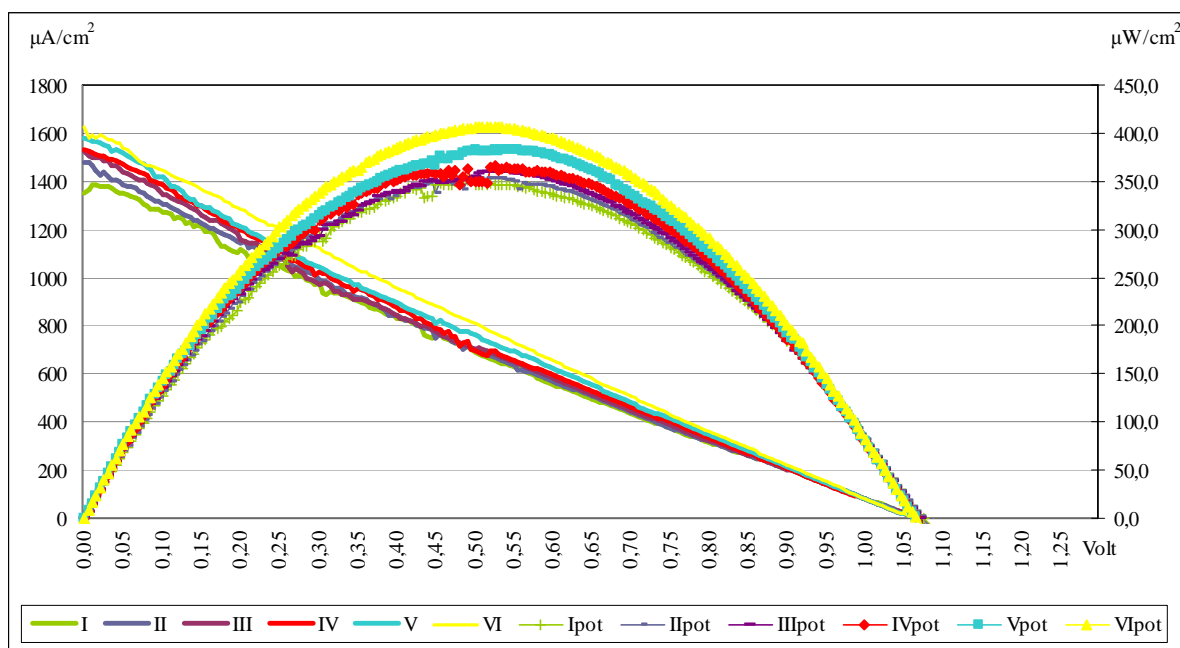


Figura 37: valori di corrente e potenza registrati in funzione del potenziale per la pila zinco/rame.

Dalle curve (Figura 37), si estrapolano i risultati riassunti in Tabella 1:

Tabella 1: parametri sperimentali della pila zinco/rame.

| | Isc (μA) | Jsc ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) | Voc (v) | Pmax (μW) | Pmax ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) | FF |
|--------------|------------------------------|--|----------------|-------------------------------|---|-------------|
| I | $6,76 \cdot 10^3$ | $1,35 \cdot 10^3$ | 1,07 | $1,75 \cdot 10^3$ | $3,51 \cdot 10^2$ | 0,97 |
| II | $7,40 \cdot 10^3$ | $1,48 \cdot 10^3$ | 1,07 | $1,77 \cdot 10^3$ | $3,53 \cdot 10^2$ | 0,89 |
| III | $7,62 \cdot 10^3$ | $1,53 \cdot 10^3$ | 1,07 | $1,80 \cdot 10^3$ | $3,59 \cdot 10^2$ | 0,88 |
| IV | $7,66 \cdot 10^3$ | $1,53 \cdot 10^3$ | 1,07 | $1,82 \cdot 10^3$ | $3,64 \cdot 10^2$ | 0,89 |
| V | $7,89 \cdot 10^3$ | $1,58 \cdot 10^3$ | 1,07 | $1,91 \cdot 10^3$ | $3,83 \cdot 10^2$ | 0,91 |
| VI | $8,12 \cdot 10^3$ | $1,62 \cdot 10^3$ | 1,07 | $2,03 \cdot 10^3$ | $4,07 \cdot 10^2$ | 0,94 |
| Media | $(7,58 \pm 0,47) \cdot 10^3$ | $(1,52 \pm 0,09) \cdot 10^3$ | 1,07 | $(1,85 \pm 0,11) \cdot 10^3$ | $(3,69 \pm 0,21) \cdot 10^2$ | 0,91 |

La forza elettromotrice di una pila è data dalla differenza algebrica tra i potenziali standard di riduzione della semireazione di riduzione e della semireazione di ossidazione:

$$\text{f.e.m.} = E_{\text{reaz. riduzione}} - E_{\text{reaz. ossidazione}};$$

dove $E_{\text{reaz. riduzione}}$, $E_{\text{reaz. ossidazione}}$ vengono calcolati a partire da:

$$E = E^{\circ} + [RT/(nF)] \ln [(concentrazione\ specie\ ossidata) / (concentrazione\ specie\ ridotta)].$$

Nel caso della pila zinco/rame si può scrivere, per il compartimento anodico e catodico:

$$E_{\text{anodo}} = E^{\circ}_{(\text{Zn}^{2+}/\text{Zn})} + [RT/(nF)] \ln ([\text{Zn}^{2+}] / [\text{Zn}]);$$

$$E_{\text{catodo}} = E^{\circ}_{(\text{Cu}^{2+}/\text{Cu})} + [RT/(nF)] \ln ([\text{Cu}^{2+}] / [\text{Cu}]).$$

Eseguendo la differenza algebrica tra l'espressione di E_{catodo} e l'equazione di E_{anodo} si ricava l'equazione di Nernst della pila in esame:

$$E = (E^{\circ}_{(\text{Cu}^{2+}/\text{Cu})} - E^{\circ}_{(\text{Zn}^{2+}/\text{Zn})}) + \{[RT/(nF)] \ln [([\text{Zn}] [\text{Cu}^{2+}]) / ([\text{Zn}^{2+}] [\text{Cu}])]\}$$

Inserire in questa equazione le concentrazioni al posto delle attività rappresenta un'approssimazione che si dimostra tanto più vera quanto più le specie sono in bassa concentrazione; in ogni caso si può approssimare l'attività delle specie allo stato solido

unitaria e viste le concentrazioni con cui si lavora l'argomento del logaritmo naturale assume valore 1 e la differenza di potenziale ai capi della pila diventa uguale alla differenza tra i potenziali standard di riduzione.

I potenziali standard di riduzione delle due semireazioni sono rispettivamente:

$$E^{\circ} = +0,340\text{V per la coppia } \text{Cu}^{2+}/\text{Cu};$$

$$E^{\circ} = -0,762\text{V per la coppia } \text{Zn}^{2+}/\text{Zn};$$

La differenza di potenziale teorica della cella completa è perciò:

$$E = E^{\circ} (\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}) - E_{\circ} (\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}) = +0,340\text{V} - (-0,762\text{V}) = +1,10 \text{ V}.$$

Il valore di V_{OC} determinato attraverso i dati sperimentali è di 1,07 V (Tabella 1), la cui differenza dal valore teorico potrebbe essere legata alla resistenza interna della pila.

Esistono tre diversi fattori che causano queste cadute di potenziale:

1. perdite di attivazione, legate alla cinetica di reazione (η_{act});
2. perdite ohmiche, causate dalla configurazione del circuito in cui circolano gli elettroni e dal trasporto di ioni nel ponte salino (η_{ohmic});
3. perdite di concentrazione legate al trasporto di massa verso la superficie dell'elettrodo (η_{conc}).

Tutti questi fattori contribuiscono ad abbassare il potenziale letto sperimentalmente rispetto a quello teorico:

$$V = E_{\text{thermo}} - \eta_{\text{act}} - \eta_{\text{ohmic}} - \eta_{\text{conc}}$$

Ognuno di questi tre fattori contribuisce alla forma caratteristica delle curve I(V) (Figura 38): η_{act} influenza il sistema nella parte finale della curva, vicino alla V_{OC} ; η_{conc} interessa la parte iniziale mentre η_{ohmic} causa le cadute più importanti nella parte centrale della curva corrente/tensione.

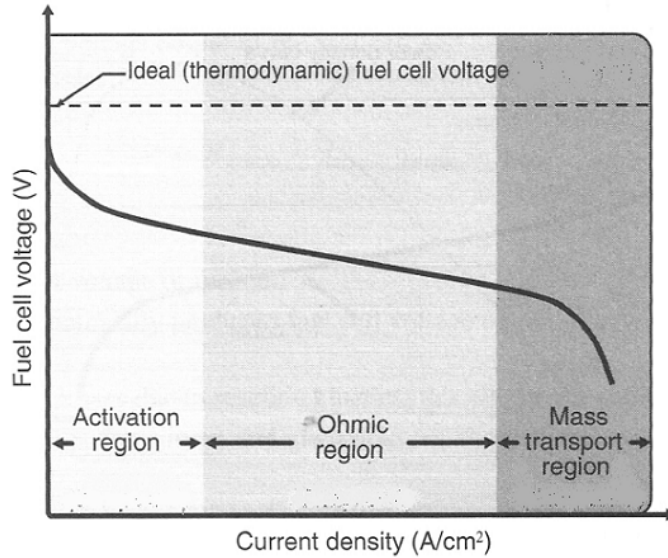


Figura 38: rappresentazione delle principali perdite di tensione associate alle diverse regioni della curva I(V).⁴²

Questo esperimento preliminare oltre ad aver dimostrato il funzionamento della pila galvanica zinco/rame ha permesso di constatare l'affidabilità delle misurazioni eseguite, la riproducibilità dei dati ottenuti e la garanzia di aver creato una geometria di cella che non alteri eccessivamente i risultati delle misurazioni elettrochimiche. Inoltre, i valori elevati del parametro FF dimostrano che la cella così costruita presenta una bassa resistenza interna.

4.2 Pila standard in soluzione

Una volta identificata la configurazione di cella più stabile, compatta e riproducibile e presa dimestichezza con le misurazioni elettrochimiche comunemente impiegate per caratterizzare le celle a combustibile, si è sviluppata una pila in cui le reazioni di ossidazione e riduzione coinvolgessero specie libere in soluzione, con elettrodi inorganici.

4.2.1 Analisi superficiali

Si caratterizzano tramite analisi superficiali gli elettrodi di grafite con cui si realizzerà la pila. La scelta dell'elettrodo è ricaduta su questo materiale perché facilmente reperibile, economico e maneggevole.

Come prima analisi si cerca di determinare l'area superficiale dell'elettrodo, in questo senso si determinano i valori del rapporto Area/massa come cm^2/g tramite lo strumento SORPTY 1750, attraverso l'isoterma di BET. Sfortunatamente i valori ottenuti non sono rappresentativi: si ottengono infatti dei valori di area superficiale inferiore al limite di rivelabilità dello strumento ($60 \text{ m}^2/\text{g}$).

Si decide a questo punto di caratterizzare i fogli di grafite per cercare di comprendere meglio come possano catalizzare le reazioni di ossidoriduzione sulla propria superficie: si scattano delle micrografie al SEM a diversi ingrandimenti, riportate in Figura 39:

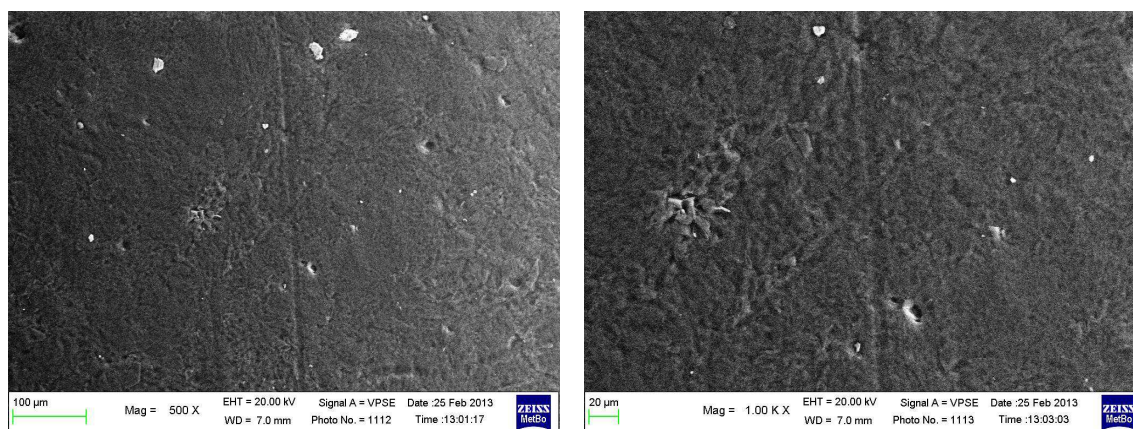


Figura 39: micrografie ottiche a diversi ingrandimenti dei fogli di grafite.

E se ne studia la composizione tramite spettroscopia EDX (Figura 40):

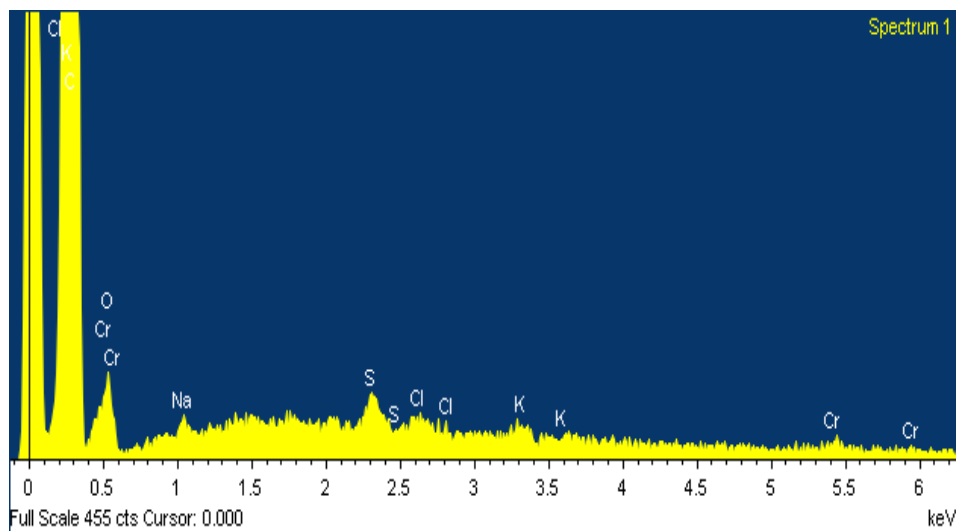


Figura 40: spettro EDX del campione analizzato.

I dati ottenuti dall'analisi spettroscopica sono riassunti in Tabella 2:

Tabella 2: percentuali in massa e atomiche per ogni elemento rilevato.

| Element | Weight% | Atomic% |
|----------------|----------------|----------------|
| C | 94.92 | 96.35 |
| O | 4.50 | 3.43 |
| Na | 0.15 | 0.08 |
| S | 0.17 | 0.06 |
| Cl | 0.07 | 0.02 |
| K | 0.09 | 0.03 |
| Cr | 0.10 | 0.02 |
| Totals | 100 | 100 |

Infine se ne descrive l'area superficiale mediante microscopio AFM (Figura 41):

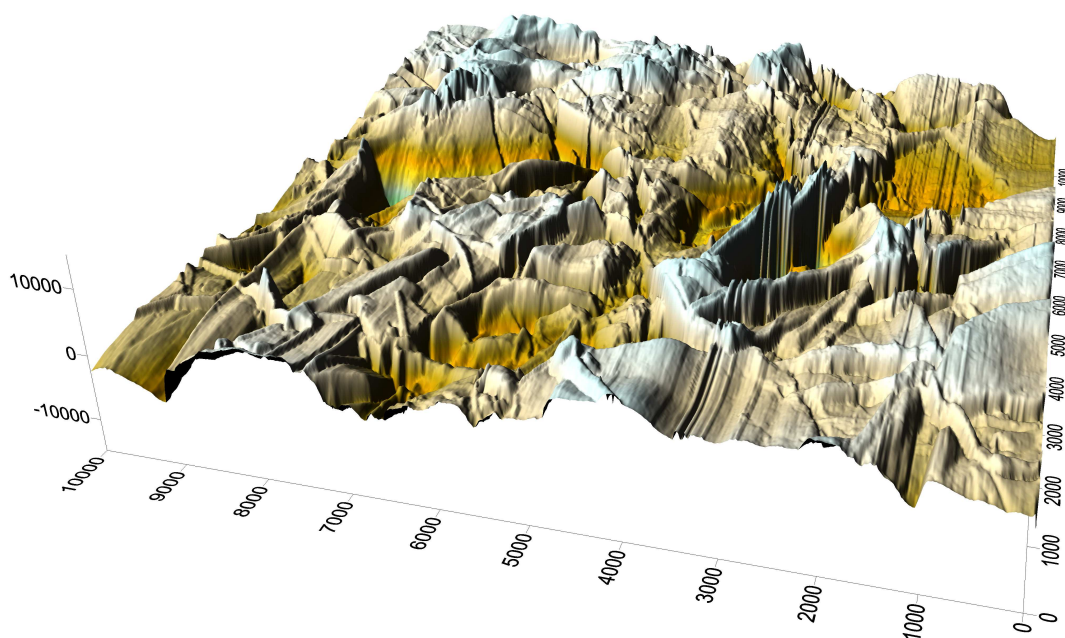
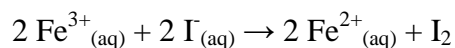


Figura 41: micrografia ottica della superficie dei fogli di grafite. Sugli assi sono indicati i μm .

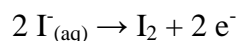
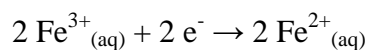
Dai risultati ottenuti si evince che i fogli di grafite sono caratterizzati da un basso numero di impurezze metalliche o ossidi che potrebbero alterare i valori di potenziale o corrente misurati e catalizzare reazioni secondarie o parassite. Dalle immagini ottenute dal microscopio a forza atomica e dal SEM si nota invece la presenza di piccoli difetti sulla superficie, si osservano infatti delle piccole scaglie di materiale il cui contributo alle reazioni di scarico di elettroni è ignoto.

4.2.2 Pila standard iodio/ferro

La scelta delle specie chimiche coinvolte nella reazione di ossidoriduzione della pila in soluzione è ricaduta su Fe(III) come ossidante ed I⁻ come riducente, la reazione di ossidoriduzione completa è quindi:



Somma delle due semireazioni:



Il sistema può essere schematizzato nella seguente maniera:



A differenza della pila zinco/rame, in questa particolare cella, l'elettrodo non partecipa direttamente alla redox fornendo lui stesso le specie chimiche coinvolte nelle reazioni di riduzione od ossidazione, ma diventa solamente il luogo dei punti in cui la specie ridotta nella semicella anodica si ossida e la specie ossidata nella semicella catodica si riduce. In particolare ci si aspetta che l'I⁻ nella semicella anodica, a seguito della differenza di potenziale tra i due poli, diffonda verso la superficie dell'elettrodo e si ossidi, generando I₂, quest'ultimo dovrà poi diffondere dalla superficie dell'elettrodo verso il bulk della soluzione lasciando un eccesso di cariche negative sull'elettrodo. Queste, attraverso il circuito esterno, giungeranno al polo positivo della pila e attraverso l'elettrodo arriveranno al Fe³⁺ che si ridurrà a Fe²⁺.

La trattazione riguardante la differenza di potenziale tra i due poli della pila zinco/rame può essere facilmente applicata anche alla pila iodio/ferro, l'espressione della differenza di potenziale misurata ai capi della pila diventa:

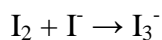
$$E = E^0_{(\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+})} - E^0_{(\text{I}_2/\text{I}^{-})} + \{[RT/(nF)] \ln [([\text{Fe}^{3+}]^2 [\text{I}^{-}]^2) / ([\text{Fe}^{2+}]^2 [\text{I}_2])]\}$$

Il potenziale standard di riduzione per la coppia $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ è $+0,771\text{V}$ ma dato che i sistemi redox sono fortemente influenzati dalla forza ionica del mezzo e la soluzione di Fe(III) viene preparata in HCl $0,1\text{M}$ il potenziale formale varia a $+0,730\text{V}$.⁴³ La coppia I_2/I^- può sviluppare un valore di potenziale pari a $+0,5355\text{V}$; una pila con tutte le specie in soluzione a concentrazione 1M dovrebbe perciò generare una f.e.m. di:

$$\text{f.e.m.} = E^\circ (\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}) - E^\circ (\text{I}_2/\text{I}^-) = +0,730\text{V} - (+0,5355\text{V}) = +0,1945\text{V}$$

L'esistenza di almeno tre diversi stati di ossidazione del Ferro non pregiudica la presenza di Fe(III) in soluzione: la disproporzione, infatti, nel caso del Ferro non è spontanea dato che $E^\circ \text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ($+0,771\text{V}$) è maggiore di $E^\circ \text{Fe}^{3+}/\text{Fe}$ ($-0,410\text{V}$), ciò significa che il Fe(III) in soluzione è stabile.

Il potenziale standard di riduzione I_2/I^- è molto simile al potenziale standard di riduzione I_2/I_3^- : $+0,5355\text{V}$ contro $+0,5360\text{V}$; la reazione di ossidoriduzione tuttavia dev'essere scritta con I_2 , infatti la precedenza di scarica è sicuramente di quest'ultimo dato che all'anodo si ossida prima la specie che presenta il potenziale standard di riduzione più basso, ciononostante è possibile che si svolgano entrambe le reazioni. In ogni caso, nota l'elevata instabilità della specie I_2 e la sua bassa solubilità in soluzioni acquose, questa specie, non appena viene generata, reagisce con I^- :



questa reazione consecutiva ha il grave svantaggio di portare via del reagente dall'ambiente di reazione.

Tuttavia, vista la possibilità che si sviluppi parallelamente alla reazione di formazione dell' I_2 anche la reazione di formazione dell' I_3^- , specie stabile in soluzione, si decide inizialmente di trascurare il contributo della reazione sopra.

Tenendo presente le considerazioni sopra riportate si procede studiando la risposta della pila iodio/ferro nelle seguenti condizioni:

- variazioni proporzionali di concentrazione delle specie coinvolte nella reazione;
- variazioni non proporzionali delle specie che partecipano alla redox.

1. [KI] variabile, [FeCl₃] variabile

Nella prima fase di questo lavoro si preparano le soluzioni concentrate di KI ed FeCl₃ e si indaga il comportamento della cella sia in condizioni di concentrazione unitaria delle specie in soluzione sia in condizioni di forte diluizione, mantenendo nel comparto anodico e catodico le stesse concentrazioni.

I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 3:

Tabella 3: parametri sperimentali della pila iodio/ferro con KI e Fe(III) in concentrazioni variabili.

| | | | | | | | |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Molarità FeCl₃ (mmol/l) | 5,00·10 ⁻¹ | 5,00 | 1,00·10 ¹ | 5,00·10 ¹ | 1,00·10 ² | 5,00·10 ² | 1,00·10 ³ |
| Molarità KI (mmol/l) | 5,00·10 ⁻¹ | 5,00 | 1,00·10 ¹ | 5,00·10 ¹ | 1,00·10 ² | 5,00·10 ² | 1,00·10 ³ |
| Molarità⁻¹ (l/mol) | 2,00·10 ³ | 2,00·10 ² | 1,00·10 ² | 2,00·10 ¹ | 1,00·10 ¹ | 2,00 | 1,00 |
| Pmax (μW/cm²) [media da 6 curve I(V)] | 0,189± 0,007 | 2,20± 0,10 | 5,02± 0,08 | 16,6±0,2 | 28,1±0,3 | 78,7±3,6 | 114±2 |
| Isc (μA) [da 1° curva I(V)] | 26,4 | 239 | 439 | 1,24·10 ³ | 1,78·10 ³ | 3,74·10 ³ | 5,61·10 ³ |
| Jsc (μA/cm²) [da 1° curva I(V)] | 7,99 | 7,24·10 ¹ | 1,33·10 ² | 3,77·10 ² | 5,38·10 ² | 1,13·10 ³ | 1,70·10 ³ |
| Voc (Volt) [media da 6 curve I(V)] | 0,109± 0,003 | 0,168± 0,006 | 0,196± 0,003 | 0,216± 0,007 | 0,237± 0,003 | 0,290± 0,008 | 0,310± 0,006 |
| FF | 0,91 | 0,77 | 0,79 | 0,82 | 0,85 | 0,89 | 0,89 |
| Corrente massima (μA/cm²) [da cronoamperometria] | 4,52 | 4,30·10 ¹ | 7,76·10 ¹ | 2,38·10 ² | 3,35·10 ² | 7,57·10 ² | 9,40·10 ² |
| Corrente massima⁻¹ (cm²/μA) [da cronoamperometria] | 2,21·10 ⁻¹ | 2,33·10 ⁻² | 1,29·10 ⁻² | 4,20·10 ⁻³ | 3,00·10 ⁻³ | 1,3·10 ⁻³ | 1,1·10 ⁻³ |

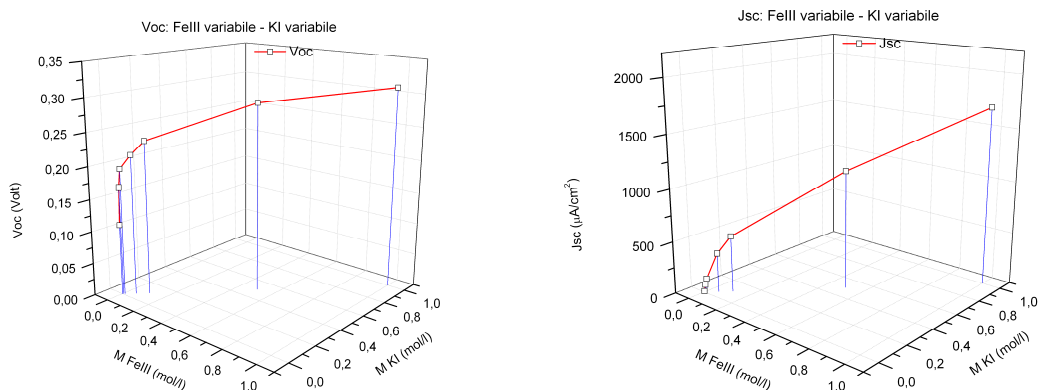


Figura 42: valori di Voc (sinistra) e Jsc (destra) al variare della concentrazione delle specie in soluzione.

I valori di J_{SC} e V_{OC} aumentano all'aumentare della concentrazione delle specie chimiche in soluzione. In condizioni standard il valore di V_{OC} è significativamente superiore a quello della forza elettromotrice ottenuto per via teorica, tale risultato può essere attribuibile alla riduzione progressiva della specie I_2 a causa della reazione consecutiva che genera I_3^- stabile. Infatti, come si evince dall'equazione di Nernst, il termine $[\ln ([I]^{2}/[I_2])]$ tende ad aumentare e quindi ad incrementare il valore della differenza di potenziale standard tra le specie elettrochimiche.

La maggior variazione è legata ai valori di J_{SC} che tendono progressivamente a zero a basse concentrazioni delle specie elettrochimiche. Questo fenomeno è certamente attribuibile all'instaurarsi di regimi diffusivi sulla superficie degli elettrodi.

Il valore di FF, legato all'efficienza della cella, aumenta con l'aumentare della concentrazione delle specie elettrochimiche con l'unica eccezione in cui entrambe le specie sono alla concentrazione più bassa. Allo stesso modo la potenza della cella incrementa progressivamente nell'avvicinarsi alle condizioni standard.

2. [KI] variabile [FeCl₃] fissa

Una nuova serie di esperimenti è stata effettuata mantenendo fissa la concentrazione di FeCl₃ (1M) e variando quella di KI tra lo 0,5mM e l'1M.

La Tabella 4 mostra i risultati ottenuti:

Tabella 4: parametri sperimentali della pila iodio/ferro con KI in concentrazione variabile e FeIII fissa.

| | | | | | | | |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Molarità FeCl₃ (mmol/l) | 1,00·10 ³ | 1,00·10 ³ | 1,00·10 ³ | 1,00·10 ³ | 1,00·10 ³ | 1,00·10 ³ | 1,00·10 ³ |
| Molarità KI (mmol/l) | 5,00·10 ⁻¹ | 5,00 | 1,00·10 ¹ | 5,00·10 ¹ | 1,00·10 ² | 5,00·10 ² | 1,00·10 ³ |
| Molarità KI⁻¹ (l/mol) | 2,00·10 ³ | 2,00·10 ² | 1,00·10 ² | 2,00·10 ¹ | 1,00·10 ¹ | 2,00 | 1,00 |
| Pmax (μW/cm²) [media da 6 curve I(V)] | 3,10±0,30 | 9,54±0,61 | 18,2±0,7 | 49,6±2,0 | 59,8±2,0 | 131±5,9 | 167±8 |
| Isc (μA) [da 1° curva I(V)] | 174 | 486 | 963 | 2,30·10 ³ | 2,85·10 ³ | 5,52·10 ³ | 6,38·10 ³ |
| Jsc (μA/cm²) [da 1° curva I(V)] | 52,6 | 147 | 292 | 695 | 865 | 1,67·10 ³ | 1,93·10 ³ |
| Voc (Volt) [media da 6 curve I(V)] | 0,277± 0,033 | 0,275± 0,017 | 0,252± 0,010 | 0,273± 0,010 | 0,279± 0,012 | 0,311± 0,013 | 0,331± 0,014 |
| FF | 0,75 | 0,84 | 0,79 | 0,87 | 0,82 | 0,86 | 0,89 |
| Corrente massima (μA/cm²) [da cronoamperometria] | 33,0 | 72,1 | 166 | 384 | 476 | 852 | 961 |
| Corrente massima⁻¹ (cm²/μA) [da cronoamperometria] | 3,03·10 ⁻¹ | 1,39·10 ⁻² | 6,00·10 ⁻³ | 2,60·10 ⁻³ | 2,10·10 ⁻³ | 1,20·10 ⁻³ | 1,00·10 ⁻³ |

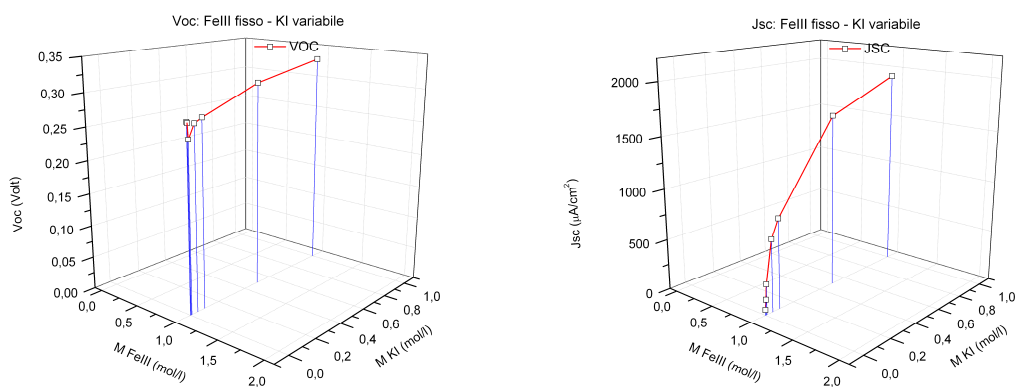


Figura 43: valori di Voc (sinistra) e Jsc (destra) al variare della concentrazione delle specie in soluzione.

3. [KI] fissa [FeCl₃] variabile

Come ultima analisi si decide di testare il comportamento della cella nel caso in cui si fissi la concentrazione di KI ad 1M e si vada a variare quella di FeCl₃ da 0,5mM fino a concentrazione unitaria.

I risultati sono riassunti in Tabella 5:

Tabella 5: parametri sperimentali della pila iodio/ferro con KI in concentrazione fissa e FeIII variabile.

| | | | | | | | |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Molarità FeCl₃ (mmol/l) | $5,00 \cdot 10^{-1}$ | 5,00 | $1,00 \cdot 10^1$ | $5,00 \cdot 10^1$ | $1,00 \cdot 10^2$ | $5,00 \cdot 10^2$ | $1,00 \cdot 10^3$ |
| Molarità KI (mmol/l) | $1,00 \cdot 10^3$ | $1,00 \cdot 10^3$ | $1,00 \cdot 10^3$ | $1,00 \cdot 10^3$ | $1,00 \cdot 10^3$ | $1,00 \cdot 10^3$ | $1,00 \cdot 10^3$ |
| Molarità FeCl₃⁻¹ (l/mol) | $2,00 \cdot 10^3$ | $2,00 \cdot 10^2$ | $1,00 \cdot 10^2$ | $2,00 \cdot 10^1$ | $1,00 \cdot 10^1$ | 2,00 | 1,00 |
| Pmax (μW/cm²) [media da 6 curve I(V)] | 2,69±0,18 | 11,8±4,5 | 32,7±8,7 | 63,2±5,3 | 81,3±5,2 | 100±8 | 119±9 |
| Isc (μA) [da 1° curva I(V)] | $1,16 \cdot 10^3$ | $3,30 \cdot 10^3$ | $4,41 \cdot 10^3$ | $4,63 \cdot 10^3$ | $5,26 \cdot 10^3$ | $6,21 \cdot 10^3$ | $6,81 \cdot 10^3$ |
| Jsc (μA/cm²) [da 1° curva I(V)] | 343 | $9,71 \cdot 10^2$ | $1,30 \cdot 10^3$ | $1,36 \cdot 10^3$ | $1,55 \cdot 10^3$ | $1,83 \cdot 10^3$ | $2,00 \cdot 10^3$ |
| Voc (Volt) [media da 6 curve I(V)] | 0,110± 0,004 | 0,214± 0,019 | 0,244± 0,012 | 0,268± 0,013 | 0,284± 0,012 | 0,295± 0,011 | 0,306± 0,014 |
| FF | 0,31 | 0,30 | 0,53 | 0,78 | 0,82 | 0,85 | 0,88 |
| Corrente massima (μA/cm²) [da cronoamperometria] | 280 | 597 | 729 | 742 | 850 | 898 | 975 |
| Corrente massima⁻¹ (cm²/μA) [da cronoamperometria] | $3,60 \cdot 10^{-3}$ | $1,70 \cdot 10^{-3}$ | $1,40 \cdot 10^{-3}$ | $1,30 \cdot 10^{-3}$ | $1,20 \cdot 10^{-3}$ | $1,10 \cdot 10^{-3}$ | $1,00 \cdot 10^{-3}$ |

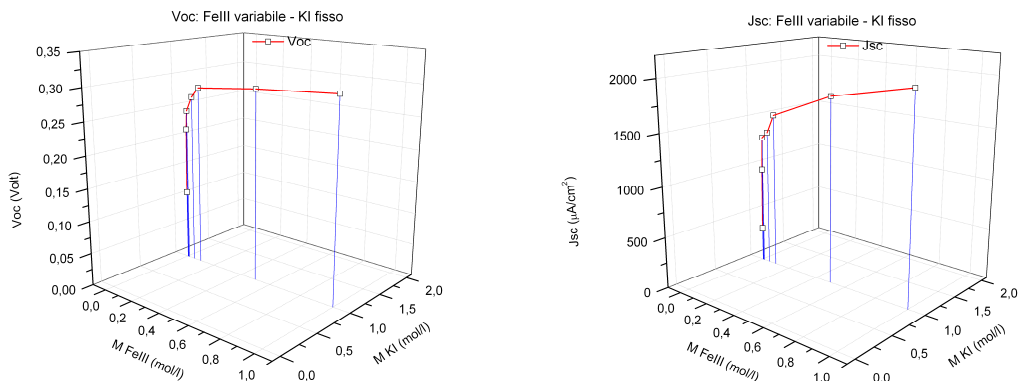


Figura 44: valori di Voc (sinistra) e Jsc (destra) al variare della concentrazione delle specie in soluzione.

Dall’osservazione delle Figura 42, Figura 43, Figura 44, emerge un fenomeno interessante riguardo i valori di V_{OC} , infatti, nei due casi in cui la concentrazione di FeCl₃ viene fatta variare, la differenza di potenziale a circuito aperto sviluppata dalla cella (come media delle sei curve I(V)), varia da +0,11V fino a +0,31V su tutto lo spettro di concentrazioni indagate. Nell’unico caso in cui l’FeCl₃ è presente in concentrazione fissa ed unitaria, invece, la V_{OC} generata dalla pila si attesta su valori compresi tra +0,28V e +0,33V. L’equazione della forza

elettromotrice riferita alla pila oggetto di studio ci informa che all'aumentare della concentrazione delle specie KI ed FeCl₃ presenti in soluzione, la differenza di potenziale misurata ai due capi della pila debba aumentare, questa affermazione coincide con i risultati sperimentali ottenuti, tuttavia, sembra che la V_{OC} sia dipendente in misura maggiore da solo una delle specie presenti in soluzione, in particolare è ragionevole supporre che il contributo alla V_{OC} sia legato in misura maggiore al Fe(III). Una plausibile spiegazione a questo fenomeno si può ricercare nelle concentrazioni effettive nel microambiente dell'elettrodo.

Il trasporto di materia, in ognuna delle due semicelle, può avvenire in tre diverse maniere:

- convezione: moto delle specie presenti in soluzione causato da gradienti di densità o temperatura o da agitazione meccanica;
- diffusione: moto legato alla formazione di gradienti di concentrazione che si generano in prossimità degli elettrodi;
- migrazione: moto di particelle cariche a seguito dell'applicazione di un campo elettrico.

Nel caso della pila iodio/ferro, dato che le specie in soluzione presentano tutte una carica formale, il trasporto di massa verso la superficie dell'elettrodo sarà causato principalmente da fenomeni diffusivi e di migrazione (le soluzioni non sono sottoposte ad agitazione meccanica). Perciò si può considerare attorno all'elettrodo un'interfaccia, di spessore d , in cui il trasporto di materia avviene sulla base della legge di Fick:

$$\dot{n}_i^{nI} = -D_i \cdot \frac{dC_i}{dx}$$

Visti i risultati ottenuti, si può perciò supporre che l'I abbia un'elevata mobilità in soluzione, o comunque superiore rispetto alla mobilità del Fe(III), probabilmente legata ad un più alto coefficiente di diffusività D per la specie I rispetto a quello della specie Fe(III). Il motivo per cui i valori di potenziale si discostano principalmente per basse concentrazioni mentre convergono a concentrazioni più elevate può essere spiegato considerando la superficie dell'elettrodo come quella di un catalizzatore: una volta occupati tutti i siti attivi disponibili sulla superficie, la differenza di potenziale risentirà solamente della concentrazione delle specie presenti sull'area dell'elettrodo e non nel bulk.

Un ulteriore parametro da analizzare è quello della J_{SC} : nel caso 3. in cui il KI viene mantenuto per tutta la durata dell'esperimento in concentrazione fissa ed unitaria, i valori di densità di corrente registrati sono alti anche per basse concentrazioni di Fe(III), non altrettanto avviene invece nell'esperimento 2., dove il Fe(III) viene mantenuto in concentrazione fissa ed unitaria e si fa variare la concentrazione KI. Una ragionevole spiegazione ai fenomeni registrati può essere cercata nella cinetica di reazione: si suppone infatti che la velocità con cui la specie I si scarica sulla superficie dell'elettrodo nella semicella anodica sia inferiore rispetto alla velocità con cui il Fe(III) si riduce all'elettrodo nel comparto catodico.

Tale ipotesi è avvalorata dai valori di FF calcolati, infatti durante l'esperimento 3., questi passano da 0,3 per basse concentrazioni di Fe(III) fino a 0,9 per concentrazione unitaria di ossidante. Nelle altre due prove i valori di FF si mantengono intorno allo 0,8-0,9 per tutto lo spettro di concentrazioni indagate. Ciò può essere spiegato ipotizzando che il Fe(III), a basse concentrazioni, non sia in grado di drenare abbastanza velocemente il flusso elettronico sviluppato dall'elevata concentrazione di KI nella semicella anodica.

Riportando in grafico i valori di corrente massima registrata durante le cronoamperometrie e di J_{SC} in funzione della concentrazione delle specie in soluzione si ottiene un tipico andamento iperbolico (Figura 45, Figura 46), perciò sembra che le due variabili siano strettamente dipendenti l'una dall'altra.

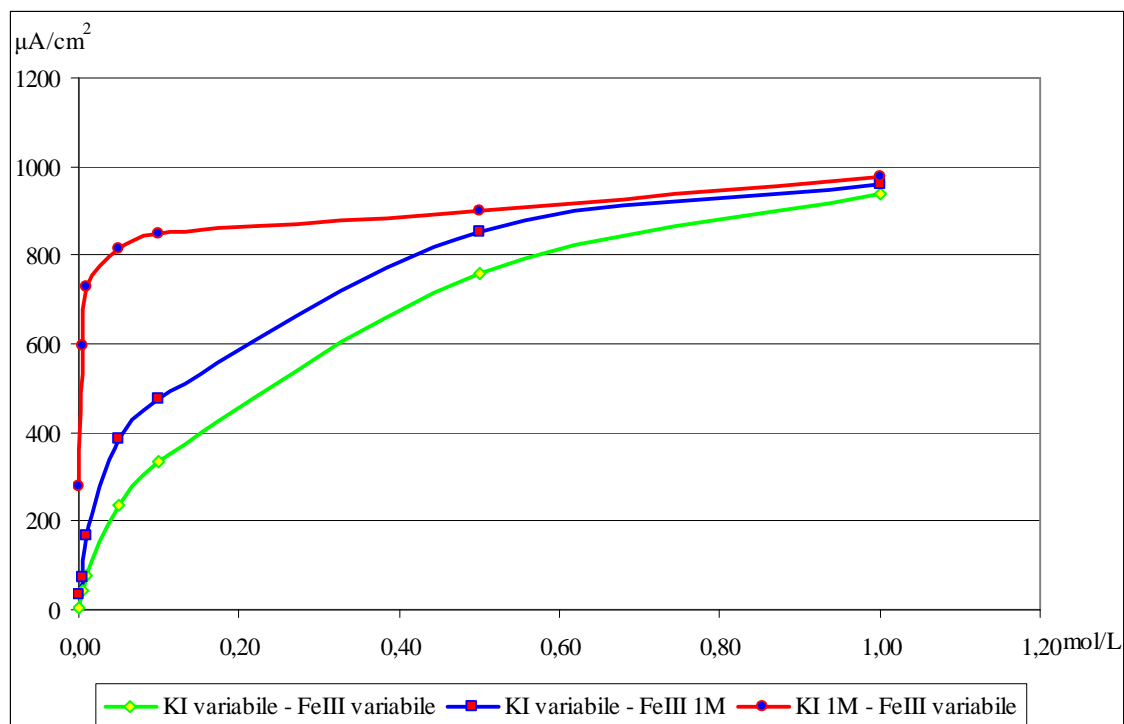


Figura 45: valori di corrente massima da cronoamperometria registrati al variare della concentrazione della specie in concentrazione variabile in soluzione.

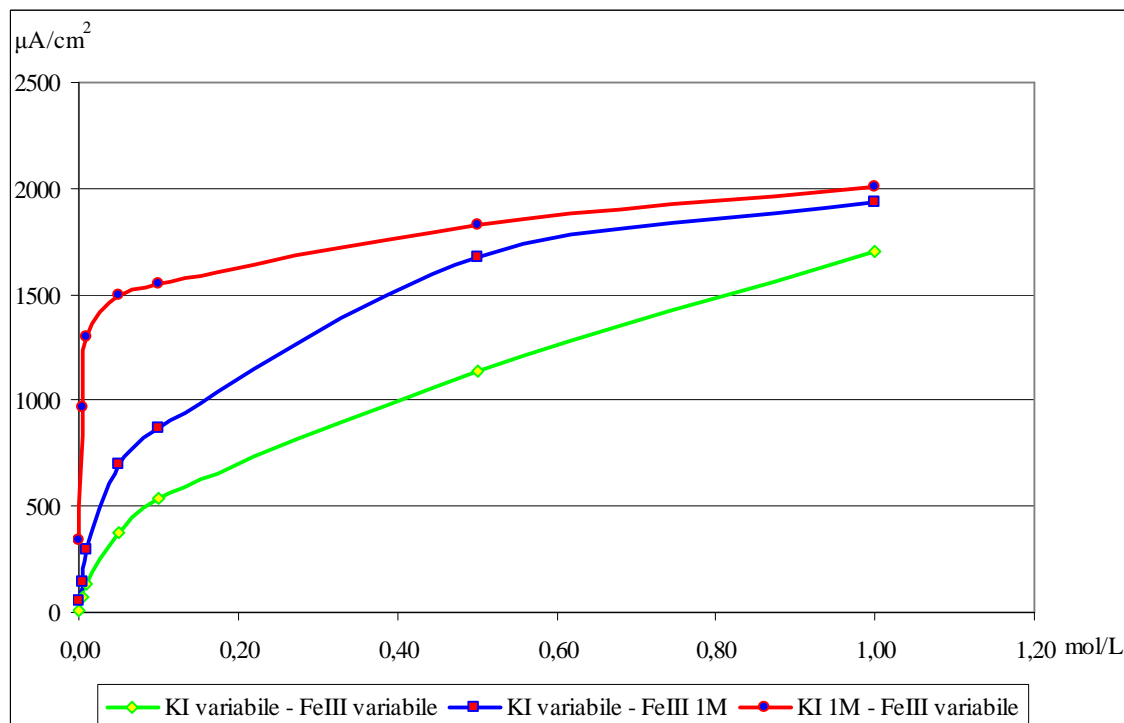


Figura 46: valori di J_{sc} registrati al variare della concentrazione della specie in concentrazione variabile in soluzione.

Per dimostrare la correlazione tra corrente erogata e concentrazione delle specie in soluzione si costruisce, per ciascuna prova effettuata, il grafico dei doppi reciproci (Figura 47, Figura 48, Figura 49) riportando l'inverso della densità di corrente in funzione dell'inverso della concentrazione delle specie elettrochimiche.

1. [KI] variabile, [FeCl₃] variabile

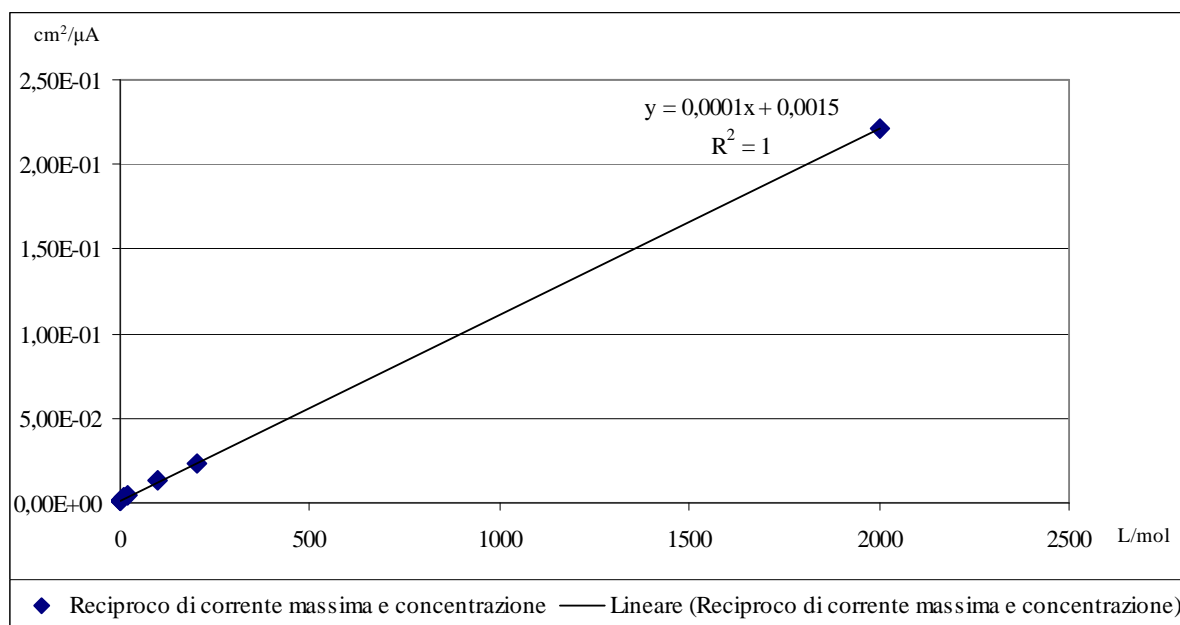


Figura 47: reciproco dei valori di corrente e concentrazione di KI e Fe Cl₃ della pila [KI] variabile, [FeCl₃] variabile.

2. [KI] variabile [FeCl₃] fissa

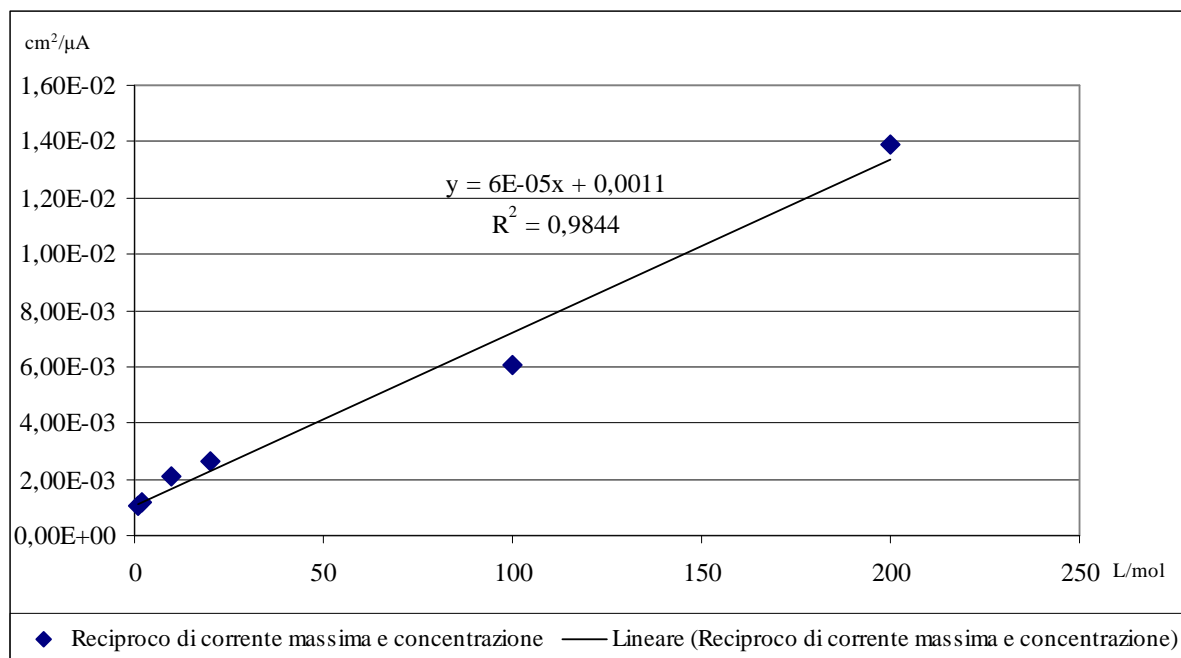


Figura 48: reciproco dei valori di corrente e concentrazione di KI della pila [KI] variabile, [FeCl₃] fissa.

3. [KI] fissa [FeCl₃] variabile

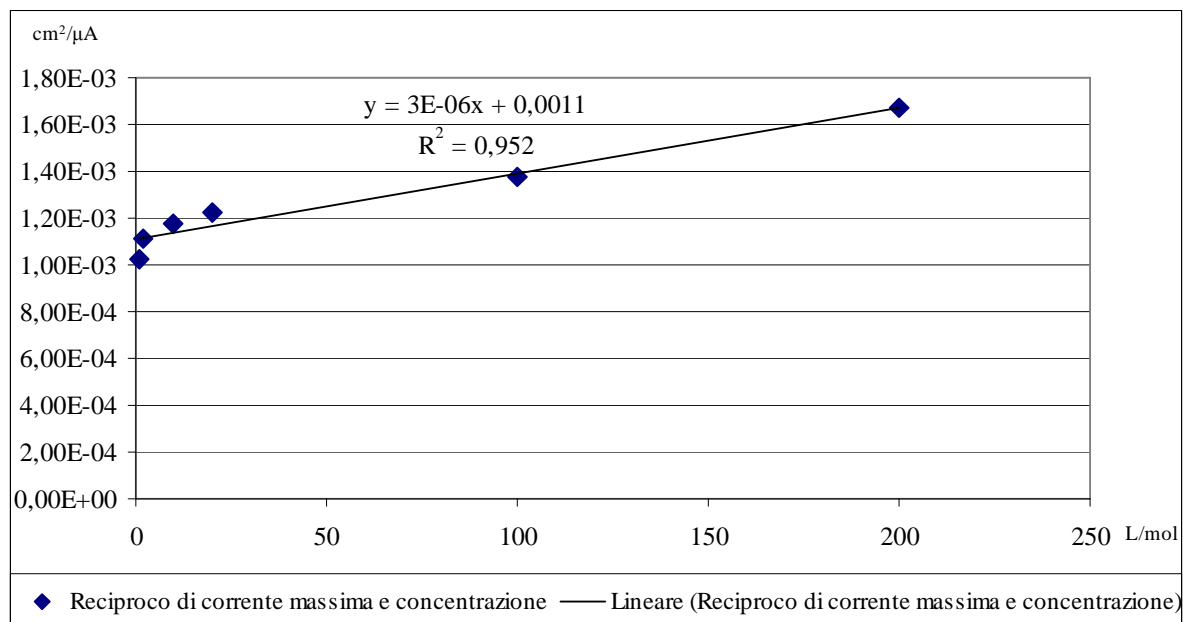


Figura 49: reciproco dei valori di corrente e concentrazione di FeCl₃ della pila [KI] fissa, [FeCl₃] variabile.

Sulla base dei risultati ottenuti dalla linearizzazione dei valori di corrente e concentrazione si può assumere come iperbolico l'andamento dei parametri di corrente della pila e lo si può descrivere attraverso la seguente funzione:

$$\text{Densità di corrente} = (\text{Densità di corrente}_{\text{max}} \times [\text{concentraz.}]) / (K_m + [\text{concentraz.}]);$$

Da cui si evince che l'intensità di corrente aumenta al crescere della concentrazione delle specie elettrochimiche fino a giungere asintoticamente ad un valore massimo corrispondente alla massima velocità della reazione chimica. Il valore di K_m , invece, è indice della capacità della specie elettrochimica di scambiare elettroni con l'elettrodo nella corrispondente semicella. Tale valore è inversamente proporzionale alla capacità di scambio. L'interpretazione degli andamenti mette in evidenza che la specie Fe(III) è maggiormente affine allo scambio rispetto alla specie I.

Questa maggiore affinità potrebbe essere attribuita a differenti limiti diffusivi delle due specie all'interfaccia con l'elettrodo, in cui probabilmente la velocità con la quale lo ioduro si ossida è maggiore di quella con lo ioduro diffonde dal bulk della soluzione fino alla superficie dell'elettrodo.

Con l'obiettivo di ricavare, per ogni esperimento eseguito, i valori di K_m e di velocità di reazione massima (V), si sviluppa il metodo dei doppi reciproci:

partendo dall'equazione sopra riportata, mediante semplici conversioni algebriche è possibile ottenere la seguente espressione:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{a} + \frac{1}{V}$$

In questa equazione $1/v$ ed $1/a$ sono variabili e rappresentano i reciproci della velocità di reazione e della concentrazione di substrato, in questo caso si prende come concentrazione di substrato la concentrazione di I o Fe(III) in soluzione mentre la velocità di reazione è ben rappresentata dal valore massimo di corrente letto durante la cronoamperometria, che coincide con i μA registrati al tempo zero. K_m/V e $1/V$ sono costanti: il primo rappresenta la concentrazione di substrato necessaria affinché la reazione abbia velocità pari a metà della velocità massima, mentre il secondo rappresenta proprio il valore di velocità massima della reazione, raggiunta allo stato stazionario.

1. [KI] variabile, [FeCl₃] variabile

Dalla linea di tendenza (Figura 47) si ricava:

- $V = +667$;
- $K_m = +6,67 \times 10^{-2}$;
- $K_m/V = +1 \times 10^{-4}$.

2. [KI] variabile [FeCl₃] fissa

Dalla Figura 48 si ricava:

- $V = +909$;
- $K_m = +5,45 \times 10^{-2}$;
- $K_m/V = +6 \times 10^{-5}$.

3. [KI] fissa [FeCl₃] variabile

Dalla linea di tendenza (Figura 49) si ricava:

- $V = +909$;
- $K_m = 2,73 \times 10^{-3}$;
- $K_m/V = 3 \times 10^{-6}$.

Lo stadio lento nella fase di ossidazione dell'I⁻ non è tanto la formazione del complesso elettrodo-I⁻, quanto piuttosto l'evoluzione di quest'ultimo a formare i prodotti finali di reazione. Ciò spiega anche il motivo per cui i valori di V_{OC} registrati durante l'esperimento 2., per concentrazioni di Fe(III) fisse, a differenza di quelli misurati in 1. e 3., si attestino su valori più stabili e alti anche nel caso di basse concentrazioni.

Questi risultati esprimono la diversa affinità con cui le specie interagiscono con la superficie elettrodica durante lo svolgimento delle reazioni elettrochimiche. Giunti a questo punto perciò la scelta dell'elettrodo per catalizzare una reazione elettrochimica deve tenere conto anche del parametro di affinità nei confronti dei reagenti impiegati.

4.3 Saggio spettrofotometrico della cinetica di reazione tra NADH e Blu di metilene

In molti organismi l'energia che occorre per la sintesi di ATP viene da un processo ossidativo, effettuato da un sistema di trasporto specializzato, detto "catena respiratoria".

Se gli organismi vivono in presenza di ossigeno atmosferico, organismi aerobi, esso diventa l'accettore finale degli elettroni ceduti dalle sostanze organiche, introdotte con l'alimentazione, si parla in questo caso di respirazione aerobica.

Tutte le respirazione aerobiche avvengono a livello di catene trasportatrici di elettroni che presentano caratteristiche diverse a seconda del tipo di organismo.

Come già accennato, durante i processi catabolici, le cellule e gli organismi aerobi ossidano specie ad alto contenuto energetico trasferendo idrogeni da queste ai coenzimi piridinici NAD^+ e flavinici FAD che, al termine del processo, si trovano sotto forma ridotta $\text{NADH} + \text{H}^+$ e FADH_2 .

I coenzimi ridotti sono continuamente ri-ossidati dall'ossigeno atmosferico (Figura 50).

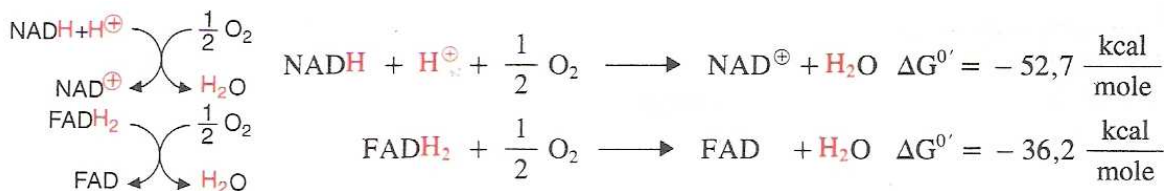


Figura 50: schema di ossidazione dei coenzimi.³⁸

L'energia liberata dai processi di ossidazione (Figura 50) viene frazionata in più tappe per sintetizzare più molecole di ATP dato che la cellula, qualunque sia la quantità di energia adottata da una ossidazione, forma un solo legame anidrico alla volta. Il frazionamento avviene mediante la catena respiratoria, costituita sempre da una successione di proteine enzimatiche. Queste sono associate ad una molecola o ad un catione, capace di esistere in forma ossidata o ridotta, e avente un ben preciso valore di potenziale redox. Funzionano in complessi ordinati in modo tale che i potenziali dei coenzimi si susseguano in ordine dal più negativo (NAD^+/NADH), al più positivo (O_2/O^{2-}).

Le differenze fra i potenziali provocano un flusso di elettroni lungo la catena, questo processo è detto fosforilazione ossidativa (Figura 51).³⁸

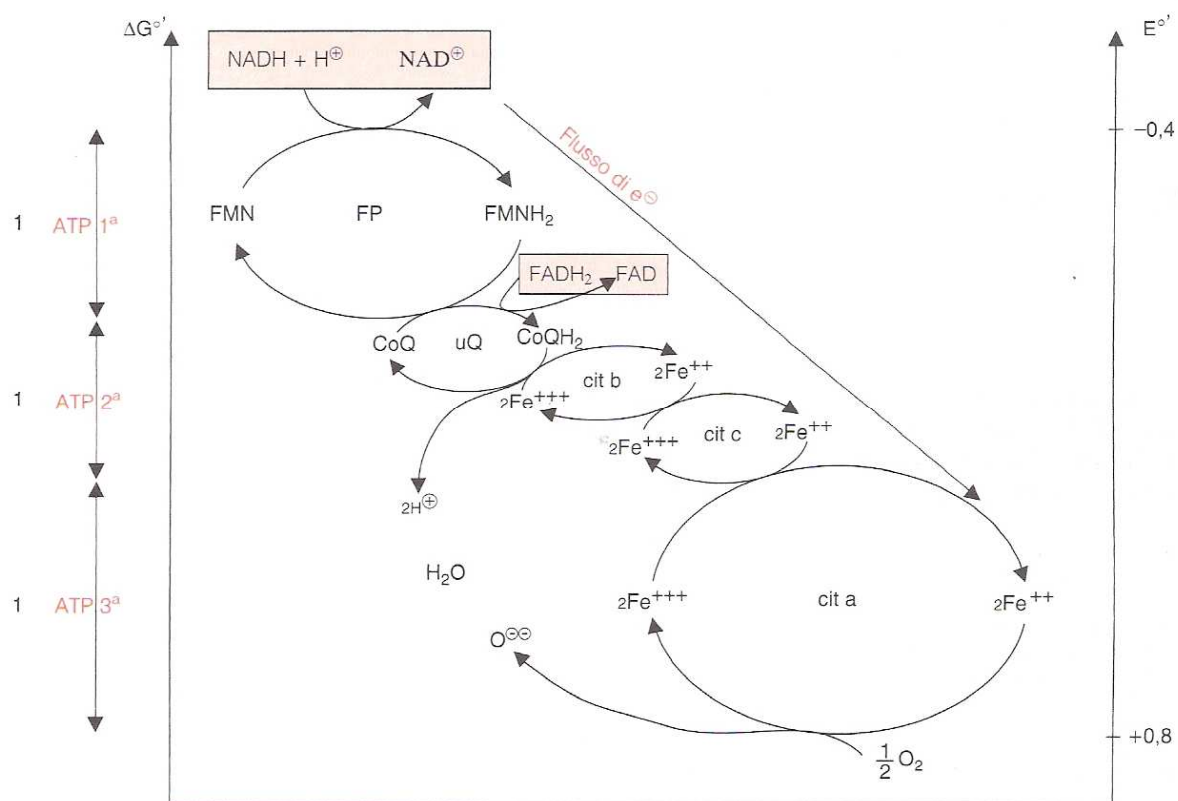


Figura 51: salti energetici che accompagnano il flusso di elettroni nella catena respiratoria.³⁸

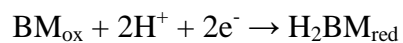
Si studia la possibilità di sviluppare una reazione biomimetica della fosforilazione ossidativa, che permetta di seguire attraverso lo spettrofotometro la reazione di ossidazione del NADH. Tale reazione viene sviluppata con e senza catalizzatore: l'enzima Diaforasi, impiegando blu di metilene come ultimo accettore di elettroni.

La scelta delle seguenti specie deriva da precedenti studi eseguiti in questo campo,^{36, 40} il blu di metilene, una volta costruita la cella, sarà la molecola responsabile del trasferimento elettronico all'elettrodo. Per monitorare l'andamento della reazione si registra, attraverso lo spettrofotometro, una variazione colorimetrica della soluzione nel tempo.

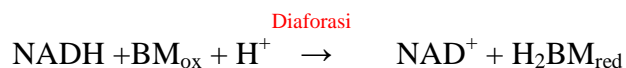
La reazione che si monitora è una reazione di ossidoriduzione: l'intero processo si sviluppa come una prima ossidazione del NADH che cede i suoi elettroni alla Diaforasi e infine al blu di metilene (BM), o direttamente a quest'ultimo, che si riduce.

Le reazioni oggetto di studio sono le seguenti:





Si può scrivere quindi la reazione di ossidoriduzione completa, sia nel caso quest'ultima sia mediata da Diaforasi, sia che non lo sia:



Il blu di metilene (Figura 52) in forma ossidata è un eterociclo aromatico che presenta un picco caratteristico di assorbimento a 664nm (Figura 53).

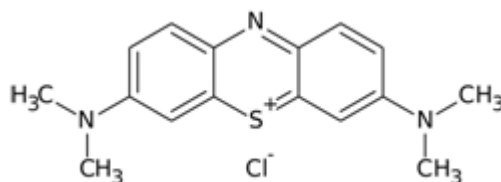


Figura 52: struttura molecolare del Blu di metilene.

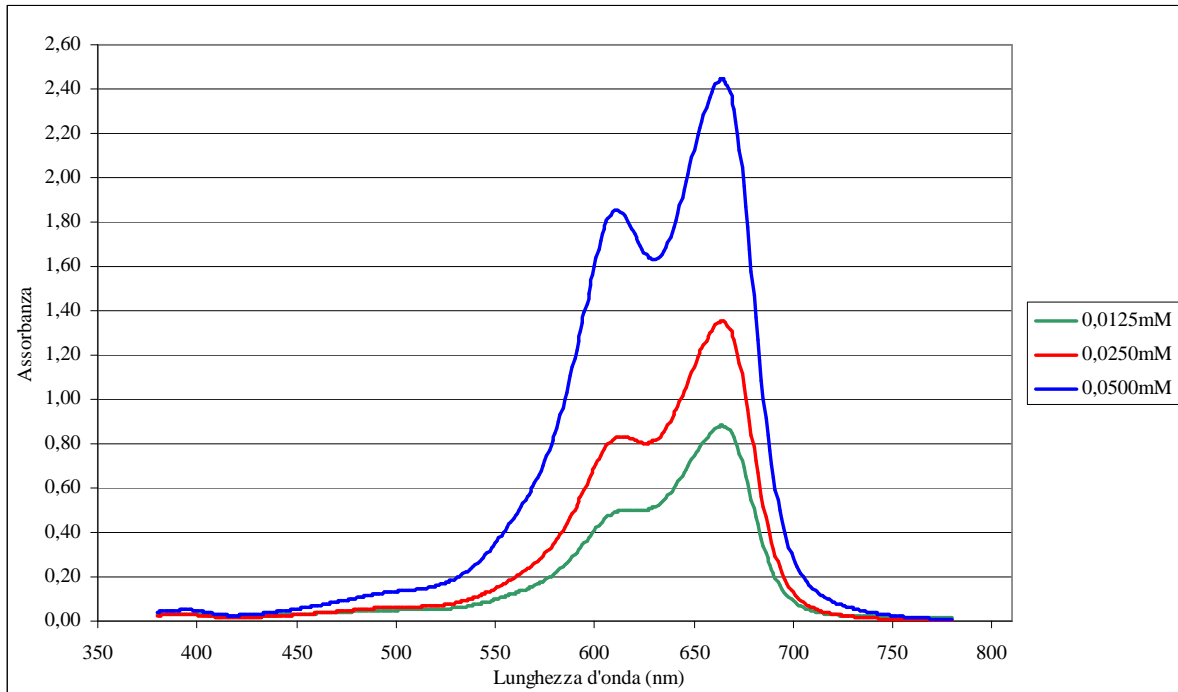


Figura 53: spettri di assorbimento delle soluzioni di blu di metilene al variare della concentrazione.

Il profilo dello spettro è fortemente legato al pH della soluzione⁴⁰ perciò si è scelto di eseguire le analisi in soluzioni tamponate a pH 7,8 di tampone fosfato 0,1M.

La reazione di ossidoriduzione porta alla formazione di blu di metilene ridotto, quest'ultimo è completamente incolore e perciò la cinetica di reazione può essere seguita valutando la velocità di decolorazione a 664nm della soluzione.

La prima analisi viene eseguita in assenza di Diaforasi, la seconda con Diaforasi libera in soluzione in concentrazione 1U/ml (Figura 54). Si aggiunge il NADH e si registra lo spettro.

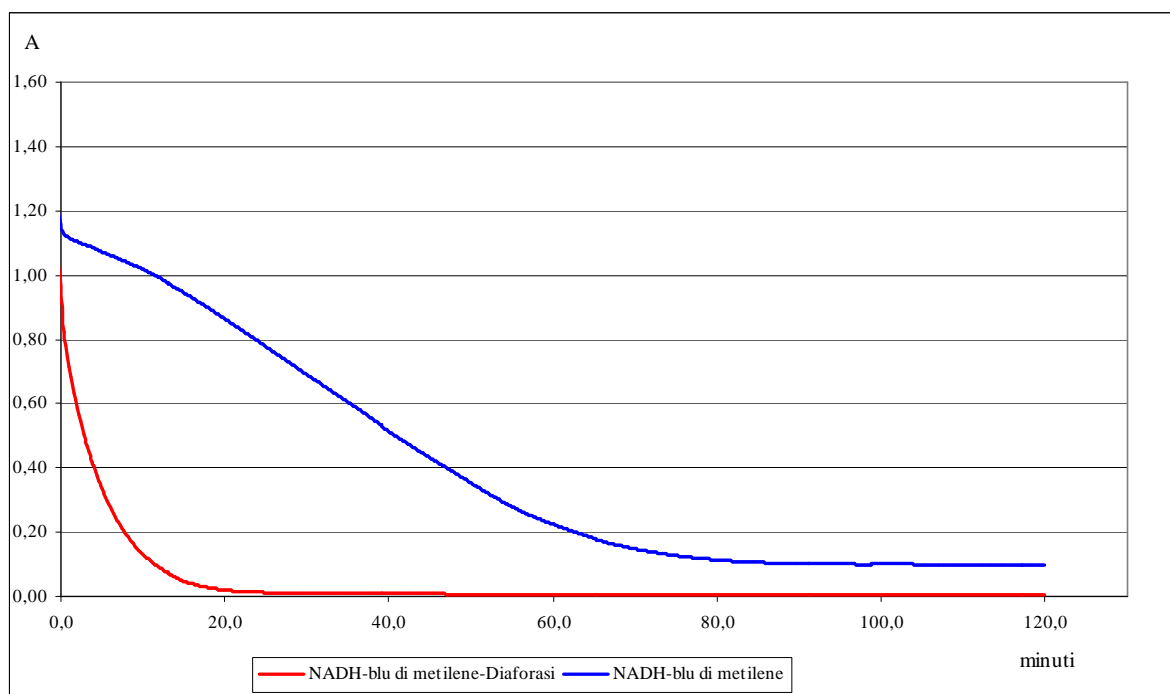


Figura 54: Drive della reazione tra NADH e BM in assenza ed in presenza di Diaforasi.

La reazione di riduzione del BM ha luogo anche in assenza di Diaforasi (Figura 54), tuttavia, in quest'ultimo caso, la velocità con cui la soluzione si decolora è decisamente più bassa rispetto a quella della reazione catalizzata da Diaforasi. Questo indica che la reazione è certamente favorita da un punto di vista termodinamico e l'enzima, in quanto catalizzatore, la rende più veloce da un punto di vista cinetico attraverso la costituzione di semireazioni aventi energie di attivazione inferiori. La velocità della reazione può essere verificata attraverso il calcolo dei tempi di mezza vita della specie BM_{ox} in soluzione durante la cinetica della reazione (Tabella 6).

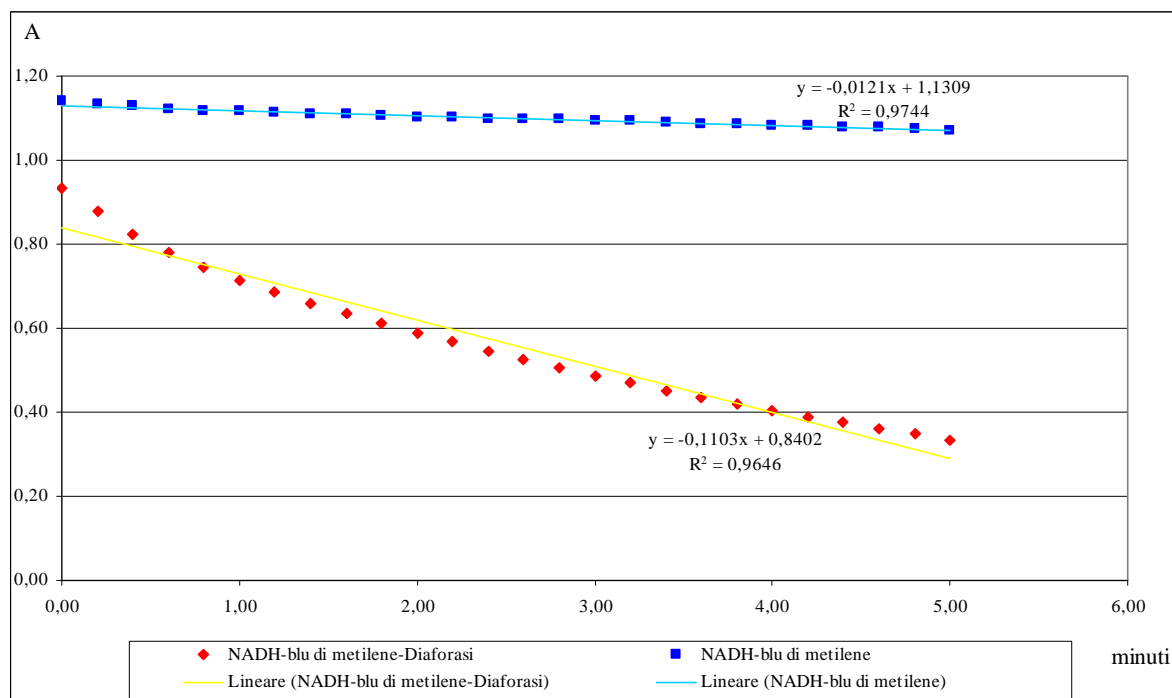


Figura 55: valori di assorbanza letti nei primi 5' di registrazione della Time Drive.

Si riportano tutti i dati estrapolati dall'analisi dei grafici in Tabella 6:

Tabella 6: parametri principali ricavati dall'analisi delle Time Drive.

| Temperatura (°C) | 25-30 | |
|--|---------------------|---------------------|
| Molarità NADH (mmol/l) | 5,00 | 5,00 |
| Molarità BM (mmol/l) | $2,5 \cdot 10^{-2}$ | $2,5 \cdot 10^{-2}$ |
| Contenuto Diaforasi (U/ml) | 0,00 | 1,00 |
| Assorbanza iniziale (A) | 1,14 | 0,93 |
| Assorbanza a plateau (A) | $9,8 \cdot 10^{-2}$ | $6,0 \cdot 10^{-3}$ |
| Tempo di mezza vita BM ossidato (min) | 30,5 | 1,20 |

La reazione di riduzione del blu di metilene da parte del NADH è in competizione con la reazione di ossidazione di quest'ultimo da parte dell'ossigeno atmosferico, le cuvette vengono tappate ma anche con questo accorgimento non è possibile eliminare completamente la presenza di ossigeno disciolto in soluzione.

In precedenti lavori di tesi^{36,40} si valutava, oltre alla velocità di decolorazione, anche la velocità con cui la soluzione si ricolorava a seguito dell'ossidazione del blu di metilene da parte dell'ossigeno atmosferico. In questo caso, nei 120 minuti in cui si registra l'assorbanza non si osserva alcuna ricolorazione della soluzione, questo fenomeno è probabilmente legato all'elevata concentrazione di NADH rispetto a quella di blu di metilene nell'ambiente di reazione.

4.4 Studi di stabilità delle specie coinvolte nella reazione di ossidoriduzione

Vista la necessità di lavorare in condizioni di concentrazioni elevate delle specie coinvolte nella reazione di ossidoriduzione per confrontare i risultati ottenuti con quelli della pila zinco/rame e iodio/ferro, e vista l'elevata instabilità dei componenti organici che partecipano alla reazione di ossidazione del NADH, si decide di studiarne l'inalterabilità nel tempo.

Le analisi elettrochimiche infatti non potranno essere realizzate nello stesso giorno in cui si preparano le soluzioni a causa di mancanza di tempo, queste ultime allora saranno preparate un giorno per il successivo.

Le cinetiche di reazione eseguite immediatamente dopo la preparazione delle soluzioni, dopo 24h e dopo 48h sono state riportate in Figura 56 e Figura 57: in ascissa i valori di assorbanza ed in ordinata i valori di tempo, sia in assenza di Diaforasi:

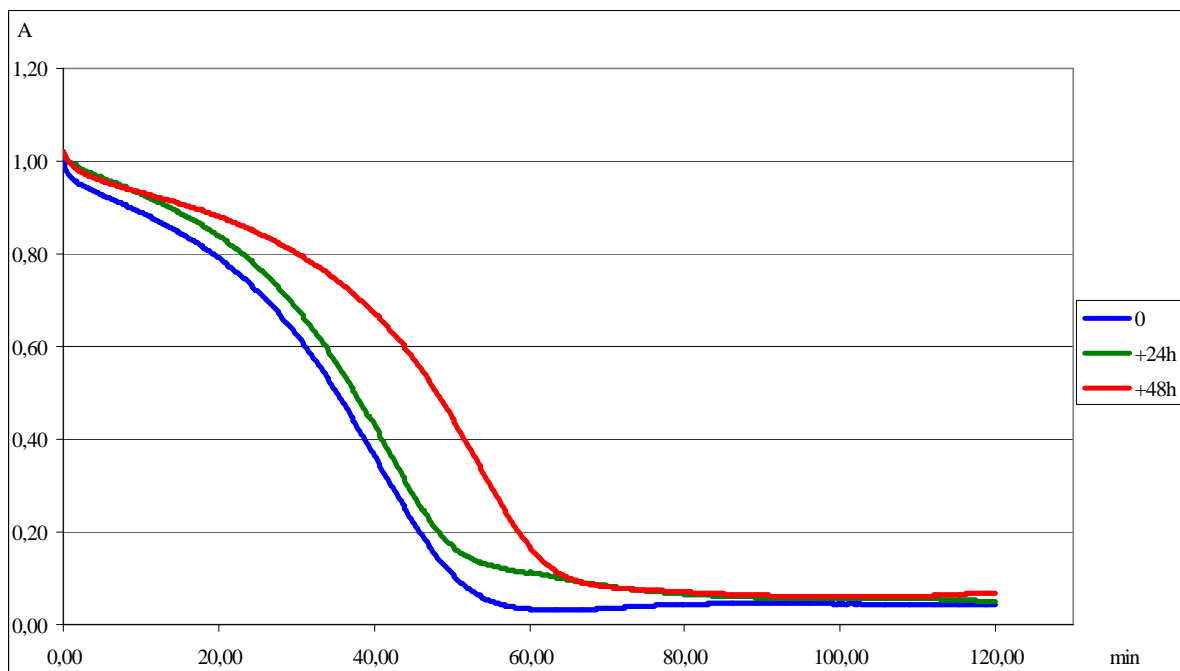


Figura 56: Time Drive della reazione tra NADH e blu di metilene.

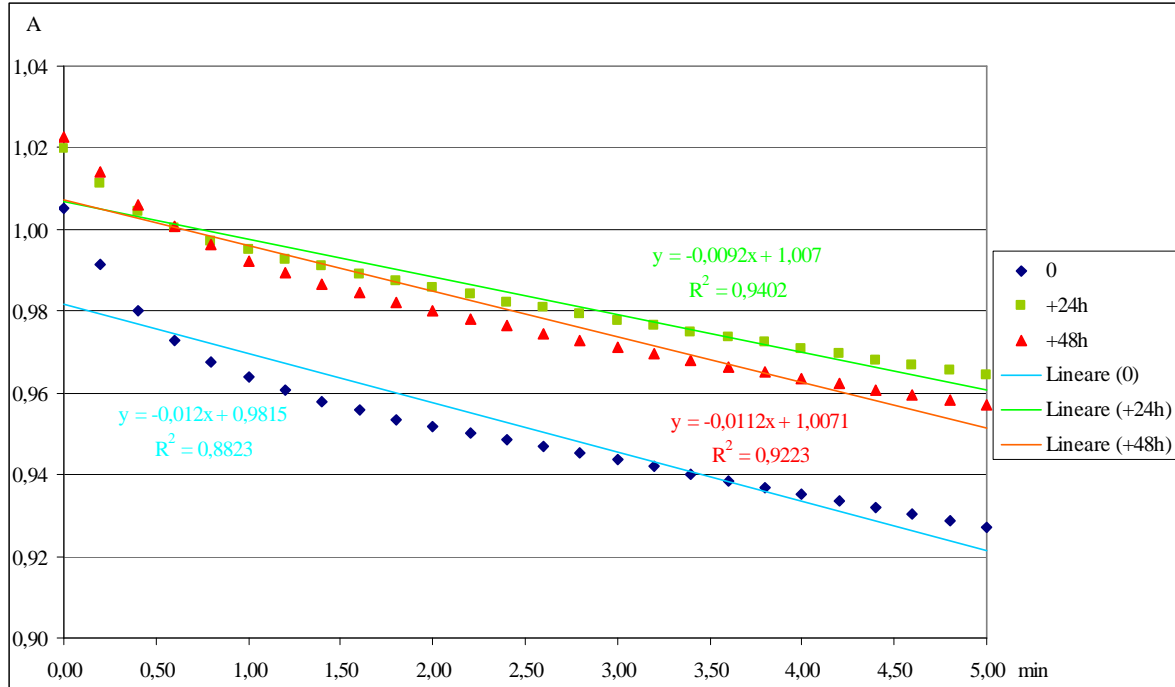


Figura 57: valori di assorbanza registrati durante la Time Drive della reazione tra NADH e blu di metilene nei primi 5'.

Sia in presenza di enzima (Figura 58, Figura 59):

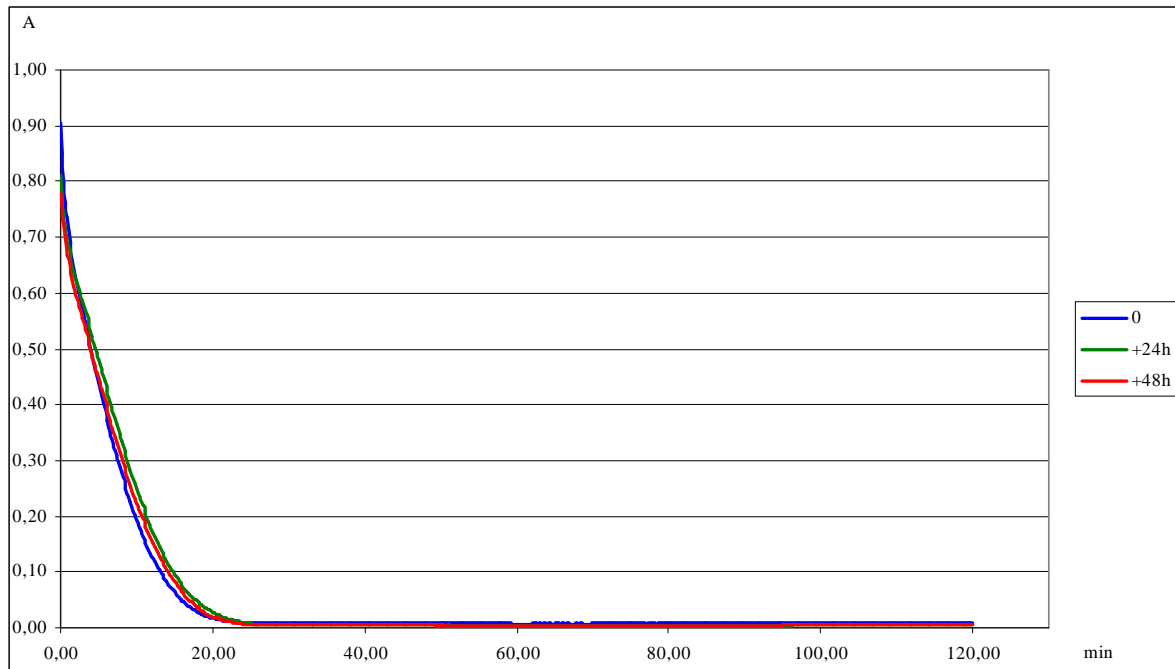


Figura 58: Time Drive della reazione tra NADH e blu di metilene in presenza di Diaforasi.

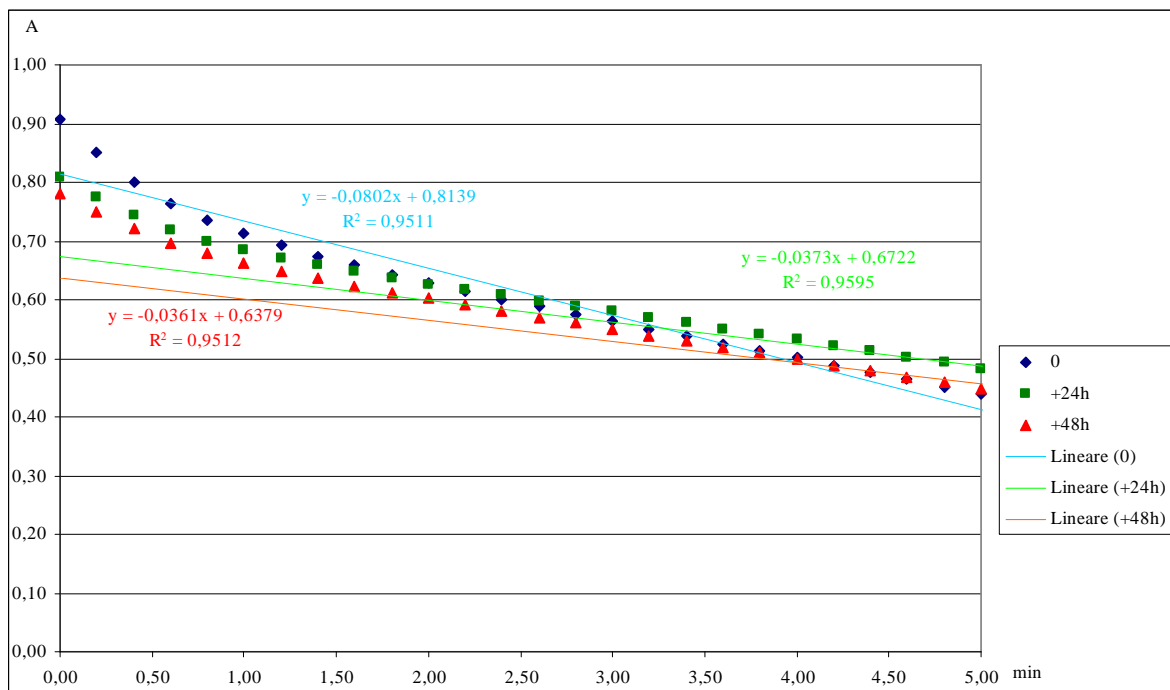


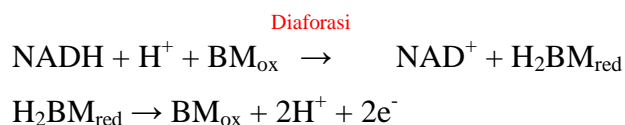
Figura 59: valori di assorbanza registrati durante la Time Drive della reazione tra NADH e blu di metilene in presenza di Diaforasi nei primi 5'.

Dalla pendenza delle rette nei primi cinque minuti in cui è stata registrata l'assorbanza (Figura 58, Figura 59) e dai dati ottenuti si può affermare che le specie come il NADH e la Diaforasi, anche se stoccate in concentrazioni elevate ($\geq 10\text{mM}$ per il NADH e 100U/ml per la Diaforasi), sicuramente, almeno nelle prime 24h di stoccaggio, non vanno incontro a perdite significative di attività. Alla luce di questi risultati è possibile andare a costruire celle a combustibile con un'alta concentrazione di substrati biochimici.

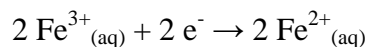
4.5 Pila a biocombustibile alimentata a NADH/Ferro

Si è quindi sostituito lo ioduro come specie chimica riducente con la coppia NADH/BM nella pila iodio/ferro precedentemente caratterizzata.

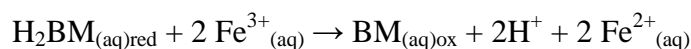
Nella semicella anodica si sviluppa la reazione di ossidazione del NADH, che, come si è potuto vedere dal saggio spettrofotometrico della cinetica di reazione, può avvenire con o senza enzima libero in soluzione, la reazione può essere così schematizzata:



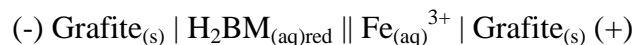
I due elettroni liberati dall'ossidazione del blu di metilene ridotto dovranno essere ceduti all'elettrodo nel comparto anodico, attraverso il quale fluiranno nel circuito esterno fino a raggiungere l'elettrodo immerso nella soluzione catodica. Come in tutte le altre pile costruite, l'elettroneutralità della soluzione sarà garantita dall'elettrolita contenuto nel ponte salino, che diffonderà nelle soluzioni bilanciando le cariche in eccesso consumate o generate. Nella semicella catodica, gli elettroni provenienti dal circuito, causeranno la reazione di riduzione del Fe(III):



Ai due capi degli elettrodi, perciò, si osserverà la seguente reazione:



Per maggior chiarezza si può schematizzare la cella nella seguente maniera:



Come per tutte le pile è possibile scrivere l'equazione per il calcolo del potenziale generato dalla cella in questione:

$$\text{f.e.m.} = E_{o(\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+})} - E_{o(\text{BM}^{\text{ox}}/\text{BM}^{\text{red}})} + \left\{ \frac{RT}{nF} \ln \left[\frac{([\text{Fe}^{3+}]^2 [\text{BM}^{\text{red}}])}{([\text{Fe}^{2+}]^2 [\text{BM}^{\text{ox}}])} \right] \right\}$$

Come si può notare nel calcolo del potenziale non compare la concentrazione di NADH, quest'ultimo infatti non prende parte alla reazione di scambio elettronico, o almeno non sulla superficie dell'elettrodo perciò l'unico fattore che il NADH influenza è la concentrazione di blu di metilene ridotto in soluzione.

Il potenziale standard di riduzione per la coppia $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ in HCl 0,1M è +0,730V⁴³, la coppia $\text{BM}^{\text{red}}/\text{BM}^{\text{ox}}$ è utilizzata in chimica come indicatore redox pH dipendente, presenta infatti a pH pari a zero un valore di potenziale E_o di +0,53V mentre a pH 7 il potenziale è E_o +0,01V. Tutte le soluzioni anodiche sono preparate in soluzioni tamponate a pH 7,8 di tampone fosfato, si assume perciò in prima approssimazione come valore di potenziale standard di riduzione della coppia $\text{BM}^{\text{red}}/\text{BM}^{\text{ox}}$ il valore di +0,01V. Se fossimo in grado di sviluppare una pila che presenti in soluzione tutte le concentrazioni delle specie in soluzione pari a 1M, quest'ultima dovrebbe generare ai suoi capi una differenza di potenziale di:

$$\Delta E_o = E_o(\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}) - E_o(\text{BM}^{\text{red}}/\text{BM}^{\text{ox}}) = +0,730\text{V} - (+0,010\text{V}) = +0,720\text{V}.$$

Si configurano due esperimenti con lo scopo di caratterizzare il comparto anodico rispetto al comparto contenente Fe(III):

1. si configura una cella che nel comparto anodico svolge la reazione di ossidazione del NADH senza catalizzatore, e per concentrazioni fisse di substrato, il NADH stesso, si studia la risposta della cella quando si varia la concentrazione di Fe(III);
2. si costruisce una cella in cui, al variare della concentrazione di Fe(III), si tiene fissa quella di NADH e blu di metilene, inserendo però in soluzione anche l'enzima Diaforasi.

1. [NADH], [BM] fissa, [FeCl₃] variabile

Nella prima fase di questo lavoro si preparano le soluzioni concentrate di NADH, blu di metilene ed FeCl₃ e si indaga il comportamento della cella sia in condizioni di concentrazione unitaria delle specie in soluzione sia in condizioni di forte diluizione,

fissando la concentrazione di NADH e BM a 5mM e variando quella di FeCl₃ da 1mM fino a concentrazione unitaria.

I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 7.

Tabella 7: parametri sperimentali della pila NADH/FeCl₃.

| | | | | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Molarità FeCl₃ (mmol/l) | 1,00 | $1,00 \cdot 10^1$ | $1,00 \cdot 10^2$ | $1,00 \cdot 10^3$ |
| Molarità BM (mmol/l) | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Molarità NADH (mmol/l) | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Pmax ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) [media da 6 curve I(V)] | $2,90 \pm 0,51$ | $9,04 \pm 3,55$ | $11,8 \pm 2,9$ | $17,6 \pm 5,8$ |
| Pmax ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) [da 1° curva I(V)] | 2,92 | 14,7 | 18,1 | 26,9 |
| Isc (μA) [da 1° curva I(V)] | $3,31 \cdot 10^2$ | $1,76 \cdot 10^3$ | $1,65 \cdot 10^3$ | $1,52 \cdot 10^3$ |
| Jsc ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) [da 1° curva I(V)] | 73,6 | 321 | 412 | 338 |
| Voc (Volt) [media da 6 curve I(V)] | $0,237 \pm 0,003$ | $0,437 \pm 0,116$ | $0,482 \pm 0,091$ | $0,584 \pm 0,127$ |
| Voc (Volt) [da 1° curva I(V)] | $2,32 \cdot 10^{-1}$ | $6,65 \cdot 10^{-1}$ | $6,39 \cdot 10^{-1}$ | $8,00 \cdot 10^{-1}$ |
| FF | 0,42 | 0,30 | 0,43 | 0,41 |
| Corrente massima ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) [da cronoamperometria] | 101 | 165 | 170 | 190 |
| Corrente massima⁻¹ ($\text{cm}^2/\mu\text{A}$) [da cronoamperometria] | $9,87 \cdot 10^{-3}$ | $6,07 \cdot 10^{-3}$ | $5,88 \cdot 10^{-3}$ | $5,26 \cdot 10^{-3}$ |

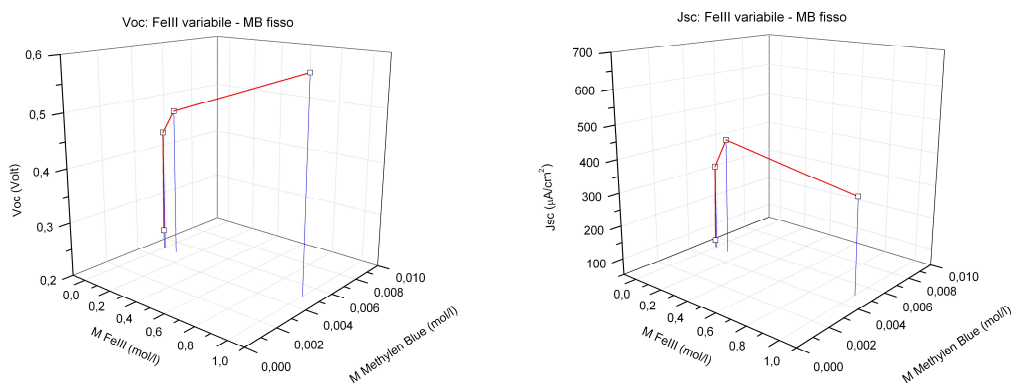


Figura 60: valori di Voc (sinistra) e Jsc (destra) al variare della concentrazione delle specie in soluzione.

2. [NADH], [BM], Diaforasi fissa, [FeCl₃] variabile

Il secondo esperimento prevede lo studio della risposta della cella a seguito di variazioni nella concentrazione di Fe(III), per concentrazione di NADH e blu di metilene fisse, a differenza di prima però, si inserisce nell'ambiente di reazione Diaforasi libera in soluzione. Come nella prova precedente il FeCl₃ vede variare la sua concentrazione da 1mM fino ad 1M.

La Tabella 8 mostra i risultati ottenuti:

Tabella 8: parametri sperimentali della pila NADH/FeCl₃ in presenza di Diaforasi.

| | | | | |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Molarità FeCl₃ (mmol/l) | 1,00 | 1,00·10 ¹ | 1,00·10 ² | 1,00·10 ³ |
| Molarità BM (mmol/l) | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Molarità NADH (mmol/l) | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Diaforasi (U/ml) | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| Pmax (μW/cm²) [media da 6 curve I(V)] | 5,48±1,61 | 10,8±3,6 | 13,0±2,2 | 12,2±6,5 |
| Pmax (μW/cm²) [da 1° curva I(V)] | 8,51 | 1,72·10 ¹ | 1,77·10 ¹ | 2,11·10 ¹ |
| Isc (μA) [da 1° curva I(V)] | 1,27·10 ³ | 2,90·10 ³ | 3,05·10 ³ | 3,05·10 ³ |
| Jsc (μA/cm²) [da 1° curva I(V)] | 2,81·10 ² | 6,44·10 ² | 6,79·10 ² | 6,77·10 ² |
| Voc (Volt) [media da 6 curve I(V)] | 0,336±0,047 | 0,348±0,077 | 0,372±0,063 | 0,379±0,141 |
| Voc (Volt) [da 1° curva I(V)] | 4,19·10 ⁻¹ | 4,84·10 ⁻¹ | 4,73·10 ⁻¹ | 6,59·10 ⁻¹ |
| FF | 0,33 | 0,31 | 0,30 | 0,27 |
| Corrente massima (μA/cm²) [da cronoamperometria] | 147 | 273 | 331 | 377 |
| Corrente massima⁻¹ (cm²/μA) [da cronoamperometria] | 6,79·10 ⁻³ | 3,66·10 ⁻³ | 3,02·10 ⁻³ | 2,65·10 ⁻³ |

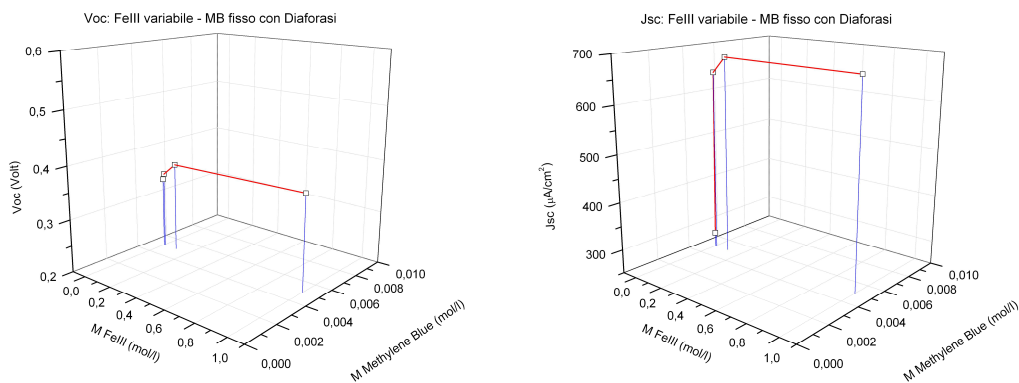


Figura 61: valori di Voc (sinistra) e Jsc (destra) al variare della concentrazione delle specie in soluzione.

Il valore di FF, legato all'efficienza della cella, resta costante per tutto lo spettro di concentrazioni indagate, ad eccezione del caso Fe(III) 10mM per la pila in assenza di enzima, e si attesta su valori più bassi nel caso in cui si operi in presenza di Diaforasi (Tabella 7, Tabella 8). Ciò può essere legato alla maggiore corrente erogata dalla pila che impiega l'enzima in soluzione, perciò, all'aumentare della corrente generata cala il valore di FF. I valori letti tuttavia sono molto inferiori rispetto a quelli registrati per la pila iodio/ferro, anche quando quest'ultima produce un'intensità di corrente superiore, e la causa di questo può essere ricercata nella nuova configurazione.

Dall'osservazione della Figura 62 e Figura 63, si nota la notevole spanciatura della curva I(V) e la conseguente perdita di potenza.

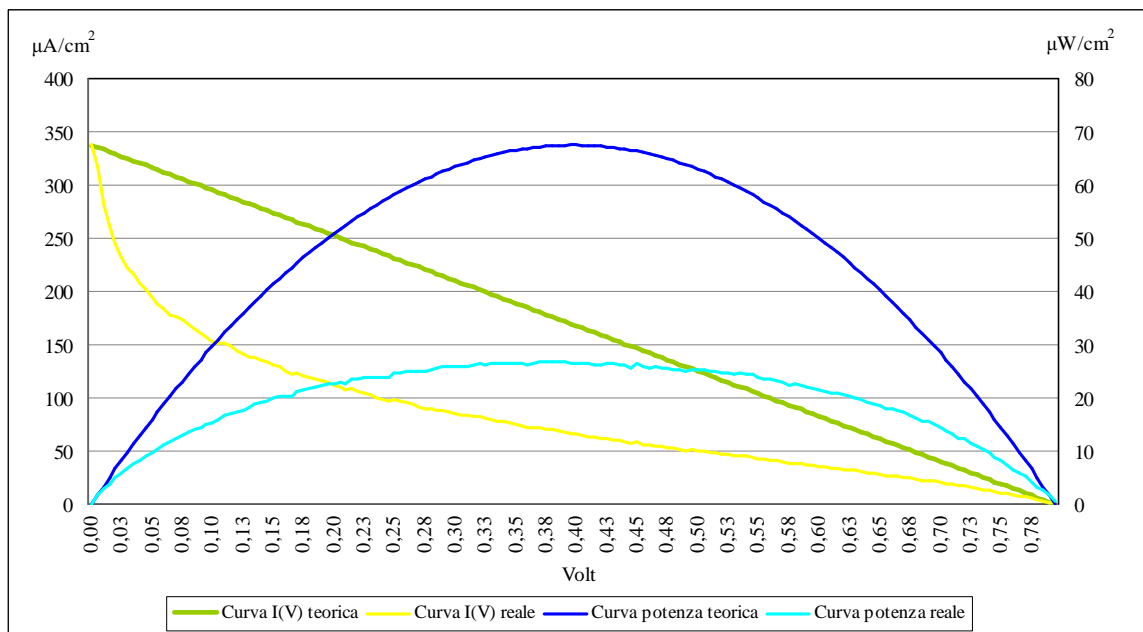


Figura 62: prima curva I(V) teorica (verde) e reale (giallo) e di potenza teorica (blu) e reale (azzurro) della pila NADH-Fe(III) con concentrazione di FeCl₃ 1M senza Diaforasi.

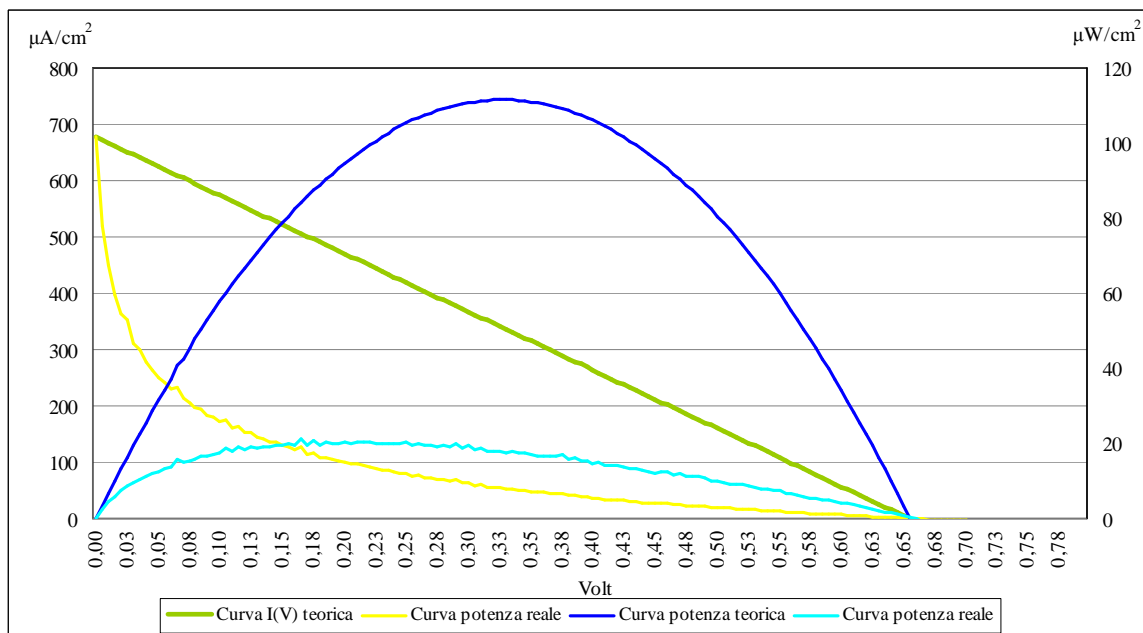


Figura 63: prima curva I(V) teorica (verde) e reale (giallo) e di potenza teorica (blu) e reale (azzurro) della pila NADH-Fe(III) con concentrazione di FeCl₃ 1M in presenza di Diaforasi.

Assumendo che la corrente massima misurata durante la cronoamperometria sia linearmente correlata alla velocità di reazione, procedendo come prima si graficano i valori ottenuti in funzione della concentrazione della specie variabile (Figura 64):

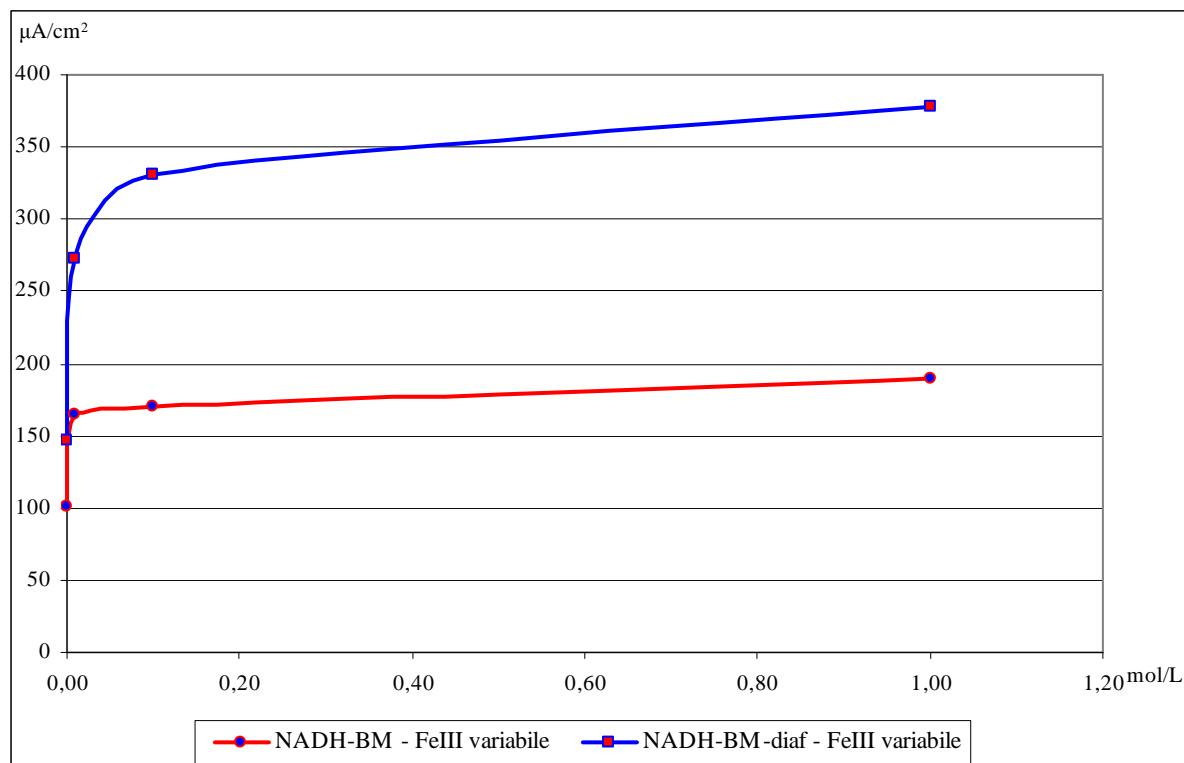


Figura 64: valori di corrente massima da cronoamperometria registrati al variare della concentrazione di FeCl_3 in soluzione.

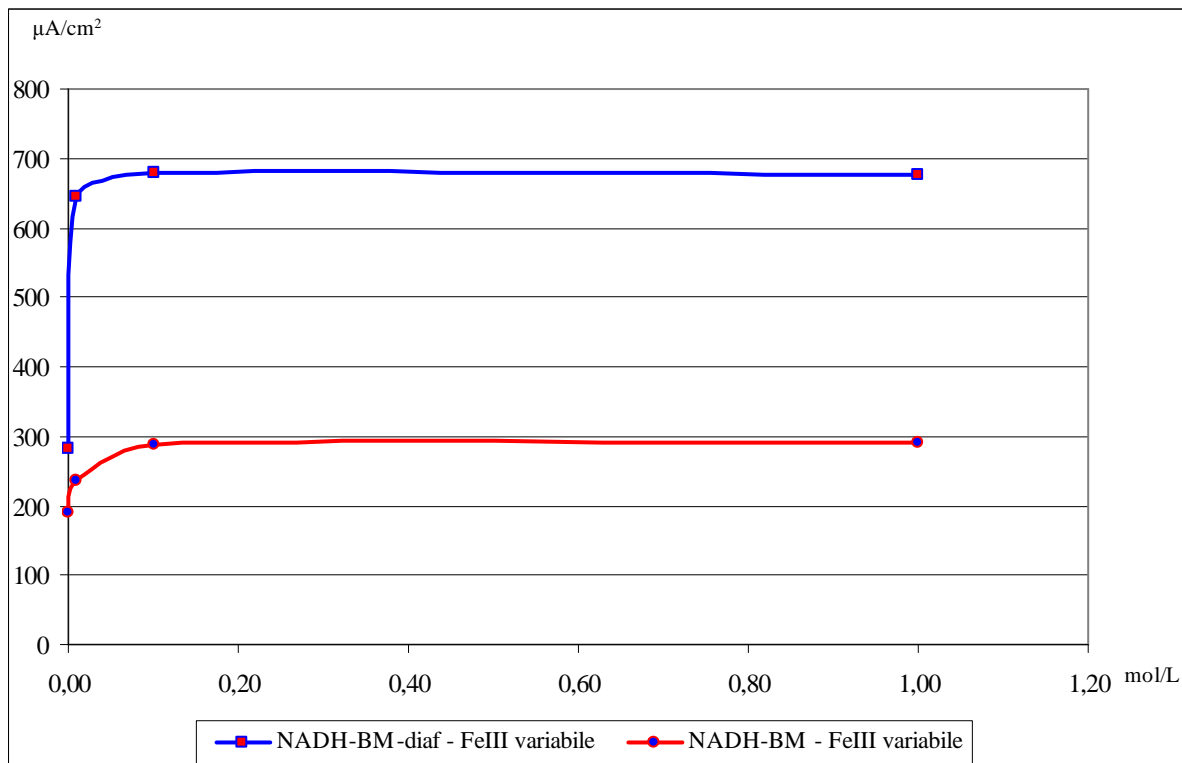


Figura 65: valori di J_{sc} registrati al variare della concentrazione di FeCl_3 in soluzione.

L'andamento iperbolico dell'intensità di corrente rispetto alla concentrazione delle specie chimiche in soluzione (Figura 64, Figura 65) è stato verificato attraverso la linearizzazione, utilizzando i doppi reciproci.

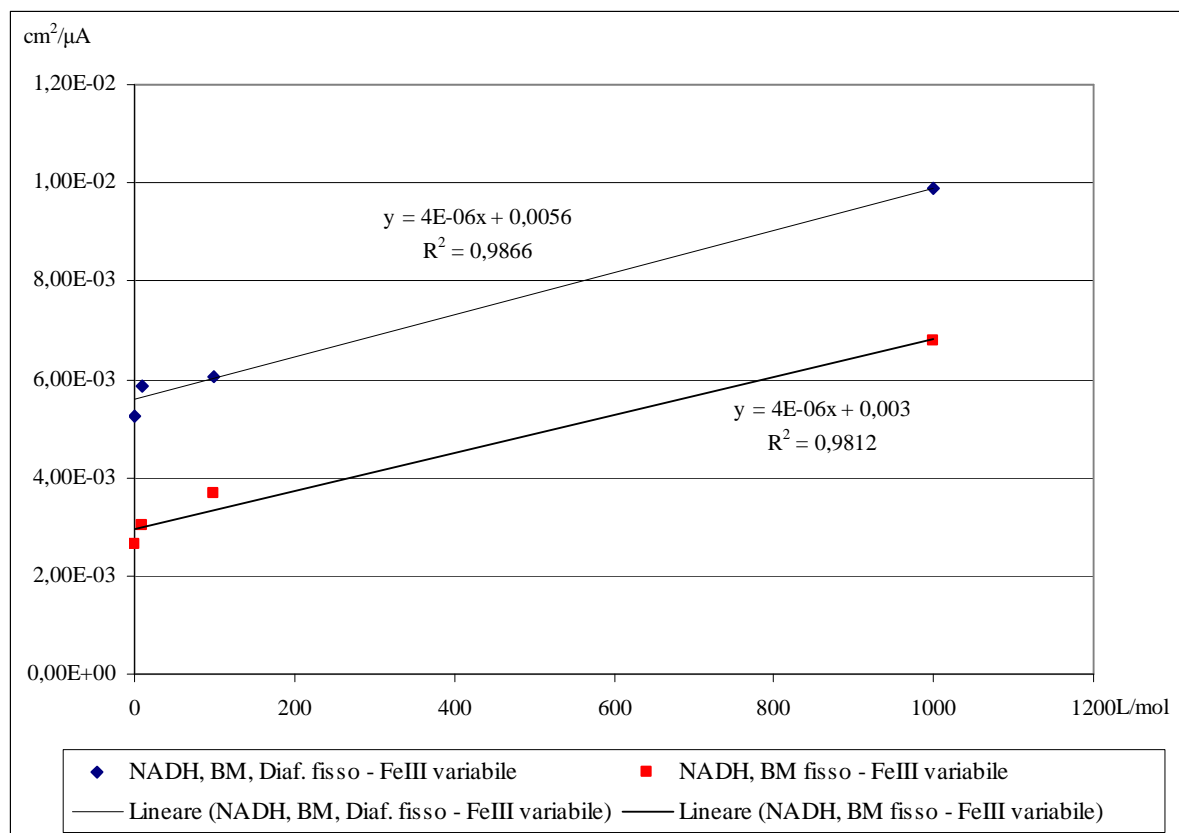


Figura 66: reciproco dei valori di corrente e concentrazione di FeCl₃ della pila NADH/FeCl₃ in concentrazione variabile, in presenza ed in assenza di enzima.

1. [NADH], [BM] fissa, [FeCl₃] variabile

Dalla linea di tendenza estrapolata dalla Figura 66 si ricava:

- $V = +179$;
- $K_m = +7,14 \times 10^{-4}$;
- $K_m/V = +4 \times 10^{-6}$.

2. [NADH], [BM], Diaforasi fissa, [FeCl₃] variabile

Dalla Figura 66 si ricavano i seguenti valori:

- $V = +333$;
- $K_m = +1,33 \times 10^{-3}$;
- $K_m/V = +4 \times 10^{-6}$.

Dai risultati ottenuti si nota che la velocità di reazione massima, in presenza di enzima, presenta un incremento di quasi il 200%. Tuttavia, i valori di FF indicano una scarsa efficienza della cella elettrochimica rispetto a quella iodio/ferro. Quest'ultima aveva messo in evidenza i limiti legati alla capacità dello ioduro di scambiare elettroni con la superficie dell'elettrodo probabilmente causata dalla sua bassa capacità di diffondere all'interfaccia. A parità di concentrazione delle specie chimiche, la cella NADH/ferro presenta dei valori di P_{max} e di intensità di corrente significativamente superiori a quelli riscontrati nella pila iodio/ferro. I valori di K_m , calcolati dalla linearizzazione dei doppi reciproci, coerentemente presentano una maggior affinità della specie BM ($1,33 \times 10^{-3}$) per lo scambio di elettroni con l'elettrodo rispetto a quanto messo in evidenza con lo ioduro ($5,45 \times 10^{-2}$). Per questo motivo si può ragionevolmente ipotizzare che il blu di metilene ridotto riduca il problema di regime diffusivo della specie chimica sulla superficie dell'elettrodo. Tuttavia, il confronto tra i valori di K_m in presenza ed in assenza di Diaforasi nella pila NADH/ferro suggerisce che all'aumentare dell'intensità di corrente nel circuito ci sia parallelamente una riduzione dell'affinità del BM per l'elettrodo. Sembra perciò ragionevole ipotizzare che un inferiore valore di corrente massima sia legato ad una scarsa capacità del BM di trasferire elettroni sulla superficie dell'elettrodo piuttosto che sulla sua capacità di migrare verso la superficie stessa.

4.6 Pila a biocombustibile alimentata a NADH/Aria

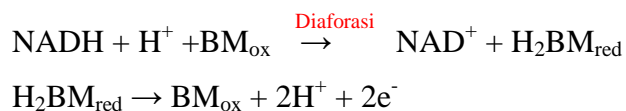
Nei capitoli precedenti si è studiato nel dettaglio il meccanismo delle reazioni di ossidoriduzione catalizzate da Diaforasi, caratterizzando il più possibile l'intero sistema di reazione ma concentrandosi principalmente sul compartimento anodico grazie alla possibilità di sviluppare compartimenti catodici standardizzati.

Si è quindi realizzata una cella a biocombustibile alimentata a NADH ed azoto, aria o ossigeno, per valutare l'influenza del compartimento catodico, e più precisamente del tipo di gas gorgogliato in soluzione, sull'intero sistema di reazione.

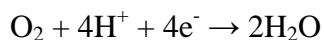
Nella seconda parte di questo esperimento si valuterà l'influenza della concentrazione di enzima in soluzione e la sua capacità di aumentare la concentrazione di BM ridotto nell'ambiente di reazione.

Le reazioni coinvolte nell'intero processo sono:

Anodo



Catodo



Si può perciò scrivere la reazione di ossidoriduzione completa:



Il potenziale teorico di riduzione delle due semireazioni è rispettivamente:

$$E^\circ = -0,320\text{V} \text{ per la coppia } \text{NAD}^+/\text{NADH};$$

$$E^\circ = +0,816\text{V} \text{ per la coppia } \text{O}_2\text{-H}^+/\text{H}_2\text{O} \text{ (a pH 7);}$$

$$E^\circ = +0,401\text{V} \text{ per la coppia } \text{O}_2\text{-H}_2\text{O}/\text{OH}^-.$$

Il potenziale teorico della cella completa che prevede la presenza in soluzione di tutte le specie in concentrazione 1M è perciò:

$$\Delta E^{\circ} = E^{\circ} (\text{O}_2\text{-H}^+/\text{H}_2\text{O}) - E^{\circ} (\text{NAD}^+/\text{NADH}) = +0,816\text{V} - (-0,320\text{V}) = +1,136 \text{ V}.$$

Tuttavia, come già accennato, per contattare elettricamente coenzima, o enzima, ed elettrodo, è necessario un mediatore di trasferimento elettronico, in questo caso il blu di metilene, caratterizzato dal proprio potenziale standard di riduzione:

$$E^{\circ} = +0,010\text{V} \text{ per la coppia } \text{BM}_{\text{ox}}/\text{BM}_{\text{red}}.$$

Varia di conseguenza il potenziale totale di cella, calcolato ora in funzione del mediatore e dell'ossigeno:

$$\Delta E^{\circ} = E^{\circ} (\text{O}_2\text{-H}^+/\text{H}_2\text{O}) - E^{\circ} (\text{BM}_{\text{ox}}/\text{BM}_{\text{red}}) = +0,816\text{V} - (+0,010\text{V}) = +0,806 \text{ V}.$$

La differenza di potenziale tra le due celle, con e senza mediatore, è notevole: +0,33V; la seguente relazione:

$$\Delta G = -n F E;$$

- n: numero di elettroni scambiati;
- F: costante di Faraday;
- E: differenza dei potenziali di riduzione standard delle due semireazioni;

permette il calcolo dell'energia totale generata dalla reazione tra NADH e ossigeno:

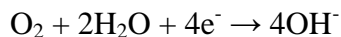
$$\Delta G = -219 \text{ kJ mol}^{-1};$$

rispetto all'energia generata dalla cella che opera in presenza di mediatore:

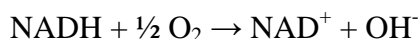
$$\Delta G = -155 \text{ kJ mol}^{-1};$$

La perdita di energia associata alla reazione tra NADH e Blu di Metilene è di circa il 30%, tuttavia, come già accennato, l'utilizzo del mediatore di carica è necessario per permettere lo scambio di elettroni tra NADH ed elettrodo.

La semireazione di riduzione dell'ossigeno scritta sopra è la reazione che si desidera sviluppare nella cella ed è la classica riduzione che si svolge nelle celle a combustibile alimentate ad ossigeno ed idrogeno, tuttavia possono svolgersi altre reazioni di riduzione coinvolgenti l'ossigeno e date le condizioni in cui si lavora (aria o O₂ gorgogliati in H₂O), molto probabilmente si assisterà allo svolgimento, anche, della seguente reazione:



Varia conseguentemente la reazione globale di ossidoriduzione:



Viste le molteplici reazioni che possono portare alla riduzione dell'ossigeno, è possibile che si leggano valori di potenziale anche molto diversi da quelli attesi, bisogna tenere presente però che il comparto catodico della biofuel cell che si intende costruire è già stato ampiamente caratterizzato ed ottimizzato per le applicazioni sulle celle a combustibile.

1. Come prima analisi si decide di eseguire una sorta di linea di base delle misurazioni elettrochimiche: nella prima misurazione infatti si decide di non inserire né il NADH né la Diaforasi nel compartimento catodico, creando perciò una pila alimentata a blu di metilene in forma ossidata come soluzione anodica, in cui viene fatto gorgogliare N₂, e tampone fosfato come soluzione catodica, e anche qui si gorgoglia N₂. Come ci si aspettava, una volta collegata questa pila al SourceMeter e registrata la prima curva I(V), non si registra alcun passaggio di corrente, non è infatti presente nel compartimento anodico alcuna specie capace di ossidarsi e alimentare con un flusso di elettroni il circuito.

2. In seconda battuta si decide di costruire una nuova pila, configurata esattamente come la precedente, ma che alimenta aria nel comparto catodico. Di nuovo, non si osserva durante la registrazione delle curve I(V) alcun passaggio di corrente, fenomeno sempre legato all'assenza di un componente riducente.

3. Giunti a questo punto, vista l'effettiva assenza di corrente per la mancanza di una specie capace di ridurre l'ossigeno disciolto in acqua, si decide di inserire nell'ambiente di reazione il NADH, che viene aggiunto alla soluzione anodica. Si valuta il contributo rispettivamente di aria, O₂ ed N₂, alla corrente generata dalla pila, se questi ultimi vengono fatti gorgogliare nel compartimento catodico, mantenendo costante la concentrazione di NADH.

Curve N₂-N₂ (Figura 67):

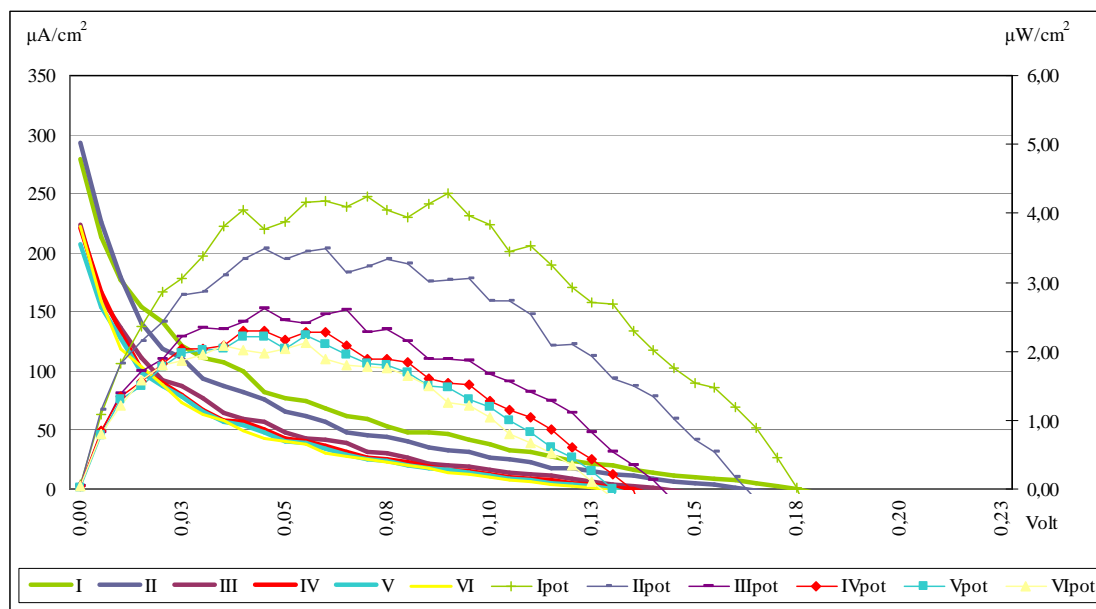


Figura 67: valori di corrente e potenza registrati in funzione del potenziale nelle sei curve I(V) della pila NADH/N₂.

Curve N₂-Aria (Figura 68):

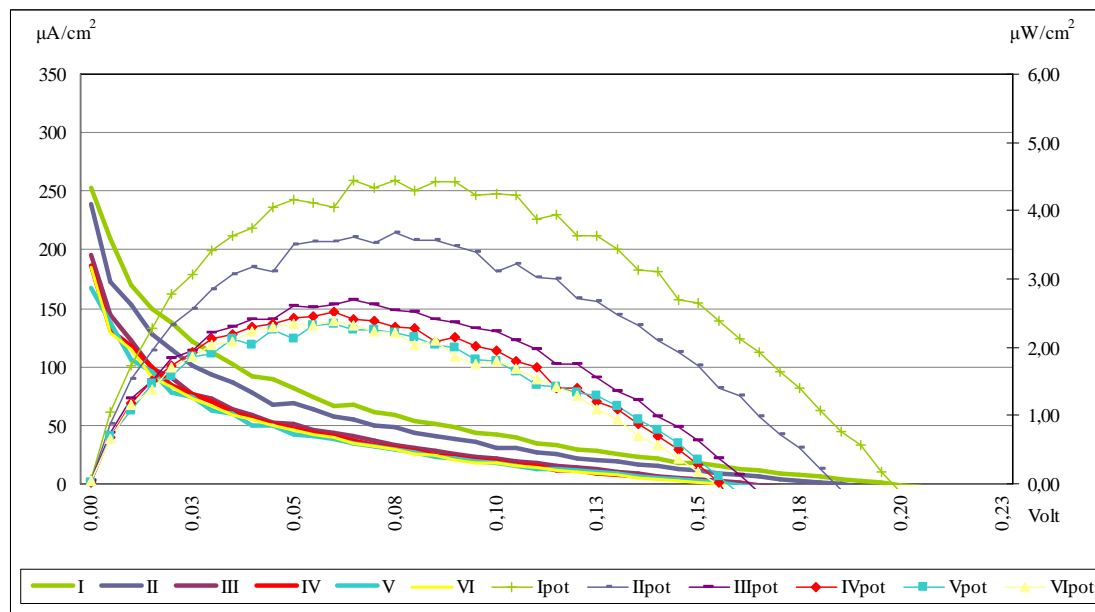


Figura 68: valori di corrente e potenza registrati in funzione del potenziale nelle sei curve I(V) della pila NADH/Aria.

Curve N₂-O₂ (Figura 69)

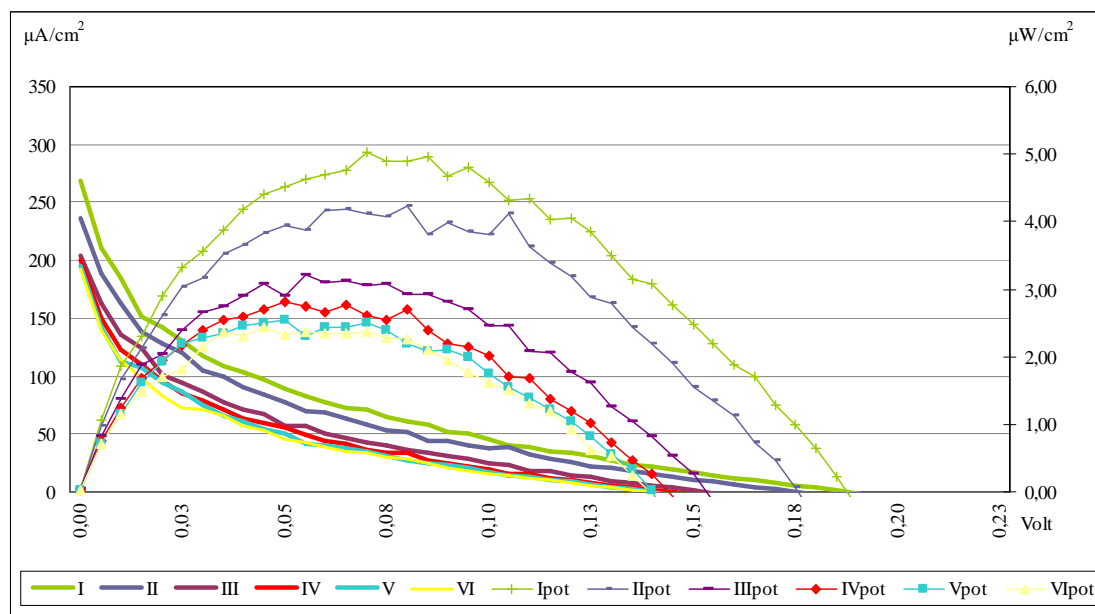


Figura 69: valori di corrente e potenza registrati in funzione del potenziale nelle sei curve I(V) della pila NADH/O₂.

Al termine della registrazione delle sei curve si esegue per ogni esperimento una cronoamperometria, nella Figura 70 se ne riportano i risultati:

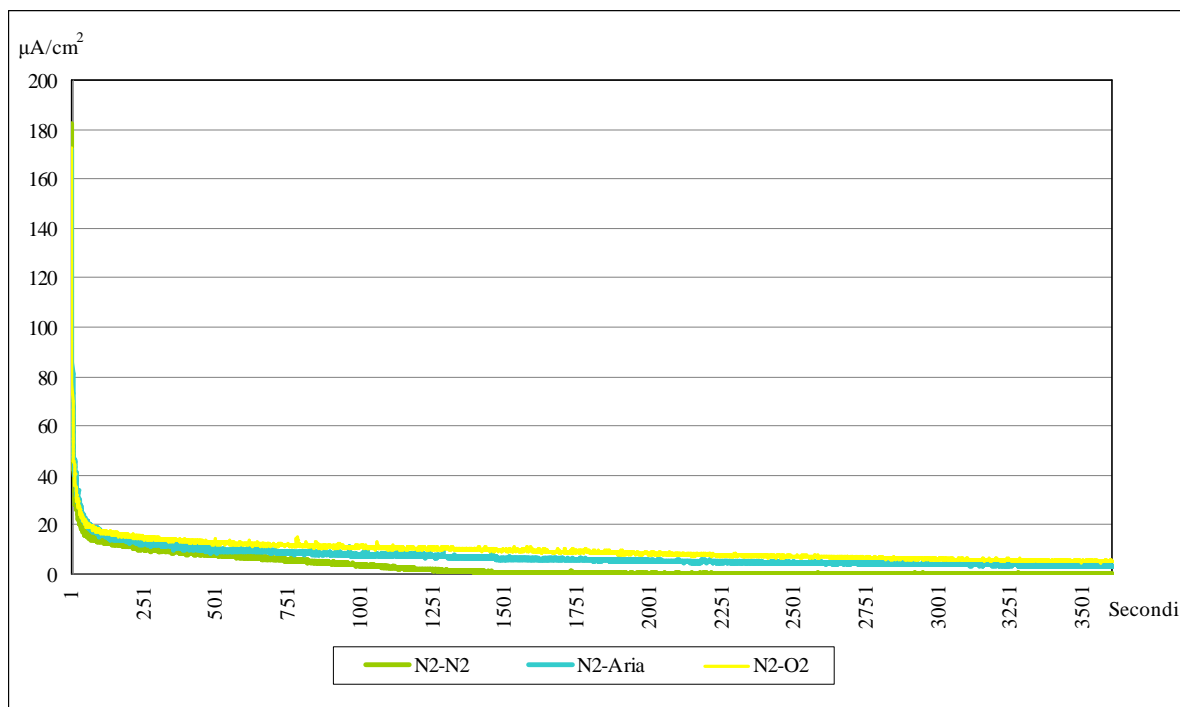


Figura 70: valori di densità di corrente registrati durante le cronoamperometrie in funzione del tempo.

Tutti i valori ottenuti sono riassunti in

Tabella 9:

Tabella 9: parametri sperimentali della pila NADH/N₂, aria, O₂.

| | | | |
|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Temperatura (°C) | 25-30 | | |
| Volume soluzione (ml) | 2,50 | | |
| Molarità NADH (mmol/l) | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Molarità BM (mmol/l) | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Contenuto Diaforasi (U/ml) | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Alimentazione anodo | N ₂ | N ₂ | N ₂ |
| Alimentazione catodo | N ₂ | Aria | O ₂ |
| Pmax (μW/cm ²) [media da 6 curve I(V)] | 2,80±0,85 | 3,31±1,07 | 3,00±0,85 |
| Pmax (μW/cm ²) [da 1° curva I(V)] | 4,18 | 5,02 | 4,45 |
| Jsc (μA/cm ²) [media 6 curve I(V)] | (2,41±0,36)·10 ² | (2,36±0,36)·10 ² | (2,04±0,34)·10 ² |
| Voc (Volt) [media da 6 curve I(V)] | (1,45±0,21)·10 ⁻¹ | (1,57±0,21)·10 ⁻¹ | (1,69±0,18)·10 ⁻¹ |
| FF | 0,31 | 0,38 | 0,34 |
| Corrente massima (μA/cm ²) [da cronoamperometria] | 182 | 172 | 173 |
| Corrente di plateau (μA/cm ²) [da cronoamperometria] | 0,150 | 3,198 | 5,247 |

Dai risultati ottenuti si evince che il gas che viene gorgogliato nel comparto catodico non influenza in nessun modo le grandezze ricavate dalle curve I(V) e i valori di corrente massima da cronoamperometria. Questo fattore può essere legato alla presenza di O₂ in soluzione, la cui concentrazione non è influenzata dal gas che si alimenta, cioè, l’N₂ non è capace di strappare completamente l’O₂ in soluzione e la quantità che rimane è sufficiente per non osservare alcun cambiamento nel primo punto della cronoamperometria. Discorso analogo può essere fatto nei casi in cui si è alimentata aria o O₂: la quantità di O₂ disciolto in acqua è tale da non essere minimamente influenzata dalla natura del gas alimentato nel compartimento. Questa ipotesi è suffragata da i valori di corrente a plateau (media ultimi 10 pti delle cronoamperometrie) letti durante le analisi, questi ultimi, infatti, sembrano fortemente influenzati dal tipo di corrente gassosa alimentata, così, per N₂, il valore di corrente è circa venti volte inferiore rispetto al valore letto nel caso si alimenti aria e trentacinque volte meno il valore per O₂.

Come ulteriore esperimento si studia la risposta della pila nel caso in cui si inserisca anche Diaforasi libera in soluzione a concentrazioni variabili eseguendo lo stesso tipo di analisi sviluppate prima.

1. Diaforasi 1U/ml

Le curve I(V) e di potenza registrate sono rappresentate nella Figura 71. Durante questo esperimento non si osserva alcun cambiamento nella tonalità di blu della soluzione: il blu di metilene ossidato è ancora in largo eccesso.

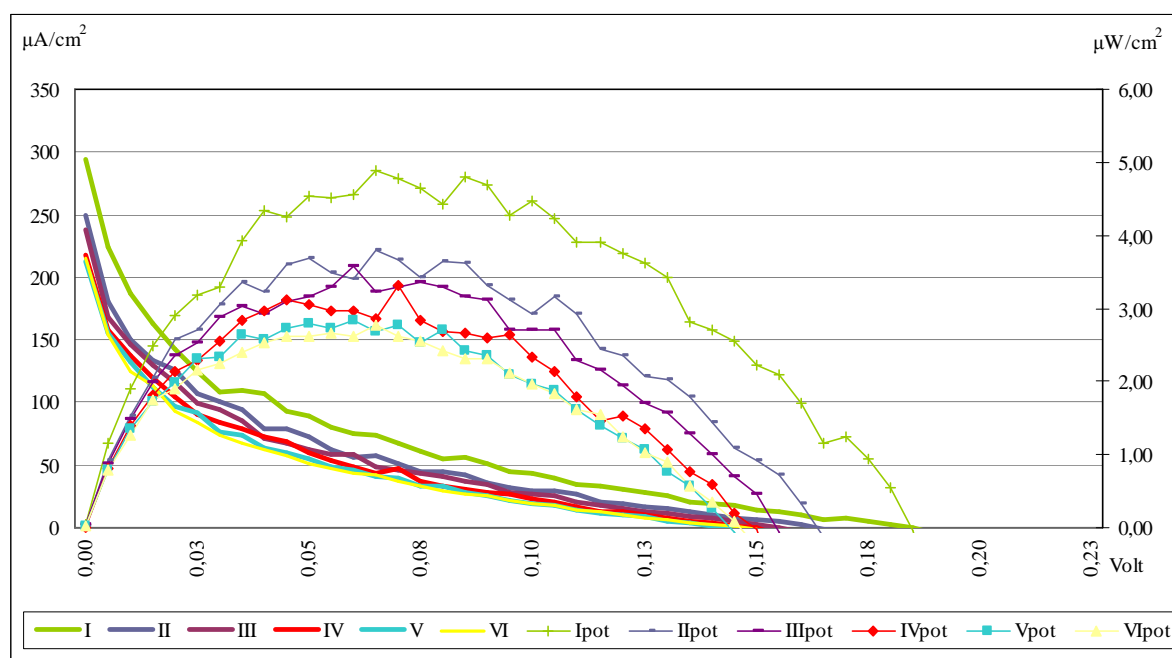


Figura 71: valori di corrente e potenza in funzione del potenziale registrati nelle sei curve I(V) della pila NADH/aria in presenza di Diaforasi 1U/ml.

2. Diaforasi 10U/ml

Aggiungendo una maggior quantità di enzima in soluzione rispetto al caso precedente, come in questo caso, si osserva effettivamente una parziale decolorazione della soluzione che mantiene però il suo spiccato colore blu intenso, anche durante la registrazione delle curve I(V) (Figura 72) e della cronoamperometria. Al termine di quest'ultima la soluzione è nuovamente blu intenso, come la soluzione di partenza.

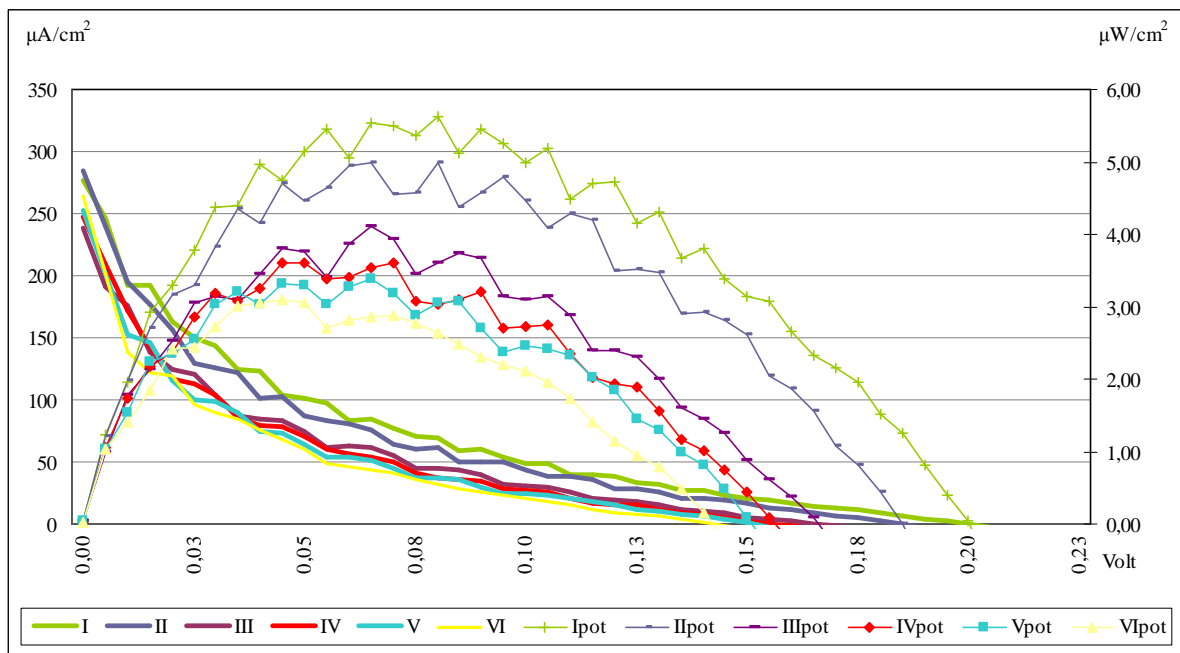


Figura 72: valori di corrente e potenza in funzione del potenziale registrati nelle sei curve I(V) della pila NADH/aria in presenza di Diaforasi 10U/ml.

La Figura 73 riporta i risultati delle cronoamperometrie:

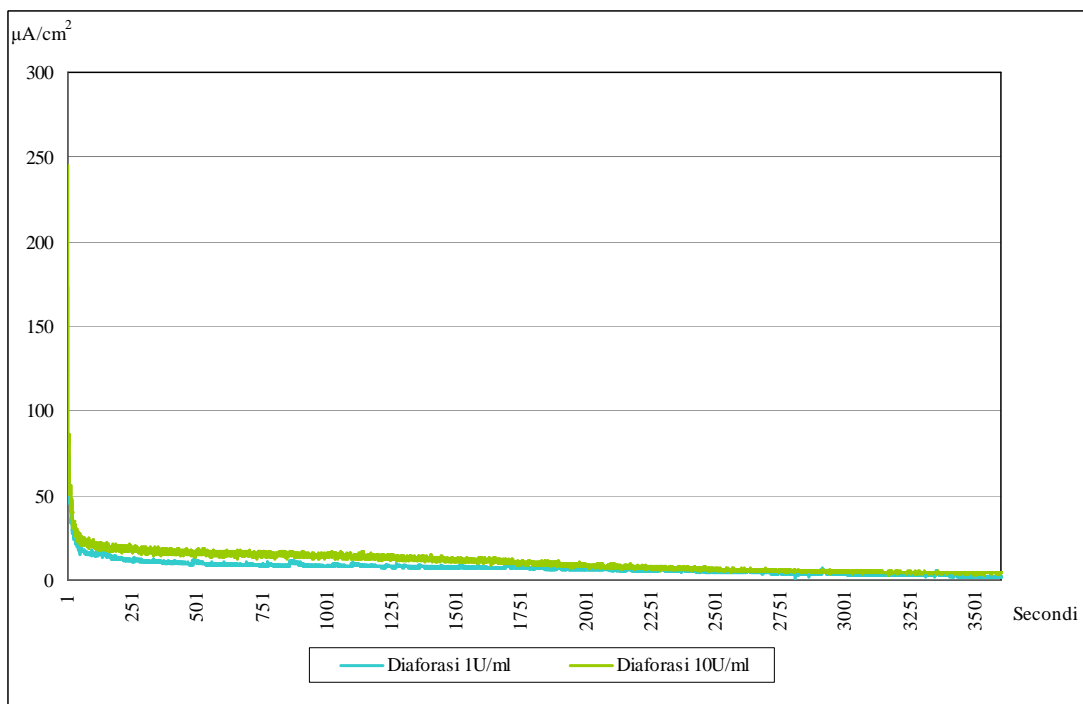


Figura 73: valori di densità di corrente registrati durante le cronoamperometrie in funzione del tempo.

In Tabella 10 sono riassunti i risultati ottenuti:

Tabella 10: parametri sperimentali della pila NADH/aria in funzione della concentrazione di Diaforasi.

| | | |
|--|------------------------------|------------------------------|
| Temperatura (°C) | 25-30 | |
| Volume soluzione (ml) | 2,5 | |
| Molarità NADH (mmol/l) | 5,00 | 5,00 |
| Molarità BM (mmol/l) | 5,00 | 5,00 |
| Contenuto Diaforasi (U/ml) | 1,00 | 10,0 |
| Alimentazione anodo | N ₂ | N ₂ |
| Alimentazione catodo | Aria | Aria |
| Pmax (μW/cm ²) [media da 6 curve I(V)] | 3,48±0,81 | 4,06±0,99 |
| Pmax (μW/cm ²) [da 1° curva I(V)] | 4,89 | 5,45 |
| Jsc (μA/cm ²) [media da 6 curve I(V)] | (2,38±0,31)·10 ² | (2,61±0,18)·10 ² |
| Voc (Volt) [media da 6 curve I(V)] | (1,56±0,15)·10 ⁻¹ | (1,69±0,23)·10 ⁻¹ |
| FF | 0,37 | 0,37 |
| Corrente massima (μA/cm ²) [da cronoamperometria] | 1,73·10 ² | 2,45·10 ² |
| Corrente di plateau (μA/cm ²) [da cronoamperometria] | 2,02 | 4,25 |

A seguito dell'utilizzo di Diaforasi libera in soluzione si osserva uno spiccato aumento della maggior parte dei parametri caratteristici della pila rispetto al caso in cui non si impieghi enzima

(

Tabella 9, Tabella 10). L'incremento di J_{SC} tuttavia non è affatto elevato e sicuramente non è paragonabile all'incremento osservato nella pila NADH/Ferro (Tabella 8).

Il valore di corrente massima da cronoamperometria non risente minimamente dell'aggiunta di Diaforasi quando questa è presente in concentrazione 1U/ml, ma l'incremento è del 70% nel caso in cui si impieghi enzima 10U/ml, rispetto alla pila senza catalizzatore. Tale valore è molto inferiore rispetto all'aumento del 200% osservato nella pila NADH/Ferro. Questa notevole differenza, avendo mantenuto inalterato il comparto anodico, va ricercata nella fase di riduzione dell'ossigeno in soluzione. Principalmente la diminuzione delle performance della pila può essere legata o alla bassa concentrazione di ossigeno in soluzione disponibile ad interagire con l'elettrodo e ridursi, o alla scarsa capacità di quest'ultimo di interagire con la superficie elettrodica.

I valori di FF, si confermano ancora una volta molto bassi, ma è difficile attribuire questa considerazione ad uno specifico comparto o fenomeno. Tuttavia, la drastica diminuzione di questi valori si è osservata da quando si sono costruite pile miniaturizzate, perciò potrebbe essere legata ad una non ottimale geometria di cella.

4.7 Pila a biocombustibile alimentata a NADH/Ossigeno

In ultima analisi si è valutata la possibilità di realizzare una cella elettrochimica alimentata a BM_{red} ed ossigeno, capace di biomimare il processo metabolico conosciuto come fosforilazione ossidativa. Durante questa fase della respirazione cellulare il NADH viene ripristinato a NAD^+ attraverso una catena di trasporto degli elettroni guidata da reazioni ossido riduttive consecutive, mediate da trasportatori di carica, che termina con l'ossigeno quale accettore finale di elettroni.

Tale reazione è in grado di generare una quantità notevole di energia che il processo accumula sotto forma di ATP. Lo scopo di questa esperienza è quella di verificare se è possibile recuperare tale energia come fonte di energia elettrica.

Si è quindi realizzato una cella a biocombustibile alimentata a NADH e ossigeno, le reazioni coinvolte sono le stesse viste per la pila NADH/Aria.

I bassi valori di FF ottenuti per tutte le pile miniaturizzate hanno suggerito di tornare alla configurazione di cella iniziale, la stessa della pila zinco/rame e iodio/ferro. L'aumento del volume dei due comparti comporterebbe un massiccio impiego di reagenti, di conseguenza si variano le concentrazioni delle specie chimiche in soluzione, per evitare un eccessivo consumo di materiali costosi.

Si costruisce una pila che preveda la possibilità di svolgere nella semicella anodica la reazione di riduzione del blu di metilene, seguita poi dal trasferimento dei due elettroni del mediatore all'elettrodo. Si cerca poi di forzare il flusso di elettroni su un circuito esterno collegato allo strumento di misura per poi inviarli nella semicella catodica dove viene ridotto l'ossigeno gorgogliato in soluzione.

In questa fase si indaga il comportamento della pila al variare del tipo di elettrodo utilizzato, i parametri che verranno valutati saranno V_{OC} , J_{SC} e P_{max} .

La pila viene caratterizzata attraverso cinque curve corrente/tensione, o un numero tale da osservare una stabilizzazione nel comportamento della pila.

Si applica alla cella, per tutte le prove sviluppate, un potenziale variabile tra -0,1 e 0,6 Volt registrando la corrente in funzione del potenziale imposto dallo strumento.

Tra la prima e la quinta misurazione la soluzione mantiene il suo colore azzurro intenso.

La Diaforasi viene inserita appena si conclude il primo ciclo di misure e subito si registrano altre cinque curve, l'obiettivo è scaricare completamente il NADH presente in soluzione. A seguito dell'aggiunta del catalizzatore enzimatico si osserva la progressiva decolorazione della soluzione, per tutti gli elettrodi impiegati, tuttavia, nell'esperimento che impiega grafite, la perdita di colore è meno intensa e la soluzione di reazione mantiene la sua spiccata colorazione azzurra. La decolorazione della soluzione si sviluppa anche durante la registrazione delle curve I(V) e la trasparenza perdura per un periodo di tempo che è funzione dell'elettrodo utilizzato e della corrente generata.

Elettrodi di Alluminio (8 cm² superficie):

La pila viene sottoposta alla registrazione di cinque curve I(V) (Figura 74):

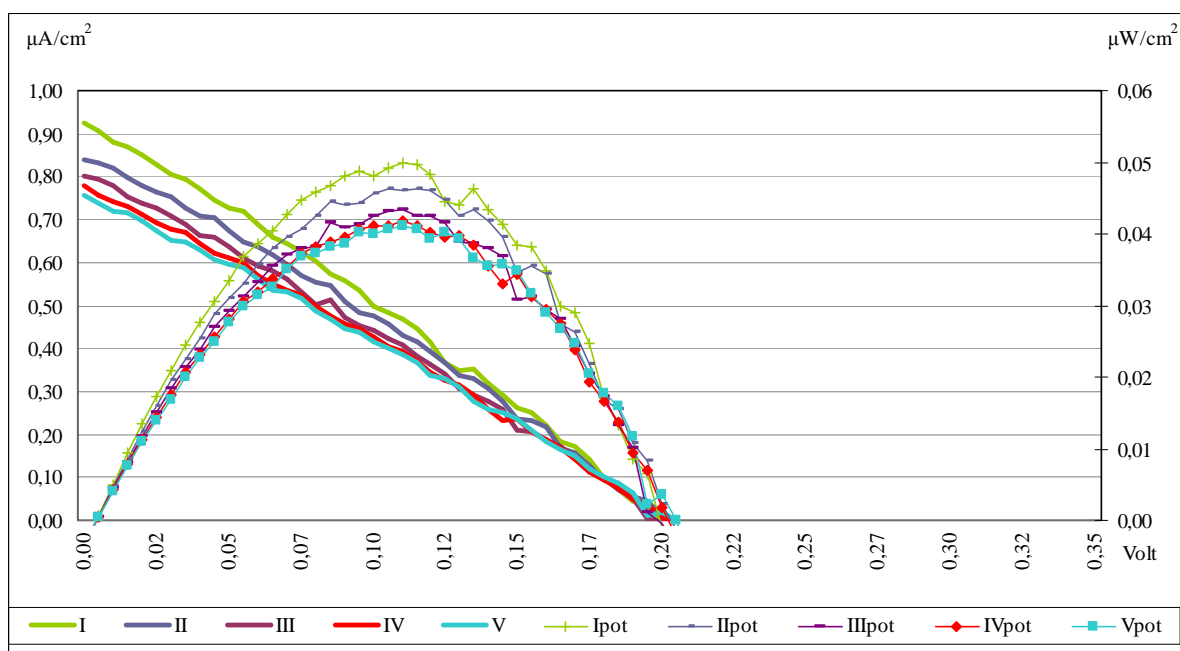


Figura 74: valori di corrente e potenza in funzione del potenziale registrati nelle cinque curve I(V) della pila NADH/ossigeno con elettrodi di alluminio.

Attraverso l'analisi delle curve registrate (Figura 74) si ricavano i parametri caratteristici con cui caratterizzare la pila (Tabella 11):

Tabella 11: parametri sperimentali della pila NADH/ossigeno con elettrodi di alluminio.

| | Isc (μA) | Jsc ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) | Voc (Volt) | Pmax (μW) | Pmax ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) | FF |
|--------------|------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|---|-------------|
| I | 7,24 | 0,905 | 0,192 | 0,400 | 0,050 | 1,15 |
| II | 6,67 | 0,833 | 0,197 | 0,370 | 0,046 | 1,13 |
| III | 6,36 | 0,795 | 0,192 | 0,347 | 0,043 | 1,14 |
| IV | 6,06 | 0,757 | 0,197 | 0,335 | 0,042 | 1,12 |
| V | 6,06 | 0,758 | 0,202 | 0,329 | 0,041 | 1,07 |
| Media | (6,48±0,50) | (8,10±0,62)·10⁻¹ | (1,97±0,04)·10⁻¹ | (3,56±0,29)·10⁻¹ | (4,45±0,36)·10⁻² | 1,12 |

Terminato il primo ciclo di misurazioni si aggiunge la Diaforasi e si registrano altre cinque curve corrente/tensione (Figura 75).

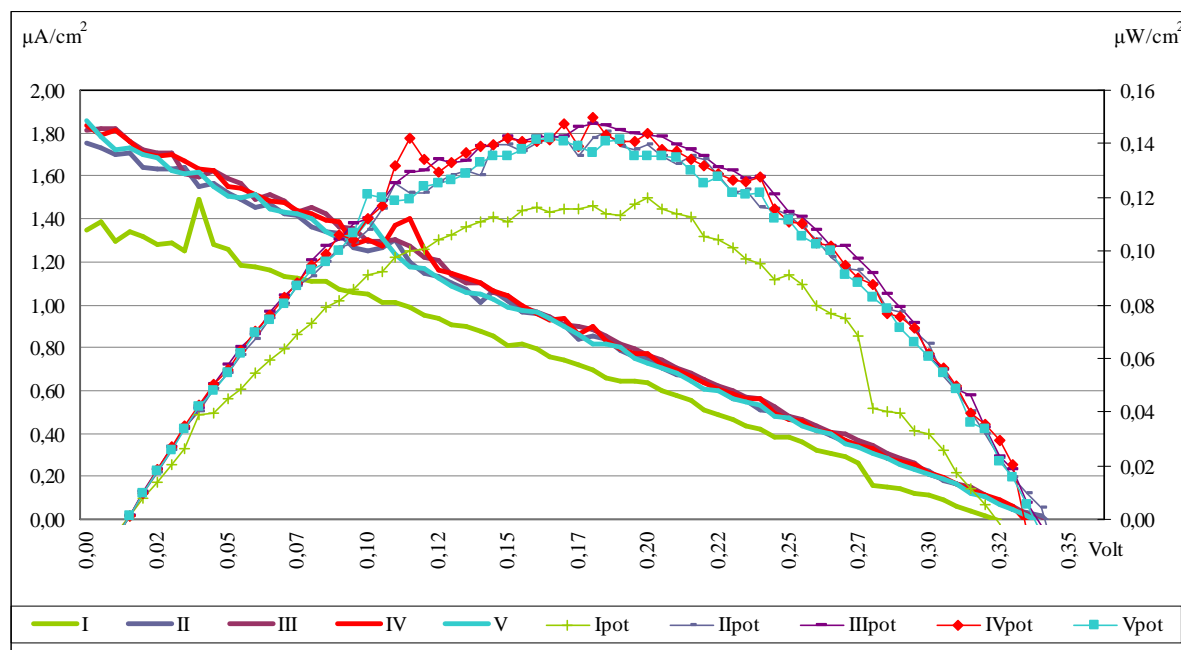


Figura 75: valori di corrente e potenza in funzione del potenziale registrati nelle cinque curve I(V) della pila NADH/ossigeno in presenza di Diaforasi con elettrodi di alluminio.

Dalle curve ottenute (Figura 75) si ricavano i seguenti parametri:

Tabella 12: parametri sperimentali della pila NADH/ossigeno in presenza di Diaforasi con elettrodi di alluminio.

| | Isc (μA) | Jsc ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) | Voc (volt) | Pmax (μW) | Pmax ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) | FF |
|--------------|------------------------------|--|---------------------------------|-------------------------------|---|-------------|
| I | 10,7 | 1,34 | 0,308 | 0,958 | 0,120 | 1,16 |
| II | 13,7 | 1,71 | 0,328 | 1,155 | 0,144 | 1,03 |
| III | 14,1 | 1,76 | 0,323 | 1,180 | 0,147 | 1,04 |
| IV | 14,1 | 1,76 | 0,318 | 1,147 | 0,143 | 1,02 |
| V | 13,8 | 1,73 | 0,323 | 1,136 | 0,142 | 1,02 |
| Media | $(1,33 \pm 0,14) \cdot 10^1$ | $1,66 \pm 0,18$ | $(3,21 \pm 0,06) \cdot 10^{-1}$ | $1,12 \pm 0,09$ | $(1,39 \pm 0,11) \cdot 10^{-1}$ | 1,05 |

Dalla lettura dei risultati di Tabella 11 e

Tabella 12 si nota come i valori di FF calcolati si attestino sempre su valori superiori ad uno, la cella sembra quindi particolarmente efficiente.

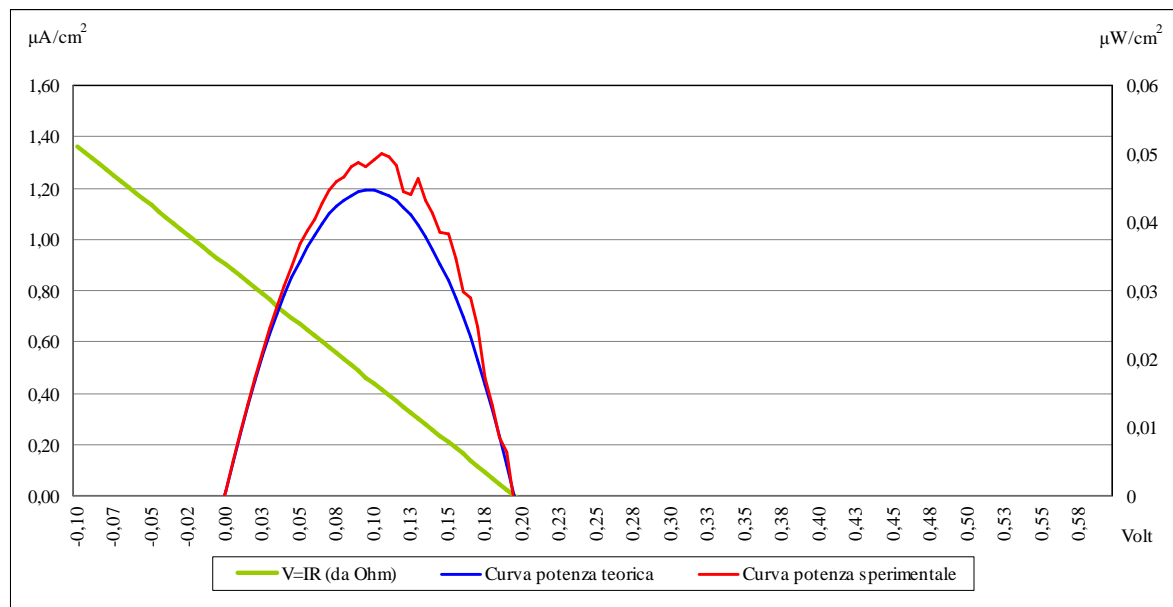


Figura 76: curve di efficienza teorica (blu), sperimentale (rossa), e della retta derivante dall'applicazione della legge di Ohm alla prima curva I(V) della pila NADH/ossigeno con elettrodi di alluminio.

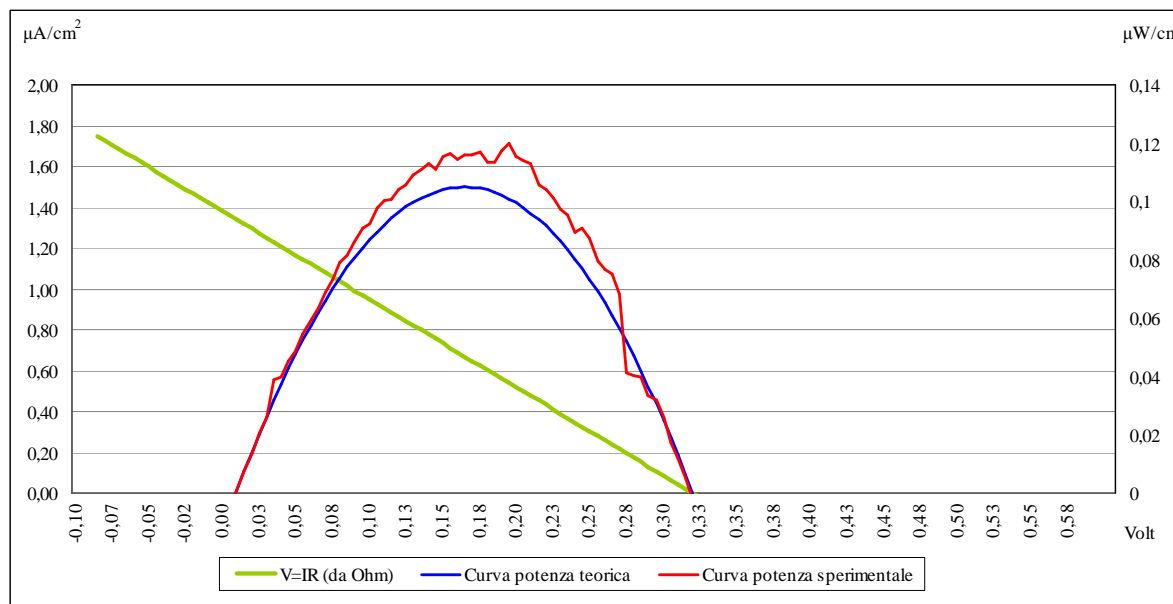


Figura 77: curve di efficienza teorica (blu), sperimentale (rossa), e della retta derivante dall'applicazione della legge di Ohm alla prima curva I(V) della pila NADH/ossigeno in presenza di Diaforasi con elettrodi di alluminio.

Il FF rappresenta l'efficienza del dispositivo per cui risulta impossibile ottenere un'efficienza superiore all'unità (Figura 76, Figura 77). La causa principale di questo errore è probabilmente legata ai parametri utilizzati per il calcolo del FF: come estremi per il calcolo della potenza generata P_G si prendono i valori di V_{OC} ed I_{SC} letti sperimentalmente, tuttavia, come già detto, è possibile che i valori letti si attestino su valori anche molto differenti dai valori teorici di f.e.m. ed I_{SC} , ma il calcolo esatto di questi ultimi risulta impossibile a causa dei diversi fattori che contribuiscono alla loro formulazione.

Dalla forma della curva $I(V)$ si nota immediatamente che parte della funzione si posiziona al di sopra della retta teorica data dalla legge di Ohm: questo causa, nel calcolo del rapporto tra le aree, l'ottenimento di valori superiori ad 1.

Tale andamento pare tipico di un circuito avente in parallelo un dispositivo unidirezionale di accumulo come un diodo come si evidenzia dalla diversa convessità delle curve $I(V)$ (Figura 74, Figura 75).

Terminate le misurazioni col SourceMeter si indaga il comportamento della fuel cell con il tester eseguendo a diversi intervalli di tempo misurazioni di I_{sc} e V_{oc} fino alla completa scarica della pila (Tabella 13, Figura 78). Il tempo di vita della cella al quale la corrente si dimezza rispetto a quella iniziale è di circa 25 minuti.

Tabella 13: valori di V_{oc} ed I_{sc} registrati in funzione del tempo.

| Tempo (minuti) | V_{oc} (Volt) | I_{sc} (μA) | $V_{oc} * I_{sc}$ (μW) |
|-----------------------|-----------------------------------|---|--|
| 0 | 0,31 | 11,40 | 3,57 |
| 10 | 0,24 | 8,50 | 2,04 |
| 20 | 0,19 | 6,20 | 1,17 |
| 30 | 0,15 | 4,50 | 0,66 |
| 180 | 0,05 | 1,10 | 0,05 |
| 240 | 0,03 | 0,50 | 0,01 |
| 300 | -0,01 | -0,10 | 0,00 |

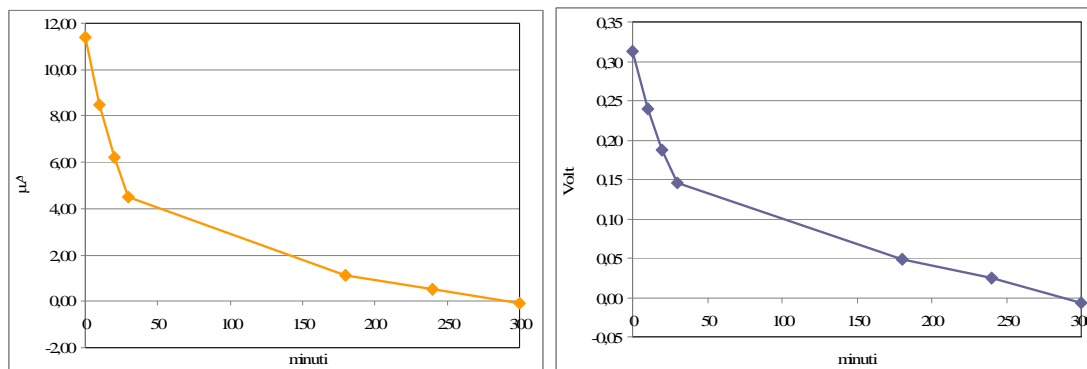


Figura 78: valori di Voc (destra) ed Isc (sinistra) registrati in funzione del tempo.

Elettrodi di platino (1,9 cm² superficie):

Le misurazioni eseguite con questi elettrodi, nel caso delle prove realizzate in assenza di Diaforasi, mostrano un segnale estremamente disturbato e di difficile interpretazione (Figura 79), si riportano le curve ma è inutile riportare i risultati di I_{SC}, V_{OC} o P_{max} in quanto illeggibili.

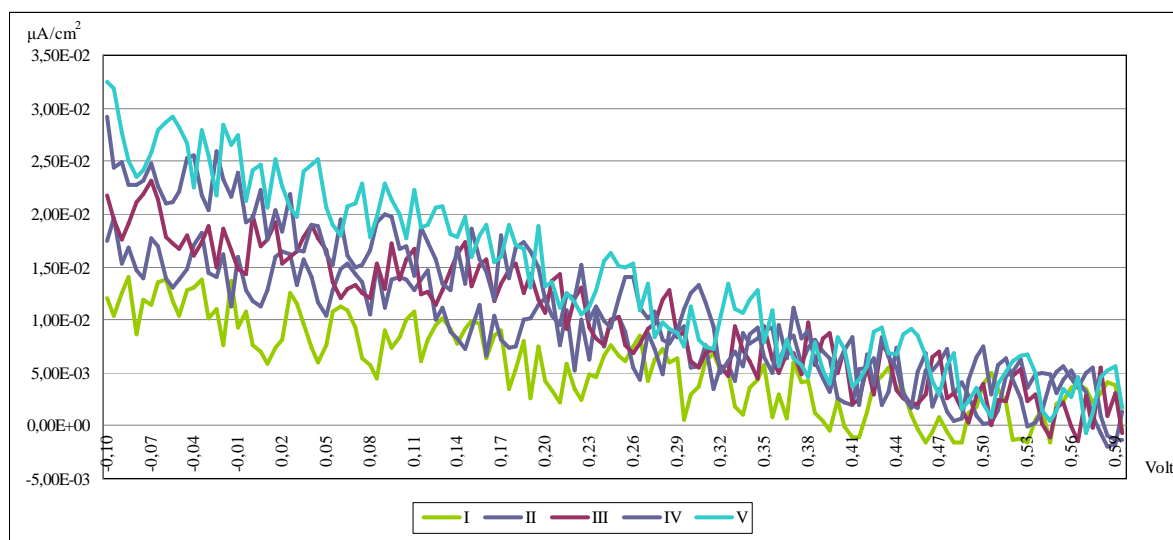


Figura 79: valori di corrente in funzione del potenziale registrati nelle cinque curve I(V) della pila NADH/ossigeno con elettrodi di platino.

A seguito dell'aggiunta di Diaforasi, invece, la corrente generata dalla cella subisce un notevole incremento e, nonostante i valori restino parecchio disturbati, si riescono ad estrapolare i dati per caratterizzare la cella (Figura 80):

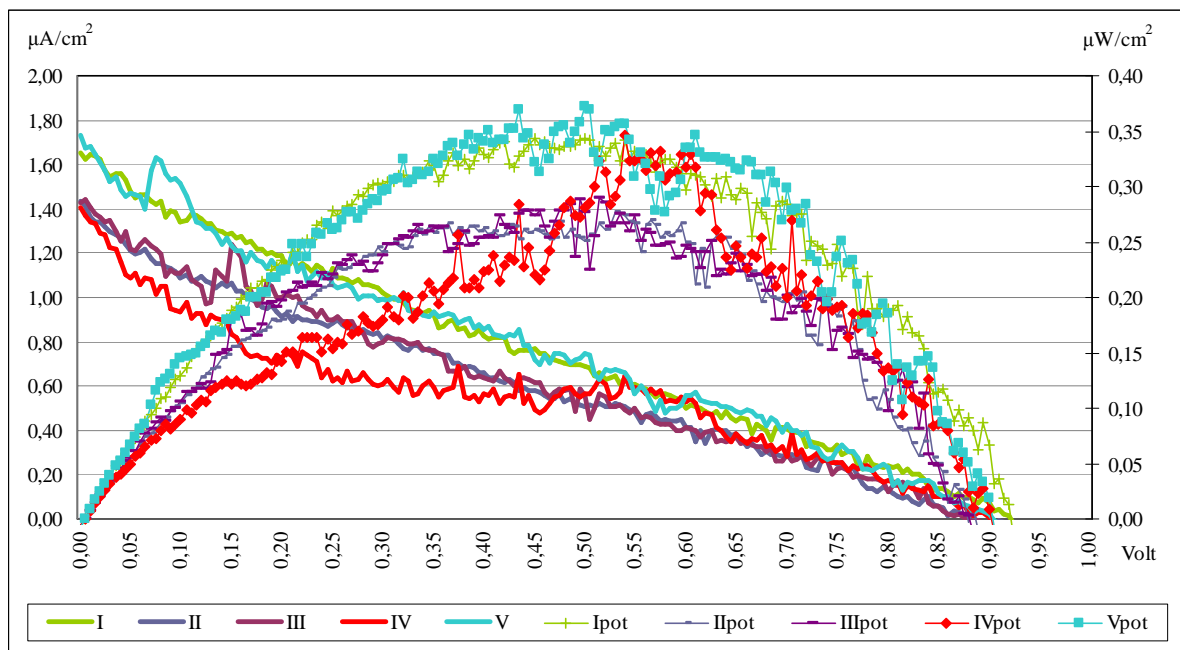


Figura 80: valori di corrente e potenza in funzione del potenziale registrati nelle cinque curve I(V) della pila NADH/ossigeno in presenza di Diaforasi con elettrodi di platino.

La Tabella 14 mostra i risultati ottenuti:

Tabella 14: parametri sperimentali della pila NADH/ossigeno in presenza di Diaforasi con elettrodi di platino.

| | Isc (μA) | Jsc ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) | Voc (Volt) | Pmax (μW) | Pmax ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) | FF |
|--------------|------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|---|-------------|
| I | 3,09 | 1,62 | 0,919 | 0,649 | 0,342 | 0,92 |
| II | 2,69 | 1,41 | 0,874 | 0,496 | 0,261 | 0,84 |
| III | 2,74 | 1,44 | 0,879 | 0,541 | 0,284 | 0,90 |
| IV | 2,60 | 1,37 | 0,899 | 0,535 | 0,282 | 0,91 |
| V | 3,30 | 1,73 | 0,899 | 0,672 | 0,354 | 0,91 |
| Media | (2,88±0,29) | (1,52±0,16) | (8,94±0,18)·10⁻¹ | (5,79±0,77)·10⁻¹ | (3,05±0,41)·10⁻¹ | 0,89 |

Elettrodi di grafite (4 cm² superficie):

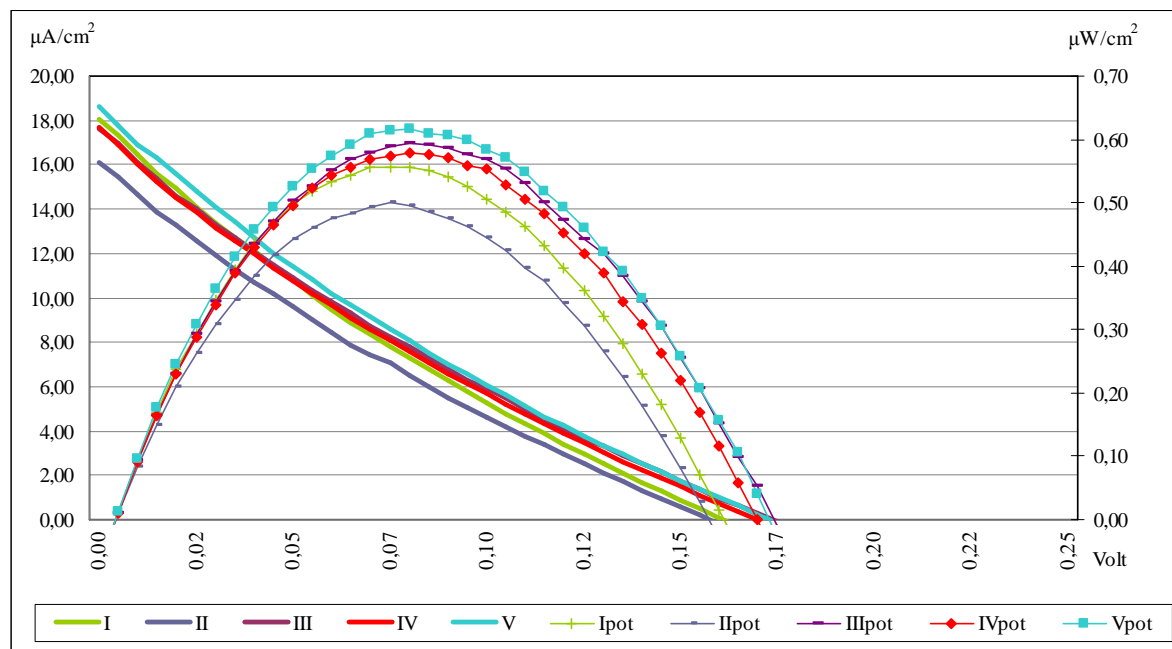


Figura 81: valori di corrente e potenza in funzione del potenziale registrati nelle cinque curve I(V) della pila NADH/ossigeno con elettrodi di grafite.

Dall'analisi delle funzioni registrate (Figura 81) si ricavano i dati inseriti in Tabella 15:

Tabella 15: parametri sperimentali della pila NADH/ossigeno con elettrodi di grafite.

| | Isc (μA) | Jsc (μA/cm²) | Voc (volt) | Pmax (μW) | Pmax (μW/cm²) | FF |
|--------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------|-------------|
| I | 69,3 | 17,3 | 0,157 | 2,22 | 0,556 | 0,82 |
| II | 61,8 | 15,4 | 0,167 | 2,01 | 0,501 | 0,78 |
| III | 67,8 | 17,0 | 0,167 | 2,37 | 0,593 | 0,84 |
| IV | 67,5 | 16,9 | 0,167 | 2,31 | 0,578 | 0,82 |
| V | 71,1 | 17,8 | 0,167 | 2,47 | 0,617 | 0,83 |
| Media | $(6,75 \pm 0,35) \cdot 10^1$ | $(1,69 \pm 0,09) \cdot 10^1$ | $(1,65 \pm 0,04) \cdot 10^{-1}$ | $(2,28 \pm 0,18)$ | $(5,69 \pm 0,44) \cdot 10^1$ | 0,82 |

Terminato il primo ciclo di misurazioni si aggiunge la Diaforasi e si registrano altre cinque curve corrente/tensione (Figura 82).

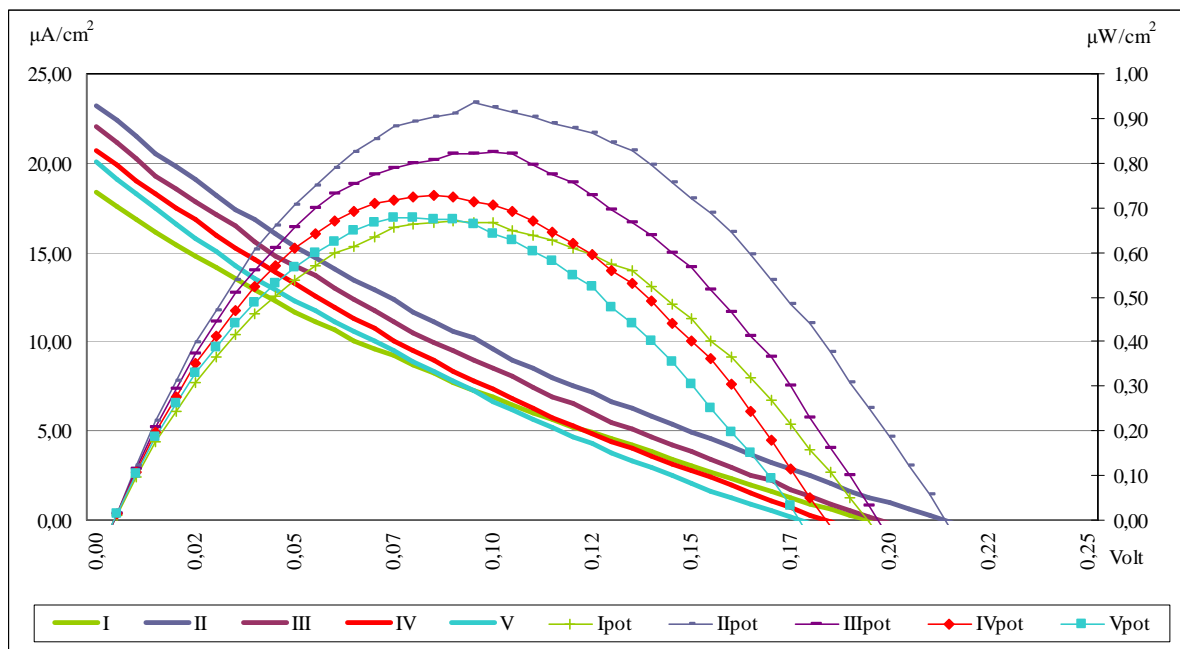


Figura 82: valori di corrente e potenza in funzione del potenziale registrati nelle cinque curve I(V) della pila NADH/ossigeno in presenza di Diaforasi con elettrodi di grafite.

I parametri principali vengono riassunti in

Tabella 16:

Tabella 16: parametri sperimentali della pila NADH/ossigeno in presenza di Diaforasi con elettrodi di grafite.

| | Isc (μA) | Jsc ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) | Voc (V) | Pmax (μW) | Pmax ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) | FF |
|--------------|--|--|---|-------------------------------------|---|-------------|
| I | 70,3 | 17,6 | 0,187 | 2,67 | 0,668 | 0,81 |
| II | 89,6 | 22,4 | 0,207 | 3,74 | 0,934 | 0,80 |
| III | 84,6 | 21,2 | 0,192 | 3,30 | 0,825 | 0,81 |
| IV | 79,5 | 19,9 | 0,177 | 2,91 | 0,727 | 0,83 |
| V | 80,1 | 20,0 | 0,172 | 2,70 | 0,675 | 0,78 |
| Media | $(8,08 \pm 0,71) \cdot 10^1$ | $(2,02 \pm 0,18) \cdot 10^1$ | $(1,87 \pm 0,14) \cdot 10^{-1}$ | $(3,06 \pm 0,45)$ | $(7,66 \pm 0,11) \cdot 10^{-1}$ | 0,81 |

A differenza dell'esperimento sviluppato con elettrodi di alluminio, non si registra un marcato incremento del valore di V_{OC} tra reazione catalizzata e non. Si suppone che tale fenomeno sia legato alla scarsa capacità dell'ossigeno di ridursi: quest'ultimo, all'aumentare del flusso di elettroni generato dalla pila, o a causa della bassa concentrazione in soluzione, o a causa della scarsa capacità di interagire con l'elettrodo, causa una caduta di performance della pila, caduta tanto più importante quanto più è efficiente il compartimento anodico.

La grafite, in particolare, rispetto ad alluminio e platino, permette di accelerare la fase di scarico del blu di metilene ridotto, comportando un aumento della corrente erogata dalla pila. Questa considerazione esplica anche il motivo per cui durante questo esperimento la soluzione di reazione, anche a seguito dell'aggiunta di Diaforasi, non si decolori completamente. La velocità con cui il blu di metilene ridotto si ossida all'elettrodo è superiore rispetto alla velocità con cui quest'ultimo si riduce ad opera di NADH e Diaforasi. Il lieve incremento di corrente e potenziale, sulla base di queste considerazioni, è legato a fenomeni diffusivi per un aumento della concentrazione di BM_{red} nel cuore della fase liquida e di conseguenza anche all'interfaccia con l'elettrodo.

Terminate le misurazioni col SourceMeter si indaga il comportamento della fuel cell con il tester eseguendo a diversi intervalli di tempo misurazioni di I_{SC} e V_{OC} (Tabella 17, Figura 83), fino alla completa scarica della pila. Il tempo di vita della cella al quale la corrente si dimezza rispetto a quello iniziale è di circa 5 minuti, tuttavia si osserva una corrente di fondo che perdura anche per 24 ore senza raggiungere mai un valore pari a zero:

Tabella 17: valori di Voc ed Isc registrati in funzione del tempo.

| Tempo (minuti) | Voc (v) | Isc (μ A) | Voc * Isc (μ W) |
|----------------|---------|----------------|----------------------|
| 0 | 0,23 | 24,90 | 5,70 |
| 10 | 0,10 | 11,00 | 1,10 |
| 20 | 0,09 | 9,60 | 0,86 |
| 30 | 0,09 | 9,60 | 0,86 |
| 40 | 0,07 | 9,60 | 0,67 |
| 50 | 0,07 | 9,20 | 0,64 |
| 60 | 0,06 | 9,50 | 0,57 |
| 90 | 0,05 | 8,60 | 0,39 |
| 180 | 0,05 | 8,40 | 0,41 |
| 240 | 0,05 | 8,50 | 0,42 |
| +24 ore | 0,01 | 2,90 | 0,03 |

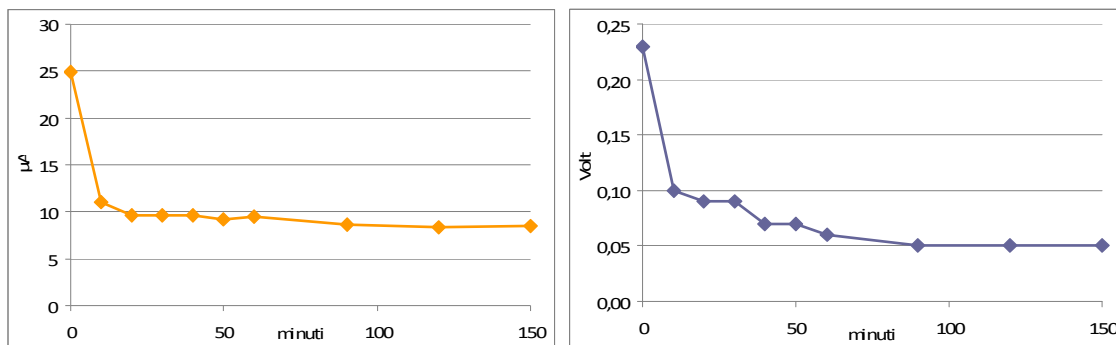


Figura 83: valori di Voc (destra) ed Isc (sinistra) registrati in funzione del tempo.

Le prove effettuate hanno mostrato l'effettiva capacità del blu di metilene ridotto di cedere i propri elettroni all'elettrodo, si è così riusciti a dimostrare la possibilità di costruire una pila che impieghi come combustibile un substrato di tipo biologico.

Scopo di questo lavoro di tesi non è però lo sviluppo di una pila performante ma la caratterizzazione degli stadi di interesse. La grafite è risultata essere il materiale che garantisce lo sviluppo della più alta potenza su centimetro quadrato, assieme a curve leggibili e poco disturbate. Si è indagata anche la possibilità di immobilizzare il blu di metilene sull'elettrodo ed in effetti si è riusciti a creare dei film di mediatore sulla superficie elettrodica attraverso accrescimento del blu di metilene mediante applicazione di potenziali

variabili all'elettrodo stesso, tuttavia, questo esula dallo scopo di questo lavoro di tesi e non sarà trattato qui.

5 CONCLUSIONI

Le energie rinnovabili hanno un ruolo fondamentale nell'affrontare problemi quali cambiamenti climatici, degrado ambientale e sicurezza degli approvvigionamenti energetici. Poiché queste sfide diventano sempre più pressanti, i governi e i mercati sono alla ricerca di soluzioni innovative.

L'utilizzo di biomasse di scarto può rappresentare un'opportunità allettante visti i volumi annuali di produzione ed i bassi costi di acquisto legati essenzialmente al fatto che le aziende produttrici devono sostenere ingenti spese per il loro smaltimento.

Da queste considerazioni nasce l'idea di realizzare generatori elettrici modulari. Le celle a biocombustibile⁴⁴ rappresentano l'ultima frontiera nelle tecnologie di produzione di energia da fonti rinnovabili, sono infatti notevoli le potenzialità di questi dispositivi, legate ad indiscutibili vantaggi.

Le celle a biocombustibile prevedono la generazione di elettroni per la produzione di energia elettrica a partire dal processo di ossidazione di un substrato da parte di microrganismi o enzimi; possono essere impiegati molti materiali organici di scarto come substrati per il processo di ossidazione.

Una cellula vivente utilizza processi elettrochimici per recuperare tutti gli elettroni contenuti nelle molecole di nutrienti (per il glucosio attraverso glicolisi e ciclo di Krebs) e li sfrutta con efficienze vicine al 100% (chimica → elettrica) per produrre energia sotto forma di ATP tramite il processo di fosforilazione ossidativa.

In questo lavoro di tesi si è studiato il meccanismo di funzionamento di un processo biomimetico, interfacciato ad una cella a biocombustibile, sviluppando in vitro lo step della fosforilazione ossidativa nell'ottica di sostituire il procedimento naturale a quello artificiale, sfruttando così gli elettroni generati dal metabolismo cellulare, sotto forma di coenzimi piridinici, come fonte di energia elettrica.

Tutto ciò è stato realizzato attraverso l'accoppiamento, nella cella, di NADH, blu di metilene e Diaforasi. Il primo è il trasportatore di elettroni impiegato dagli organismi per generare ATP durante la fase di fosforilazione ossidativa, e viene prodotto dal metabolismo cellulare, il secondo è il mediatore responsabile del trasporto degli elettroni derivanti dall'ossidazione del NADH fino alla superficie elettrodica mentre la Diaforasi è l'enzima che catalizza il trasferimento elettronico dal NADH al blu di metilene, favorendo la riduzione di quest'ultimo a spese del NADH che si ossida a NAD^+ .

La taratura del sistema di misura è stata sviluppata attraverso la costruzione e la caratterizzazione di pile standard: la pila zinco/rame e la pila iodio/ferro.

Tramite lo spettrofotometro si sono poi studiate le interazioni tra NADH e Blu di Metilene, e si è dimostrata la possibilità di svolgere la reazione di ossidoriduzione tra queste due specie. Inoltre si è accertata la capacità dell'enzima Diaforasi di catalizzare tale reazione, in presenza di questo, infatti, il tempo di mezzavita del Blu di Metilene ossidato rispetto alla specie ridotta è trenta volte inferiore.

La reazione ossidoriduttiva precedentemente studiata è stata quindi interfacciata ad una pila a biocombustibile: la pila NADH/ferro, che ha messo in evidenza la migliore capacità del Blu di Metilene ridotto di scambiare elettroni con l'elettrodo, rispetto allo ioduro nella pila iodio/ferro. Tuttavia, il confronto tra i valori di K_m in presenza ed in assenza di Diaforasi nella pila NADH/ferro ha evidenziato come, all'aumentare dell'intensità di corrente nel circuito, avvenga parallelamente una riduzione dell'affinità del Blu di Metilene per l'elettrodo, legata alla sua scarsa capacità di trasferire elettroni sulla superficie dell'elettrodo. Dagli studi preliminari realizzati sulla pila NADH/aria, si è osservato un peggioramento delle performance della cella, attribuito all'inefficienza dello scambio di elettroni con l'ossigeno disciolto in soluzione nel comparto catodico, e legato alla natura del gas o alla sua concentrazione in soluzione. In particolare, si è osservato come, per una pila NADH/aria, il valore di corrente massima risenta minimamente dell'aggiunta di Diaforasi in soluzione, in concentrazione 1U/ml. L'incremento, nel caso in cui si impieghi enzima in concentrazione 10U/ml è solo del 70%, rispetto all'aumento del 200% osservato nella pila NADH/Ferro; differenza imputabile alla fase di riduzione dell'ossigeno in soluzione. La diminuzione delle performance della pila NADH/aria, può essere legata alla bassa concentrazione di ossigeno

in soluzione, disponibile ad interagire con l'elettrodo e ridursi, o alla scarsa capacità di quest'ultimo di interagire con la superficie elettrodica.

Infine, si è sviluppata la pila NADH/O₂ (Figura 84), che ha dimostrato la reale possibilità di realizzare un meccanismo biomimetico del processo di fosforilazione ossidativa, interfacciato ad una pila a biocombustibile.

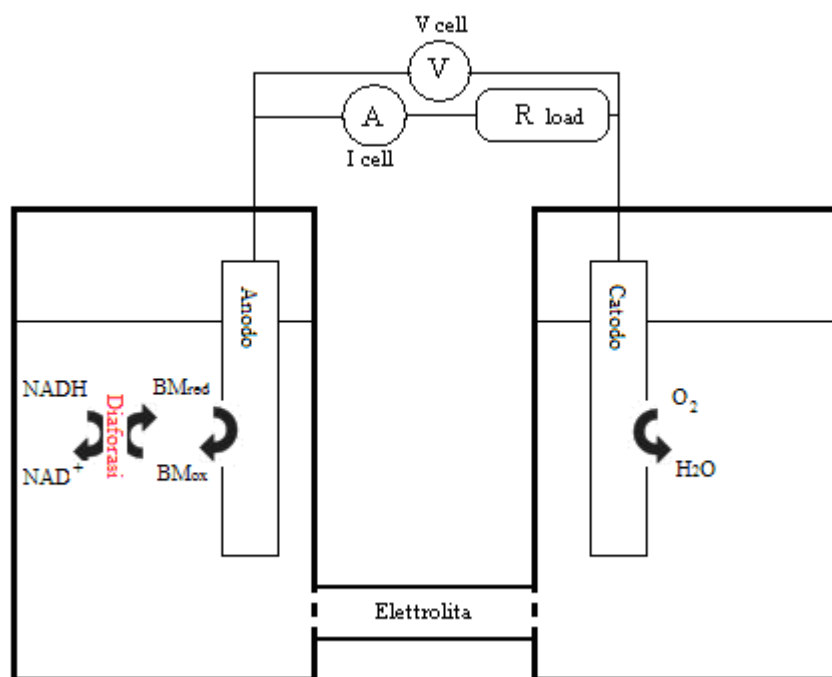


Figura 84: rappresentazione schematica della pila NADH/Ossigeno

In conclusione si può affermare che lo scopo prefissato di realizzare un sistema biomimetico del processo metabolico di fosforilazione ossidativa è stato raggiunto; tuttavia, sono disponibili notevoli possibilità di ottimizzazione del dispositivo. Prima fra tutte, la ricerca di un mediatore di scambio elettronico con un valore di potenziale di ossidoriduzione più vicino al potenziale redox della coppia NAD⁺/NADH, per poter ottenere un potenziale di cella più ampio. Ciò permetterebbe lo sfruttamento di un percentuale più elevata del contenuto energetico del coenzima NADH, migliorando l'efficienza totale del processo.

Un'ulteriore via di sviluppo del sistema è sicuramente legata allo studio della geometria di cella più adatta a garantire un efficace scale up del sistema.

6 BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ - ENEA, Le fonti rinnovabili 2010 (2010).
- ² - Senato della Repubblica - Comunicazione della commissione al Consiglio e al Parlamento europeo - "Limitare il surriscaldamento dovuto ai cambiamenti climatici a + 2 gradi Celsius. La via da percorrere fino al 2020 e oltre" (n. 12).
- ³ - <http://www.zeroemission.eu/portal/news/channelname/Energia/channel/54/id/448>.
- ⁴ - http://www.enel.com/it-IT/doc/innovation/smart_grids_enel__le_reti_intelligenti_guidano_il_futuro.pdf.
- ⁵ - <http://www.smartgrids.eu>.
- ⁶ - http://www.key4biz.it/News/2013/04/23/Tecnologie/smart_grid_smart_meter_ue_dont_smart_meter_me_217226.html.
- ⁷ - <http://www.energylabfoundation.org/wp-content/uploads/2012/01/Approfondimento-2-Febbraio-2012-EnergyLab-Smart-Grid-in-Italia.pdf>.
- ⁸ - Litos Strategic Communications for the U.S. Department of Energy, The Smart Grid: an introduction.
- ⁹ - V. Balzani, Il Divulgatore, n° 3/4 Marzo/Aprile 2012 (pgg. 8-14).
- ¹⁰ - ENEA, Celle a combustibile – Stato di sviluppo e prospettive della tecnologia (2009).
- ¹¹ - <http://www.polltresearch.com>.
- ¹² - A. Halme, X. Zhang and A. Ranta (2000): Study of Biological Fuel Cells, in the 2nd Annual Advances in R&D the Commercialization of Small Fuel Cells and Battery Technologies for Use in Portable Applications, April 26-28, 2000, New Orleans, USA.
- ¹³ - <http://electrochem.cwru.edu/encycl/art-f03-fuel-cells.htm>.
- ¹⁴ - <http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/fuel-cells/index.php>.
- ¹⁵ - J.O'M. Bockris and A.J. Appleby, The Hydrogen Economy: An Ultimate Economy?, Environment, This Month, 1 (1972) p 29.
- ¹⁶ - Why a hydrogen economy doesn't make sense, By Lisa Zyga, Copyright 2006 Physorg.com.
Citation: Bossel, Ulf. "Does a Hydrogen Economy Make Sense?" *Proceedings of the IEEE*. Vol. 94, No.10, October 2006.
- ¹⁷ - Boyd, Robert S. (May 15, 2007). "Hydrogen cars may be a long time coming".

-
- ¹⁸ - Y.Cengel, M.Boles. Thermodynamics. An Engineering Approach.
- ¹⁹ - <http://www.ccpb.it/blog/2013/04/03/scarti-agro-industriali-non-piu-rifiuti-ma-risorse/>.
- ²⁰ - <http://www.ecodallecitta.it/notizie.php?id=374740>.
- ²¹ - http://www.crpa.it/media/documents/crpa_www/Convegni/20130314_BiogasBiometano_RA/Piccinini_RA_14-3-2013.pdf.
- ²² - B.E. Logan, Nature Reviews Microbiology 7 (2009) 375.
- ²³ - A.E. Franks, K.P. Nevin, Energies 3 (2010) 899.
- ²⁴ - D.R. Lovley, Energy and Environmental Science 4 (2011) 4896.
- ²⁵ - P.R. Girguis, M.E. Nielsen, I. Figueroa, Current Opinion in Biotechnology 21 (2010) 252.
- ²⁶ - K. Rabaey, R.A. Rozendal, Nature Reviews Microbiology 8 (2010) 706.
- ²⁷ - A.P. Borole, G. Reguera, B. Ringeisen, Z.W. Wang, Y.J. Feng, B.H. Kim, Energy and Environmental Science 4 (2011) 4813.
- ²⁸ - M. T. Madigan, J. M. Martink and J. Parker, Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall International, Inc., Upper Saddle River, NJ, 8th edn, 1999.
- ²⁹ - B. A. Haddock and C. W. Jones, Bacteriol. Rev., 1977, 41, 47.
- ³⁰ - R. K. Thauer, K. Jungermann and K. Decker, Bacteriol. Rev., 1977, 41, 100. Rabaey, K.; Verstraete, W. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 291-298.
- ³¹ - B. Cohen, J. Bacteriol., 1931, 21, 18.
- ³² - M. E. Hernandez and D. K. Newman, Cell. Mol. Life Sci., 2001, 58, 1562.
- ³³ - D. K. Newman, Science, 2001, 292, 1312.
- ³⁴ - D. K. Newman and R. Kolter, Nature, 2000, 405, 94.
- ³⁵ - <http://www.microbialfuelcell.org/www/index.php/Applications/MFC-Pilot.html>.
- ³⁶ - Alessandro Pascale Guidotti Magnani. Tesi di laurea specialistica sperimentale *Studi preliminari per la realizzazione di una cella a combustibile enzimatica alimentata a glucosio ed acqua ossigenata*. Università degli studi di Bologna, Facoltà di Chimica Industriale, Dipartimento di Chimica industriale e dei Materiali. A:A: 2005-2006.

- ³⁷ - Setti L., Scali S., Degli Angeli I. e Pifferi P.G. (1998) Horseradish peroxidase-catalyzed oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme Microbial Technol.* 22, 656-661.
- ³⁸ - Valitutti G., Fornari G., Gando M. T., Chimica organica biochimica e laboratorio. Zanichelli 2002.
- ³⁹ - I. Willner, Y.M. Yan, B. Willner, R. Tel-Vered (2009) Integrated enzyme-based biofuel cells-A Review. *Fuel Cells.* 1, 7-24.
- ⁴⁰ - Andrea Cordella. Tesi di laurea specialistica sperimentale *Studi preliminari per la realizzazione di una cella a combustibile enzimatica alimentata a glucosio e ossigeno.* Università degli studi di Bologna, Facoltà di Chimica Industriale, Dipartimento di Chimica industriale e dei Materiali. A:A: 2007-2008.
- ⁴¹ - <http://www.webalice.it/egidiorezzaghi/IAELETTT/TERZA/RETIEL/RETIEL10.HTM>
- ⁴² - R. O'Hayre, S. W. Cha, W. Colella, F. B. Prinz, *Fuel Cell Fundamental*, Second Edition.
- ⁴³ - A. J. Bard, *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*, (2001), 828.
- ⁴⁴ - http://www.chem.ch.huji.ac.il/~eugeniik/biofuel/biofuel_cell_contents.html.