



**Politecnico
di Torino**

Politecnico di Torino

Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

A.a. 2025/2026

Sessione di Laurea Luglio 2026

Sviluppo di un modulo di sensing elettrochimico per closed-loop drug delivery

Relatori:

Prof. Paolo Motto Ros

Prof. Danilo Demarchi

PhD Fabiana Del Bono

Candidato:

Salvatore Gambino

Abstract

Le malattie croniche rappresentano oggi una delle principali cause di morte a livello globale. Esse comportano elevati costi di ospedalizzazione e sono correlate ad un peggioramento delle condizioni di vita. Le terapie impiegate per queste patologie richiedono una stretta aderenza al trattamento ed implicano diversi effetti collaterali, che possono non essere tollerati alla stessa maniera dai pazienti. L'impiego di dispositivi impiantabili per il rilascio controllato di farmaci permetterebbe di gestirne la somministrazione in maniera regolata, mentre l'uso di membrane nanofluidiche garantirebbe un rilascio in dosi limitate, così da ridurre la tossicità. Tali dispositivi sono dotati di un reservoir contenente il farmaco da rilasciare, che può essere riempito in prossimità dell'esaurimento dello stesso farmaco. Tuttavia, nei sistemi di rilascio in cui volume contenuto nel reservoir rimane invariato e cambia solamente la concentrazione delle molecole, non esistono metodi per stabilire quando è necessario ricaricare il serbatoio.

Il presente progetto di tesi è stato finalizzato allo sviluppo di un sistema di misura per la concentrazione di farmaco contenuto nel reservoir di simili dispositivi impiantabili. È stata ricercata una tecnica di misura che rispondesse ai seguenti requisiti: ridotto impatto sulle molecole da rilasciare, ridotto ingombro della componentistica elettronica e hardware per l'implementazione, elevata robustezza. La tecnica individuata è la Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS), la quale misura la risposta di un sistema elettrochimico, in termini di impedenza, ad impulsi in tensione che spazzano un intervallo di frequenze. È stato, dunque, sviluppato un setup sperimentale finalizzato alla valutazione di vantaggi e limitazioni della tecnica e che rendesse le misure robuste. Sono state indagate due molecole: il poli(sodio 4-stirenesolfonato), caratterizzato da un'elevata carica elettrica, al fine di validare l'efficacia del sistema, e l'Enalapril, molecola d'interesse terapeutico. Entrambe sono state valutate in soluzioni a diverse concentrazioni con la tecnica di cui sopra. Al variare della loro concentrazione, sono stati riscontrati comportamenti diversi per le molecole indagate; tuttavia, per entrambe è emersa una correlazione tra la loro concentrazione e i dati acquisiti. Al fine di approfondire ulteriormente la risposta del sistema in questione, è stata impiegata la Distribution of Relaxation Times (DRT), tecnica che permette di indagare i fenomeni fisici che si manifestano durante l'esecuzione delle misure EIS, associandoli a diverse scale temporali. Sulla base delle misure condotte, è stato sviluppato il design di una configurazione di elettrodi, che garantisse un trade-off tra le prestazioni e la dimensione degli elettrodi. Infine, è stato sviluppato un circuito stampato su scheda (Printed Circuit Board - PCB), per l'integrazione del componente elettronico individuato (AD5940) per eseguire le misure su un volume di prova.

In conclusione, è stata condotta un'analisi preliminare su una tecnica di misura, che apre la strada all'integrazione di un sistema per la valutazione della

concentrazione di molecole in un reservoir. Sono stati indagati i fenomeni fisici che si manifestano durante l'esecuzione della misura, per individuare possibili miglioramenti nel setup sperimentale. Infine, è stato sviluppato un modello che simuli l'applicazione della tecnica in questione su un dispositivo impiantabile.

Indice

Elenco delle figure	VII
1 Introduzione	1
2 Stato dell'arte	3
2.1 Active Implantable Drug Delivery System	3
2.1.1 nanochannel Delivery System	4
2.2 Tecniche di misura	6
2.2.1 Tecnica di riferimento	6
2.2.2 Misure elettrochimiche	6
2.2.3 Electrochemical Impedance Spectroscopy	7
3 Specifiche Elettroniche sulla misura	9
3.1 Componente Elettronico	9
3.2 Aspetti raltivi all'implementazione circuitale della EIS	10
3.2.1 Misura Raziometrica	10
3.2.2 Dimensionamento circuito di misura	12
4 Studio preliminare e sviluppo del setup sperimentale	16
4.1 Misure preliminari su soluzione salina	16
4.2 Adattabilità per lo studio sui farmaci	22
5 Analisi Dati	25
5.1 Tecniche di analisi sui dati EIS	25
5.1.1 Modello equivalente	25
5.1.2 Distribution of Relaxation Times	27
5.2 Esperimenti finali	28
5.2.1 Andamenti qualitativi delle misure al variare delle concentra- zioni	28
5.2.2 Estrazione di metriche per l'analisi	35
5.2.3 Conclusioni sui dati raccolti	47

6	Integrazione	49
6.1	Integrazione dell'AD5940	49
6.2	Design degli elettrodi	50
7	Conclusioni e Sviluppi futuri	54
	Bibliografia	56

Elenco delle figure

2.1	Confronto sistemi di rilascio [7].	4
2.2	Modulazione del rilascio di molecole cariche in un nanocanale tramite campo elettrico [10].	5
3.1	Schema a blocchi del circuito utilizzato per condurre le misure raziometriche tramite l'AD5940 per le misure EIS [15]	11
3.2	Schema a blocchi di medio livello del circuito di misura.	15
4.1	Andamento dei moduli di impedenza di una soluzione salina al variare della concentrazione.	17
4.2	PCB per le misure.	18
4.3	Vista in sezione del CAD del serbatoio e del tappo.	19
4.4	Ripetibilità misure EIS su soluzione salina.	20
4.5	Studio dell'influenza della geometria del sistema sulle misure.	21
4.6	Misure EIS su diverse soluzioni con Enalapril a concentrazione diversa.	22
4.7	Influenza della geometria del sistema sulle misure su soluzioni con Enalapril.	23
5.1	Andamento dei moduli dell'impedenza al variare della concentrazione. Confronto tra i diversi trial.	30
5.2	Andamento della fase dell'impedenza al variare della concentrazione. Confronto tra i diversi trial.	31
5.3	Andamento delle curve di impedenza immaginaria variare della concentrazione. Confronto tra i diversi trial.	32
5.4	Confronto tra le curve DRT a concentrazioni diverse, rispettivamente $200 \mu g/mL$ e $2000 \mu g/mL$	33
5.5	Modello elettrico equivalente.	35
5.6	Estrazione dei valori del modulo di impedenza ad alte frequenze	36
5.7	Confronto tra gli andamenti dei moduli di impedenza inter trial.	37
5.8	Estrazione dei valori minimi della fase	38
5.9	Confronto tra gli andamenti dei minimi delle fasi tra i diversi trial	39

5.10	Andamenti dell'area(a) e del baricentro(b) della regione centrale delle curve DRT al variare della concentrazione.	40
5.11	Valori massimi della regione associata ad alte scale temporali dall'analisi DRT per le diverse concentrazioni e trial.	41
5.12	Errori relativi del modello equivalente, rispettivamente per i trial 0 (a), 1 (b), 2 (c), 3 (d)	42
5.13	Andamento dei valori di R1 al variare della concentrazione e tra i diversi trial.	43
5.14	Confronto tra i valori assunti da n per le diverse concentrazioni e i diversi trial.	44
5.15	Andamento dei valori di R2 al variare della concentrazione e tra i diversi trial.	45
5.16	Andamenti del parametro di Warburg per le diverse concentrazioni e i diversi trial.	47
6.1	Schema a blocchi per l'integrazione dell'AD5940 per un'applicazione custom.	50
6.2	Proposta di integrazione geometrica degli elettrodi su nDS.	51
6.3	Dimensione degli elettrodi all'interno di nDS.	52
6.4	Proposta di un PCB su Kapton flessibile per l'esposizione degli elettrodi nel reservoir.	53

Capitolo 1

Introduzione

Nel 2021, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization - WHO) ha riportato, tra le prime 10 cause di morte, 7 malattie non trasmissibili. La maggior parte di queste è costituita da malattie croniche, tra cui malattie cardiovascolari, respiratorie o diabete, oppure da eventi direttamente correlati a tali patologie, come ictus o infarto[1].

Le terapie che oggi vengono impiegate per trattare queste patologie prevedono una somministrazione per via orale. Questo approccio, tuttavia, comporta alcune criticità, quali la comparsa di effetti collaterali, dovuti alle elevate dosi che vengono rilasciate in breve tempo, e la difficoltà nel mantenere un'aderenza terapeutica da parte dei pazienti [2].

I dispositivi impiantabili attivi per il rilascio di farmaco (Active Implantable Drug Delivery System - AIDDS) costituiscono un'importante alternativa per la somministrazione dei farmaci. Esistono, infatti, due categorie di Drug Delivery System (DDS): quelli passivi e quelli attivi; sebbene i primi siano caratterizzati da ridotte dimensioni, i secondi permettono di avere un maggiore controllo sul rilascio dei farmaci. Tra gli elementi costitutivi dei sistemi attivi per rilascio di farmaco si elencano: microcontrollori per la gestione del dispositivo, attuatori per il rilascio di farmaco, batteria, reservoir per contenere le molecole da rilasciare ed eventuali sistemi di comunicazione con l'esterno, come antenne. Come accennato sopra, uno dei limiti principali di un simile dispositivo risiede nel fatto che, pur dovendo contenere tutti gli elementi necessari per il suo funzionamento, esso deve avere le minori dimensioni possibili, essendo un dispositivo impiantabile. È possibile, infatti, riassumere le proprietà che un dispositivo impiantabile attivo deve avere come segue: dimensioni ridotte, lunga vita operativa, ridotto impatto sulla vita del paziente.

Esistono diverse tecniche per il rilascio di molecole, come la generazione di un gradiente di pressione nelle pompe peristaltiche, o la diffusione semplice attraverso membrane i cui canali possono essere gestiti per controllarne il passaggio [3].

Il nanochannel Delivery System (nDS) è un sistema sviluppato dal Grattoni Lab, presso lo Houston Methodist Hospital, dotato di una membrana nanofluidica, ossia una membrana caratterizzata da dei nanocanali che permettono il rilascio di molecole [4].

Come già detto, uno degli elementi imprescindibili per un DDS è il reservoir, ovvero un serbatoio contenente le molecole da rilasciare. Nel caso di impiego di nanomembrane, il rilascio avviene per diffusione semplice delle molecole dal reservoir al plasma; pertanto, il volume della soluzione contenuta nel reservoir rimane costante. Al contrario, con il rilascio del farmaco, la concentrazione delle molecole nel serbatoio diminuisce, fino a quando il gradiente di concentrazione ai capi della membrana è nullo o non più in grado di garantire la diffusione delle molecole. Tuttavia, esiste, per un DDS, la possibilità di riempire il reservoir nuovamente con del farmaco una volta che si è esaurito quello al suo interno. Si può facilmente intuire come possa essere utile, se non necessario, conoscere la concentrazione residua nel reservoir, così da poter ricaricare il farmaco al momento opportuno. Allo stato attuale, non esistono approcci utili alla misura della concentrazione di molecole in un reservoir di un dispositivo impiantabile.

Il presente progetto di Tesi è dunque finalizzato allo sviluppo di un modulo di sensing per la concentrazione di molecole all'interno del reservoir di un AIDDS. Si tratta di uno studio esplorativo che apre la strada ad ulteriori approfondimenti.

Capitolo 2

Stato dell'arte

2.1 Active Implantable Drug Delivery System

Per Active Implantable Drug Delivery System (AIDDS) si intende un dispositivo medico impiantabile attivo finalizzato al rilascio di farmaci. Secondo il Regolamento (UE) 2017/745 (MDR), si definisce dispositivo attivo "un qualsiasi dispositivo il cui funzionamento dipende da una fonte di energia diversa da quella generata dal corpo umano per tale scopo o dalla gravità e che agisce modificando la densità di tale energia o convertendola", mentre per dispositivo impiantabile si intende "un qualsiasi dispositivo, compresi quelli che sono parzialmente o interamente assorbiti, destinato a essere impiantato totalmente nel corpo umano" [5]. La FDA definisce similmente i dispositivi impiantabili, ma non fornisce una definizione univoca di dispositivo attivo. Lo spettro dei dispositivi impiantabili attivi è molto ampio; esso comprende dispositivi come pacemaker, stimolatori del midollo spinale o nervosi e sistemi per il rilascio di farmaco.

Per Drug Delivery System (DDS) si intende un dispositivo finalizzato alla somministrazione di una terapia farmacologica. In questa categoria rientrano una serie di sistemi: dai più tradizionali, come le iniezioni o le capsule, ai più complessi, come idrogeli o pompe osmotiche.

Nel contesto delle malattie croniche, l'impiego di AIDDS risulta essere particolarmente vantaggioso. Infatti, l'approccio terapeutico richiede un'elevata aderenza, e la gestione del rilascio dei farmaci tramite questi dispositivi permetterebbe di ottenere la somministrazione senza che questa debba essere gestita solamente dal paziente. La gestione del rilascio di farmaci per mezzo di AIDDS, inoltre, renderebbe possibile un allineamento della somministrazione ai cicli circadiani del paziente. Questo approccio viene definito "chronotherapy" e permette di massimizzare l'efficacia dei farmaci e di ridurre la comparsa di effetti collaterali nei pazienti, rendendo possibile la realizzazione di un piano terapeutico specifico su misura. [6]

Un altro aspetto che determina le prestazioni dei farmaci è il sistema di rilascio. Idealmente, il rilascio delle molecole dovrebbe avvenire in maniera costante nel tempo, in modo tale da mantenere costante la concentrazione delle molecole nel sangue, al fine di garantire l'efficacia terapeutica e rendere meno probabile l'insorgenza di effetti collaterali. Un simile meccanismo di rilascio viene definito "zero order release".

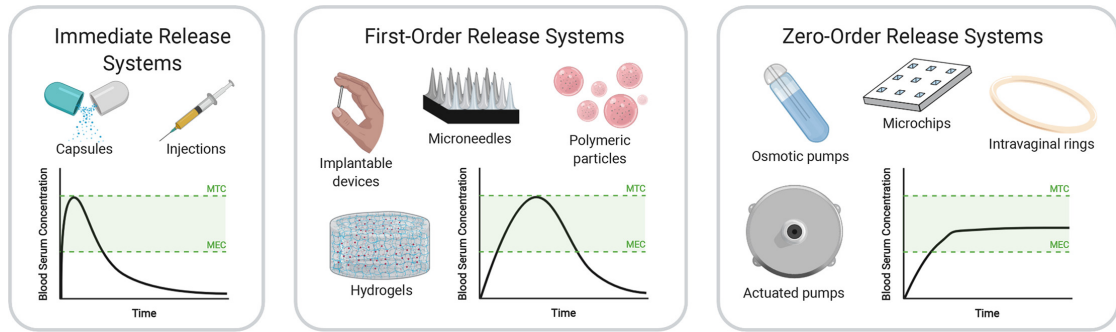


Figura 2.1: Confronto sistemi di rilascio [7].

Come si può evincere, lo "zero order release" permette di mantenere la concentrazione del farmaco nel sangue all'interno di una finestra utile. Tale finestra è compresa tra il "minimum effective concentration" (MEC) e il "minimum toxic concentration" (MTC), ovvero le concentrazioni minime per l'efficacia e la concentrazione minima per la tossicità [7].

Un AIDDS che sfrutti un meccanismo "zero order release" permetterebbe di risolvere le problematiche di aderenza e di modalità di rilascio.

2.1.1 nanochannel Delivery System

"nanochannel Delivery System" (nDS) è un DDS impiantabile, sviluppato dal Grattoni Lab presso lo Houston Methodist Hospital, dotato di una membrana nanofluidica, la quale consente di ottenere un rilascio "zero order" [4]. Tale sistema è realizzato tramite tecnologie MEMS ed è caratterizzato da una schiera di canali nanometrici. Il sistema di rilascio è stato testato con un rate di rilascio medio in vitro di $0.8 \mu g h^{-1}$ per molecole come Enalapril o di $12 \mu g$ per giorno per molecole come polistirene sulfonato [8] [9].

nDS presenta gli stessi elementi caratteristici di un AIDDS, come una batteria, il circuito elettrico per la gestione, un'antenna per la comunicazione esterna, un reservoir e un attuatore per il rilascio.

Per poter controllare il rilascio delle molecole tramite la membrana nanofluidica, viene sfruttato un campo elettrico. Lungo le pareti dei nanocanali su cui viene applicato un potenziale, infatti, si viene a formare un doppio strato di carica: il

primo a ridosso delle pareti del canale è uno strato compatto, costituito dalle molecole del solvente e da ioni che vengono adsorbiti dalle pareti; il secondo è, invece, costituito dalle cariche che possono muoversi nel canale.

Lo spessore dello strato di carica, definito come lunghezza di Debye, dipende dalla forza ionica della soluzione e dalle cariche esposte sulle pareti. Se la dimensione caratteristica dello strato di carica è comparabile con la dimensione del canale, si innescano fenomeni in grado di influire sulla conducibilità del nanocanale, come elettroforesi o polarizzazione della concentrazione ionica. Al contrario, se non viene applicato nessun campo elettrico, le molecole possono passare per diffusione semplice, sotto l'effetto del gradiente di concentrazione. Inoltre, considerando la ridotta dimensione dei canali, la diffusione non dipende dalla concentrazione delle molecole nel reservoir, ma, al di sopra di una concentrazione minima, il flusso è considerevole costante. Dall'altro capo della membrana, nel plasma, la concentrazione delle molecole si può considerare pressoché nulla, dal momento che il circolo sanguigno allontana le molecole dal sito di rilascio [10]. Come si può evincere, un simile meccanismo di rilascio implica che le molecole utilizzate espongano cariche nella loro struttura chimica.

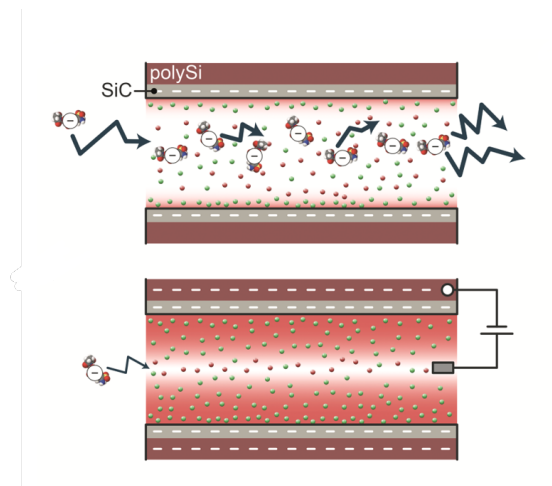


Figura 2.2: Modulazione del rilascio di molecole cariche in un nanocanale tramite campo elettrico [10].

Come detto, il serbatoio costituisce uno degli elementi principali di un AIDDS, esso contiene le molecole farmacologiche da rilasciare. Una delle caratteristiche di tale elemento è la possibilità di essere ricaricato nel momento in cui la concentrazione delle molecole nel buffer è troppo bassa. Questa proprietà risulta essere fondamentale per un dispositivo impiantabile, dal momento che, se così non fosse, la vita del dispositivo si esaurirebbe con un singolo ciclo di svuotamento del reservoir.

Il meccanismo di rilascio di nDS è tale da mantenere costante il volume della soluzione presente nel serbatoio, facendo variare solamente la concentrazione delle molecole che vengono rilasciate per diffusione attraverso la membrana. In questo contesto risulta essere estremamente utile misurare la concentrazione del farmaco contenuto nel serbatoio, al fine di ricaricare il serbatoio nel momento più opportuno. Tuttavia, non esistono tecniche specifiche per il monitoraggio della concentrazione di molecole in un reservoir.

2.2 Tecniche di misura

2.2.1 Tecnica di riferimento

Uno dei metodi più robusti per la misura della concentrazione di molecole in soluzione è la Spettroscopia di assorbimento UV-Visibile. Tale tecnica prevede di irradiare un volume contenente la soluzione ad una specifica lunghezza d'onda, tale per cui l'assorbimento della luce è massima per la molecola che si sta indagando. Misurando l'intensità della luce incidente e trasmessa dal campione in esame, attraverso la legge di Lambert-Beer, è possibile risalire alla concentrazione specifica della molecola.

$$\ln\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = -\epsilon_{\lambda}cl$$

dove I_1 e I_0 sono rispettivamente le intensità della luce trasmessa ed incidente, ϵ_{λ} è il coefficiente di estinzione molare, l il cammino ottico della luce nella soluzione e c la concentrazione della soluzione.

Tuttavia, tale tecnica risulta essere inadatta per l'applicazione in un dispositivo impiantabile, dal momento che la sua implementazione richiederebbe un volume elevato, in termini di strumentazione. Infatti, sarebbe necessario dotare il reservoir del dispositivo impiantabile di un generatore di onda e di un sistema di detezione per la luce che vanno, inoltre, protetti dal contatto diretto con la soluzione.

2.2.2 Misure elettrochimiche

A differenza della spettroscopia UV/Visibile, le misure elettrochimiche risultano essere più adatte per questo tipo di applicazione, dal momento che necessitano solamente di elettrodi a contatto con la soluzione e di un modulo per l'implementazione della misura, pertanto sottrarrebbero un volume quasi trascurabile al dispositivo. Tra queste, una delle principali è la Voltammetria. Tale tecnica prevede l'applicazione di una tensione variabile su una cella elettrochimica e la misura della corrente conseguentemente generata. Esistono diverse tipologie di Voltammetria, che differiscono nel modo in cui viene applicato il potenziale, come

la Cyclic Voltammetry (CV) e la Square Wave Voltammetry (SWV). La SWV prevede l'applicazione di diversi impulsi in tensione, con una forma d'onda quadra incrementale, ovvero di un'onda il cui valor medio aumenta ad ogni ciclo. In uscita si ottiene una corrente netta per ogni valore del gradino, ovvero una corrente determinata dalla differenza tra i picchi di corrente associati ai fronti di salita e di discesa dell'onda, rispettivamente denominati picchi forward e reverse. Dunque si ottengono diversi picchi in corrente al variare della tensione. La CV prevede l'applicazione di una tensione crescente secondo un gradiente e successivamente l'applicazione del gradiente inverso. In uscita si misura una corrente che varia secondo un andamento ciclico. Un altro approccio utilizzato per la misura di concentrazione è la Amperometria, che misura, nel tempo, la corrente generata da una cella elettrochimica quando è sottoposta a una tensione costante. Tali approcci sono stati utilizzati in letteratura per analizzare proprio la concentrazione di farmaci indagati anche in questo progetto di Tesi, come Enalapril, ottenendo buone precisioni e limiti di detezione dell'ordine dei microgrammi per millilitro [11] [12].

Queste tecniche di misura si candidano a sostituire i principali approcci per la misura della concentrazione di farmaci, che necessitano di strumentazione più costosa, ad esempio per l'analisi nei fluidi corporei. Tuttavia, sebbene esse siano molto precise e rispettino il vincolo sull'ingombro richiesto nel reservoir, esse implicano l'innescio di reazioni di ossidoriduzione nelle molecole. Tali reazioni non sono un semplice effetto collaterale, ma rappresentano il fenomeno informativo delle misure e dunque sono imprescindibili. Ciò non è ammissibile in un'applicazione per un dispositivo impiantabile per il rilascio di farmaco, dove il principio attivo deve essere preservato nella sua struttura chimica affinché possa essere efficace.

In conclusione, si possono riassumere come di seguito i requisiti che una tecnica di misura debba avere affinché possa essere compatibile con l'applicazione finale: ridotto effetto sulla struttura chimica delle molecole, ridotto ingombro in termini di volume per la componentistica e l'hardware necessari all'implementazione, robustezza delle misure.

2.2.3 Electrochemical Impedance Spectroscopy

L'Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) è una tecnica di misura elettrochimica molto versatile e potente. Trova applicazioni in diversi ambiti, dall'elettrochimica all'agricoltura e alla medicina [13]. La EIS si candida ad essere una possibile tecnica di misura per l'applicazione finale, dal momento che rispetta i requisiti posti. La sua implementazione prevede l'imposizione di diversi impulsi sinusoidali in tensione su una cella elettrochimica, con una frequenza variabile in un determinato intervallo, misurando la corrente che scorre nel sistema. Sotto l'ipotesi che il sistema sia lineare, si può calcolare l'impedenza della cella elettrochimica

come rapporto tra la tensione applicata e la corrente misurata. Considerando di applicare un impulso in tensione ad un'impedenza e di misurare la corrente generata, il modulo della resistenza sarà dunque

$$|Z_{mag}(\omega)| = \frac{|V_{mag}(\omega)|}{|I_{mag}(\omega)|},$$

mentre la fase si può calcolare come

$$phi = atan(\frac{Re\{Z(\omega)\}}{Im\{Z(\omega)\}}).$$

Si ottiene, dunque, uno spettro di impedenza al variare della frequenza. L'impedenza misurata viene espressa in termini di componente reale e immaginaria oppure, analogamente, in termini di modulo e fase. Conoscere il comportamento del sistema indagato su un range ampio di frequenze permette di indagare i diversi fenomeni che caratterizzano la risposta dello stesso sistema all'impulso esterno.

Capitolo 3

Specifiche Elettroniche sulla misura

3.1 Componente Elettronico

Per poter condurre le misure elettrochimiche discusse in precedenza, è stato impiegato l'AD5940 di Analog Devices. Si tratta di un Analog Front End (AFE) a basso consumo e bassa potenza per misure elettrochimiche ad alta precisione. Il chip in questione è dotato degli elementi elettronici per condurre diversi tipi di misure elettrochimiche, come amperometria, voltammetria ed EIS. Il consumo di fondo, in termini di corrente per le misure EIS è di 9.1 mA, a cui si aggiunge un consumo legato all'implementazione di misure ad alta potenza, pari a 6.9 mA. L'AD5940 è caratterizzato, inoltre, da una dimensione di $3.6 \text{ mm} \times 4.2 \text{ mm}$, dunque relativamente contenuta [14].

In particolare, per condurre le misure utili al presente progetto di Tesi, è stata impiegata la scheda AD5940-ELCZ, che monta il chip AD5940.

Nel caso delle misure eseguite, i principali blocchi impiegati sono: loop di eccitazione ad alta velocità, loop di misura ad alta velocità, blocco di campionamento. Il chip, infatti, è dotato di due loop di eccitazione e di misura, uno a bassa potenza e uno ad alta velocità. Il loop a bassa potenza è utile per la generazione e la misura di una tensione di riferimento interna V_{zero} e per una tensione specifica per le misure elettrochimiche, V_{bias} , che permette di agire come un potenziostato, per mantenere controllata la tensione sugli elettrodi. Per poter condurre le misure EIS, invece, sono necessari i loop ad alta velocità, dal momento che è necessario operare con tensioni e correnti ad alta frequenza, sebbene alcune misure EIS prevedano l'applicazione di tensioni in DC sugli elettrodi. Pertanto, di seguito si discuterà di loop di eccitazione e di misura riferendosi a quelli ad alta velocità.

Il loop di eccitazione ad alta velocità è dotato di un High Speed Digital to Analog Converter (HSDAC), che riceve in ingresso delle forme d'onda da un wave generator, il quale è in grado di generare delle forme d'onda trapezoidali, sinusoidali e quadrate. A sua volta esistono due modalità di funzionamento dell'HSDAC, una a bassa potenza e una ad alta potenza; in particolare quest'ultima permette di generare forme d'onda a frequenze superiori agli 80 kHz. Dal momento che gli impulsi utilizzati per condurre le misure avevano una frequenza massima di 100 kHz, è stato necessario utilizzare la modalità ad alta potenza. In uscita dal DAC vi è poi un amplificatore programmabile e un amplificatore del buffer.

Il loop di misura è costituito da un amplificatore di trans-impedenza ad alta velocità (High Speed TransImpedance Amplifier - HSTIA). Tale blocco è dotato di un amplificatore in configurazione invertente, in cui il guadagno è determinato da un resistore di feedback. Il resistore di trans-impedenza verrà indicato come R_{TIA} . È possibile utilizzare un R_{TIA} interno al chip oppure uno esterno. La funzione di questo blocco è quella di convertire la corrente in ingresso in una tensione, senza avere un effetto di carico sul circuito.

Infine vi è un Analog to Digital Converter (ADC) con una risoluzione di 16 bit, necessario per il campionamento delle tensioni in uscita dell'HSTIA. In uscita dall'ADC sono presenti blocchi di filtraggio digitale e notch per l'eliminazione del rumore. Infine, il segnale viene processato da un blocco DFT, ovvero un blocco che esegue una Digital Fourier Transform, necessaria per ricavare la parte reale e immaginaria del segnale, da cui si ricavano il modulo e la fase.

3.2 Aspetti relativi all'implementazione circuitale della EIS

3.2.1 Misura Raziometrica

L'implementazione della misura si può dunque riassumere come di seguito: l'impulso generato dall'HSDAC viene indirizzato sugli elettrodi della cella elettrochimica, la corrente che viene generata dal sistema viene indirizzata su un amplificatore di trans-impedenza, che amplifica e converte la corrente in una tensione grazie alla sua configurazione invertente, infine la tensione ottenuta viene campionata da un ADC. Come già detto, in uscita si ottiene un'impedenza, in termini di parte reale e immaginaria, oppure in termini di modulo e fase. Il chip utilizzato fornisce i dati in quest'ultima convenzione. Per ricavare l'impedenza della cella elettrochimica, è sufficiente dividere la tensione applicata per la corrente misurata. Sia gli impulsi che le correnti in questione sono segnali sinusoidali, per cui il chip è dotato di un modulo di DFT (Digital Fourier Transform), utile al fine di eseguire la trasformata

nel dominio delle frequenze delle tensioni misurate e risalire modulo e fase delle impedenze.

Più nel dettaglio, è viene implementata una misura raziometrica. Tale approccio permette di ottenere misure più robuste e meno rumorose. Le misure sul DUT (Device Under Test) vengono infatti rapportate ad una misura di riferimento, ritenuta stabile.

Viene riportato di seguito lo schema circuitale che descrive come sono state eseguite le misure EIS.

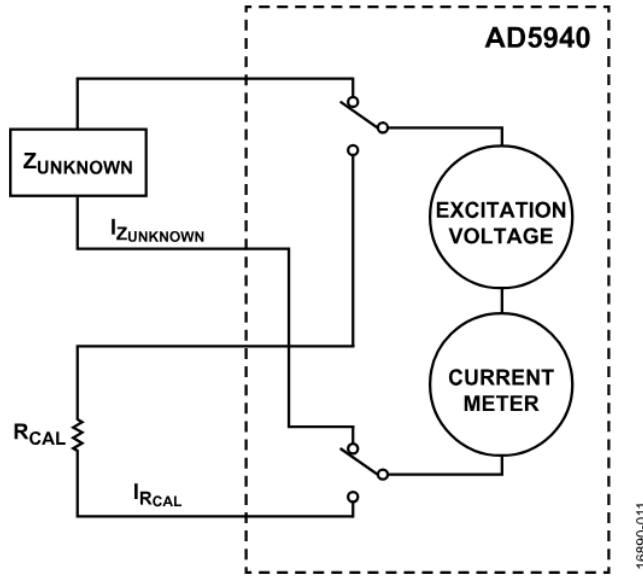


Figura 3.1: Schema a blocchi del circuito utilizzato per condurre le misure raziometriche tramite l'AD5940 per le misure EIS [15]

Gli impulsi in tensione, infatti, vengono applicati ai capi di un resistore noto, si misura la corrente e e successivamente si esegue la stessa misura sul DUT.

La relazione che permette di ricavare l'impedenza incognita è la seguente

$$|Z(\omega)| = \frac{|I_{Rcal}(\omega)|}{|I_Z(\omega)|} R_{cal, teor}$$

Più nel dettaglio, vengono riportate le equazioni utili per la misura di Z .

Dal momento che il chip campiona valori di tensione in uscita dall'amplificatore di trans-impedenza, e che tali tensioni sono legate alla corrente semplicemente dal valore di R_{TIA} , secondo l'equazione

$$I_m = \frac{V_{ADC}}{R_{TIA}},$$

si può scrivere:

$$|Z| = \frac{|I_{Rcal}|}{|I_Z|} R_{cal,teor} = \frac{|V_{Rcal}|}{R_{cal}} \cdot \frac{R_Z}{|V_Z|} \cdot R_{cal,teor}.$$

Ma la tensione che cade sui capi di R_{cal} e R_Z è la tensione di eccitazione che è uguale in entrambi i casi: $|V_{Rcal}| = |V_{R_Z}| = |V_{exc}|$

Per cui,

$$|Z| = \frac{|I_{Rcal}|}{|I_Z|} R_{cal,teor} = \frac{R_{cal,teor}}{R_{cal}} R_Z$$

Assumendo che R_{cal} abbia lo stesso valore di $R_{cal,teor}$, il modulo di Z così calcolato è proprio quello ricercato. In tal modo, la misura dipende dal rapporto tra due misure, di cui una affidabile; così facendo si riduce l'errore sulla misura di Z . È bene sottolineare che tale tecnica richiede l'impiego di una R_{cal} il più possibile vicina al suo valore teorico.

Analogamente, per quanto riguarda la misura della fase, essa si può calcolare semplicemente come:

$$(\phi(Z)) = (\phi)(Z_{mis}) - (\phi)(R_{cal}),$$

dove si assume che $(\phi)(R_{cal})$ sia nulla, essendo R_{cal} un componente resistivo.

Va sottolineato che non vengono campionate direttamente le correnti, ma, come già detto, l'ADC campiona le tensioni in uscita dal blocco TIA. La tensione misurata viene dunque processata dopo il blocco DFT, che fornisce la parte reale e immaginaria.

Per cui il modulo della tensione misurata, da cui si ricavano le correnti di interesse, e la fase, si possono semplicemente ricavare come:

$$|V| = \sqrt{r^2 + i^2},$$

$$\phi = atan\left(\frac{-i}{r}\right),$$

dove r ed i indicano rispettivamente la parte reale ed immaginaria della tensione campionata.

3.2.2 Dimensionamento circuito di misura

In questo paragrafo verranno discusse le scelte sui valori modificabili di alcuni degli elementi circuitali programmabili, che sono state fatte per ottimizzare la misura.

Le equazioni riportate in questo paragrafo sono verificabili a partire dal diagramma a blocchi sull'implementazione della misura, riportato in Figura 3.2.

Il primo blocco è quello relativo alla generazione degli impulsi di eccitazione. L'impulso applicato ha una forma d'onda sinusoidale, con una frequenza che varia all'interno del range desiderato. Uno dei parametri fondamentali di questo blocco è l'ampiezza dell'onda che viene generata. Da una parte, un impulso di ampiezza elevata permetterebbe di aumentare la corrente generata dalla cella elettrolitica e dunque sfruttare a pieno la dinamica dell'ADC. Tuttavia, un impulso di tensione eccessivamente elevato rischierebbe di condurre il sistema in una condizione di non linearità. Questo aspetto non è marginale, dal momento che una delle ipotesi principali alla base della EIS è proprio che il sistema sia lineare.

La tensione ai capi del DUT si può calcolare come:

$$V_{exc} = V_{DAC} \cdot A_G \cdot A_{buff}$$

Per questo motivo è stata impostata una tensione in uscita dall'HSDAC pari a 300 mV picco-picco, che viene poi ridotta dalla cascata costituita dall'amplificatore in uscita dal DAC e dall'amplificatore del buffer, con un guadagno pari rispettivamente a $A_G = 0.2$ e $A_{buff} = 0.25$.

La tensione che dunque viene applicata sulla cella elettrochimica ha un'ampiezza di 15 mV picco-picco, valore ritenuto sicuro per evitare il comportamento non lineare.

D'altra parte, per quanto riguarda il circuito di misura e di campionamento, l'aspetto principale riguarda la dinamica dell'ADC. In particolare, l'obiettivo è che il segnale campionato occupi la maggiore dinamica dell'ADC. Il chip è dotato di un PGA che amplifica la tensione prima di campionarla con l'ADC, tuttavia, all'aumentare del guadagno diminuisce il range di tensione in input all'ADC. Dal momento che è emersa una variabilità nel modulo delle impedenze misurate, la scelta è ricaduta su un'opzione intermedia con guadagno pari a 2 ed intervallo di input dell'ADC compreso tra -0.6 V e 0.6 V.

L'amplificatore di trans-impedenza risulta essere fortemente correlato al campionamento. Tale elemento, come già discusso, ha una configurazione riconducibile a un amplificatore invertente, in cui il resistore di feedback determina il guadagno; questo resistore è indicato come R_{TIA} . Si tratta di un resistore programmabile, con dei valori che vanno dai k Ω alle centinaia di k Ω . Aumentando il valore di R_{TIA} aumenta il guadagno sulla tensione in uscita che verrà poi campionata dall'ADC, pertanto si potrebbe sfruttare meglio la dinamica. Tuttavia il resistore del TIA è posto in parallelo a un condensatore di circa 30 pF. Questa configurazione ha un effetto passa-basso, che rischia di abbattere il segnale ad alte frequenze. La frequenza di taglio è, infatti, pari a

$$f_c = \frac{1}{2\pi R_{TIA} C_{TIA}}.$$

Dal momento che il segnale campionato ha una frequenza massima di 100 kHz, è necessario scegliere la più alta R_{TIA} che mantenga f_c sopra questo valore.

$$R_{TIA} < \frac{1}{f_c 2\pi C_{TIA}}.$$

Scegliendo $f_c = 150\text{kHz}$, si ottiene $R_{TIA} < 35\text{k}\Omega$. Il valore più vicino a questo tra quelli disponibili per la programmazione di R_{TIA} è pari a 40 k Ω ; ponendo $R_{TIA} = 40\text{k}\Omega$, si ottiene $f_c = 130.6\text{kHz}$, che è, comunque, un valore adeguato. Pertanto è stato scelto un valore di $R_{TIA} = 40\text{k}\Omega$.

Le condizioni da verificare, come già detto, sono la non saturazione dell'ADC e la copertura adeguata della dinamica. La corrente che scorre nel DUT e che viene amplificata dal TIA si può scrivere come:

$$I_p = \frac{V_p}{|Z|} = \frac{V_{pp}}{2|Z|},$$

dove V_{pp} e V_p sono rispettivamente i valori di picco-picco e di picco della tensione in uscita dal circuito di eccitazione. La corrente viene poi amplificata dal TIA, per cui

$$V_{p,TIA} = I_p R_{TIA} = \frac{V_p}{|Z|} R_{TIA},$$

dove $V_{p,TIA}$ è la tensione di picco in uscita dal TIA.

Infine, tale tensione viene amplificata da un PGA e campionata dall'ADC, con una tensione in ingresso all'ADC pari a:

$$V_{p,in} = V_{p,TIA} \cdot A = \frac{V_p}{|Z|} R_{TIA} \cdot A.$$

La saturazione va, dunque, valutata per i valori minimi di $|Z|$. Come si vedrà successivamente tale valore è di circa 2 k Ω . Da cui

$$V_{p,in}^{max} = 0.3V < 0.6V$$

Un'ultima valutazione riguarda la scelta del resistore di calibrazione. Dal momento che la misura viene condotta alla stessa maniera sia sul DUT che sul resistore di calibrazione, qualora si scelga un valore di resistenza minore del valore minimo di $|Z|$ si rischierebbe comunque la saturazione dell'ADC. Altrimenti andrebbero ridotti i valori di R_{TIA} o del guadagno del PGA. Tuttavia, $|Z|$ ha dimostrato di avere un andamento decrescente nelle misure condotte con l'aumentare della frequenza, arrivando ad assumere valori dell'ordine delle centinaia di k Ω . Valori eccessivamente alti di $|Z|$, come si può evincere dalla formula che descrive il valore della tensione di picco in ingresso all'ADC, comportano una tensione in ingresso all'ADC molto bassa, il che implica una non adeguata risoluzione nella misura di

$|Z|$. Ne consegue che R_{cal} vada scelta con un valore uguale o superiore al valore minimo che può assumere $|Z|$, o comunque dello stesso ordine di grandezza. Per condurre le misure è stato scelto un resistore interno alla scheda utilizzata pari a $10\text{ k}\Omega$, che si è rivelato essere simile ai moduli di impedenza del DUT.

Di seguito, viene riportato un diagramma a blocchi di medio livello che descrive il circuito di misura dell'AD5940.

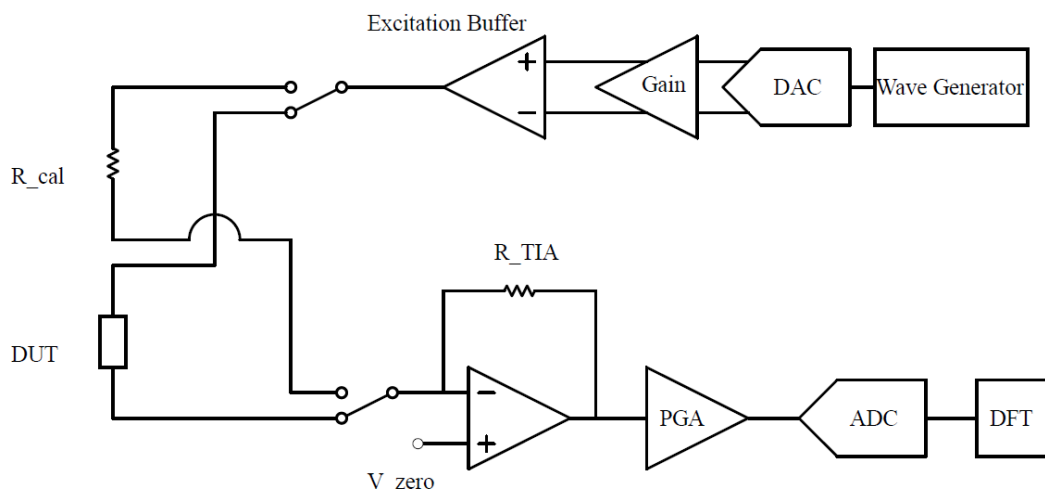


Figura 3.2: Schema a blocchi di medio livello del circuito di misura.

Capitolo 4

Studio preliminare e sviluppo del setup sperimentale

Lo sviluppo di un setup sperimentale ha costituito uno degli aspetti principali del progetto di Tesi. Infatti, l'evoluzione del setup è proseguita in parallelo all'analisi sui dati intermedi. In questo capitolo verranno discusse le strategie intraprese per lo sviluppo del setup. Per le strategie di analisi dei dati raccolti, si rimanda al capitolo successivo.

4.1 Misure preliminari su soluzione salina

Al fine di valutare, preliminarmente, l'efficacia della EIS, inizialmente sono state eseguite delle misure su una soluzione salina (NaCl 9 g/L) in diverse diluizioni. In parallelo, è stato sviluppato un sistema di misura che rendesse le misure il più ripetibile possibile.

I primi setup erano costituiti solamente da fili in rame immersi in un volume contenente la soluzione. Le misure condotte con questo setup hanno mostrato una dipendenza dalla concentrazione, in particolare si è osservata una diminuzione dell'impedenza all'aumentare della concentrazione. Questo comportamento era attendibile, dal momento che all'aumentare della concentrazione, aumenta la quantità di ioni disciolti e quindi la conducibilità della soluzione. Inoltre, è emerso un comportamento del sistema tale per cui, per ogni misura, l'impedenza diminuiva con l'aumentare della frequenza, fino a convergere su un valore di plateau.

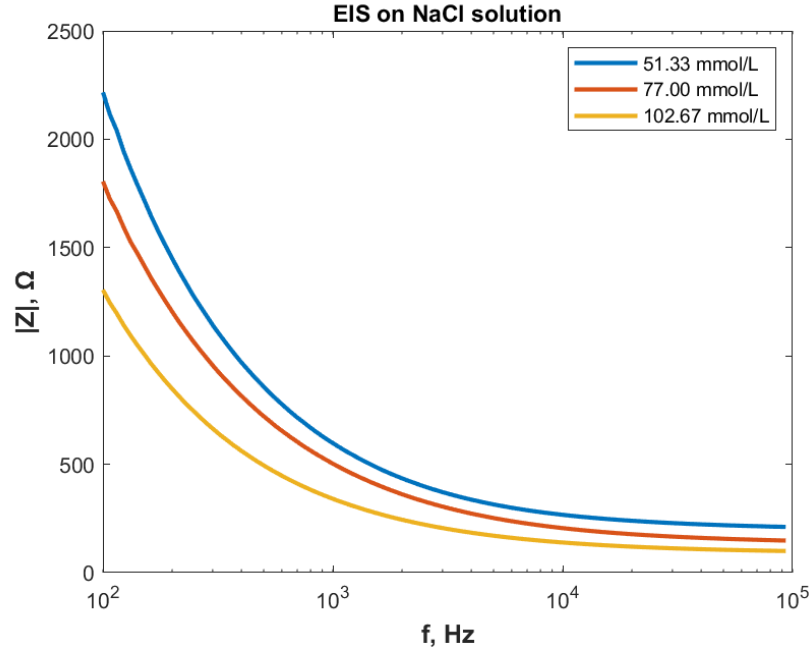
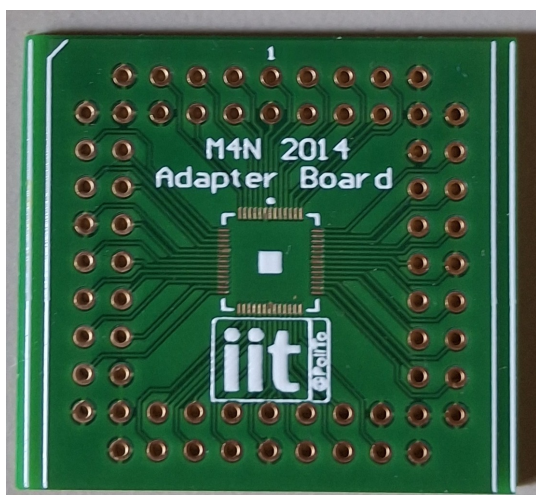


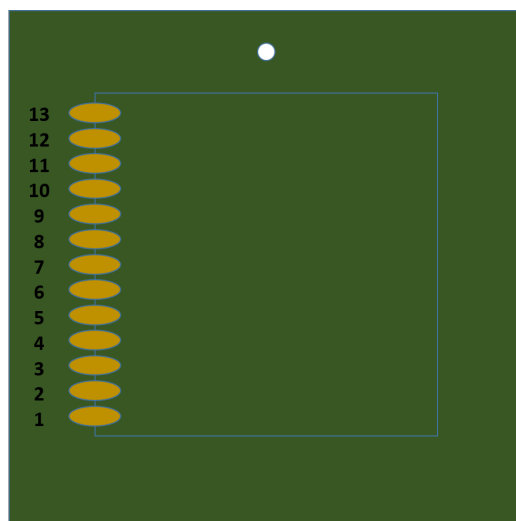
Figura 4.1: Andamento dei moduli di impedenza di una soluzione salina al variare della concentrazione.

Una volta verificato che la tecnica individuata potesse essere sensibile alla variazione di concentrazione di un soluto, ci si è focalizzati sulla creazione di un setup sperimentale che fosse il più robusto possibile. Infatti, la EIS risulta essere dipendente dalla configurazione della cella su cui si esegue la misura. Parametri come la distanza, la superficie degli elettrodi e il volume indagato risultano essere determinanti sulla misura dal momento che agiscono direttamente sul comportamento della cella elettrolitica.

Per garantire il controllo su questi parametri, è stato sviluppato un setup sperimentale su misura. Al fine di mantenere costanti la distanza e la superficie degli elettrodi, è stato impiegato un PCB che espone dei piccoli pad, uguali tra loro e ad un passo costante. I pad hanno una superficie di circa 1 mm^2 e un passo di 0.8 mm.



(a)



(b)

Figura 4.2: PCB utilizzato per la misura sulle soluzioni (a). I pad vengono esposti lungo i lati di un quadrato, con un passo e superficie costante. Ogni schiera contiene 13 pad, numerati secondo la convenzione mostrata in (b). Ogni pad espone un contatto di accesso esterno.

Fissata la geometria degli elettrodi, un altro parametro necessario da controllare durante le misure è il volume di liquido esposto sugli elettrodi. Un primo approccio prevedeva il posizionamento di una goccia di soluzione sugli elettrodi; tuttavia questa procedura non permetteva di avere sufficiente controllo sul volume, né sulla posizione relativa tra gli elettrodi e la soluzione, infine esponeva gli esperimenti al rischio della formazione di un ponte tra i pad e i loro contatti esterni per mezzo della stessa soluzione. Dunque, è stato realizzato un serbatoio graduato di forma parallelepipedica tramite stampa 3D e dalla capacità di 2 mL. Per la progettazione di tale elemento è stato utilizzato il software SolidWorks. Il serbatoio è stato fatto aderire sul PCB tramite l'impiego di silicone, ed era dotato di un coperchio esterno al fine di limitare l'evaporazione del solvente. Il serbatoio ha sezione quadrata, con un lato di 1 mm, ed è dotato di tacche graduate da 0.2 mL. È stato realizzato con una resina trasparente, al fine di poter verificare il livello di riempimento.

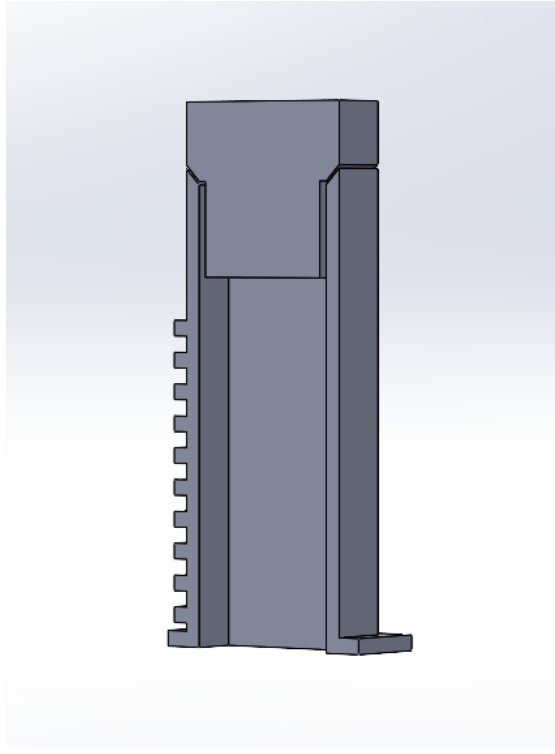


Figura 4.3: Vista in sezione del CAD del serbatoio e del tappo.

Una volta standardizzata la misura, fissati i parametri del setup sperimentale, è stata indagata l'influenza della superficie e la distanza degli elettrodi. Per farlo, sono stati saldati degli header sui contatti esterni del PCB e sono stati collegati un numero variabile di jumper, facendo variare la superficie totale esposta dai pad in soluzione e la distanza tra i centroidi degli elettrodi risultanti. Sono state testate 6 combinazioni totali tra superficie e distanza degli elettrodi.

Questa campagna di misure è stata condotta testando 4 concentrazioni diverse di soluzione salina e per ogni misura sono state eseguite 5 misure in cascata, così da valutarne la ripetibilità.

A scopo rappresentativo, vengono riportate le misure relative ad una configurazione degli elettrodi caratterizzata da 2 pad cortocircuitati, con una distanza interelettrodica di 9 pad.

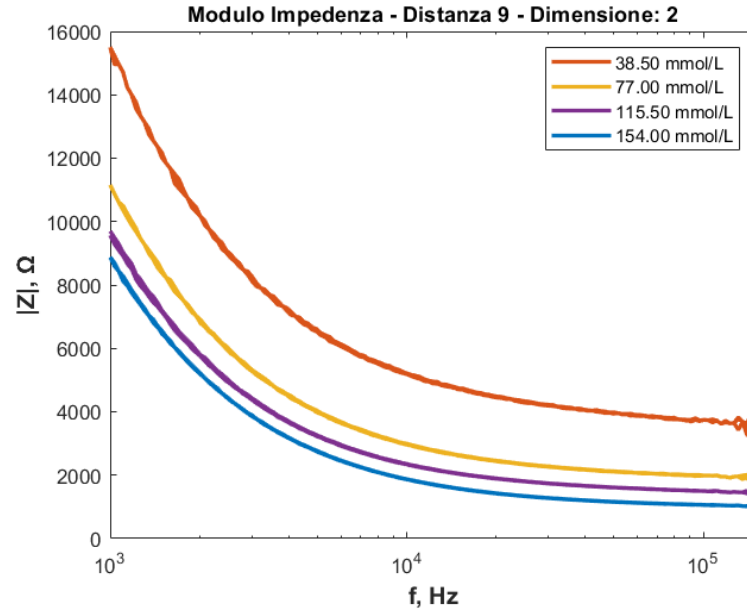


Figura 4.4: Curve ottenute da EIS su soluzioni ioniche a diversa concentrazione. Le curve relative alla stessa concentrazione sono mostrate con lo stesso colore.

Ciò che si può evincere è che le curve relative alla stessa concentrazione sono quasi sovrapposte, pertanto la misura è risultata essere ripetibile.

L'obiettivo di questa analisi è stato la ricerca della configurazione di elettrodi che massimizzasse la sensibilità del sistema, intesa come distanza tra curve associate a concentrazioni diverse. Per valutare tale distanza, le curve sono state mediate, e per ognuna è stato valutato il valore corrispondente ad una frequenza di repere a ridosso del limite più alto del range di misura. In questa regione, infatti, le curve si stabilizzavano su valori di plateau, come si può notare dalla Figura 4.4. Pertanto, per ogni setup, inteso come combinazione di distanza e di dimensione degli elettrodi, è stata valutata la distanza tra i valori del modulo di impedenza, favorendo le configurazioni che aumentassero la distanza tra le curve.

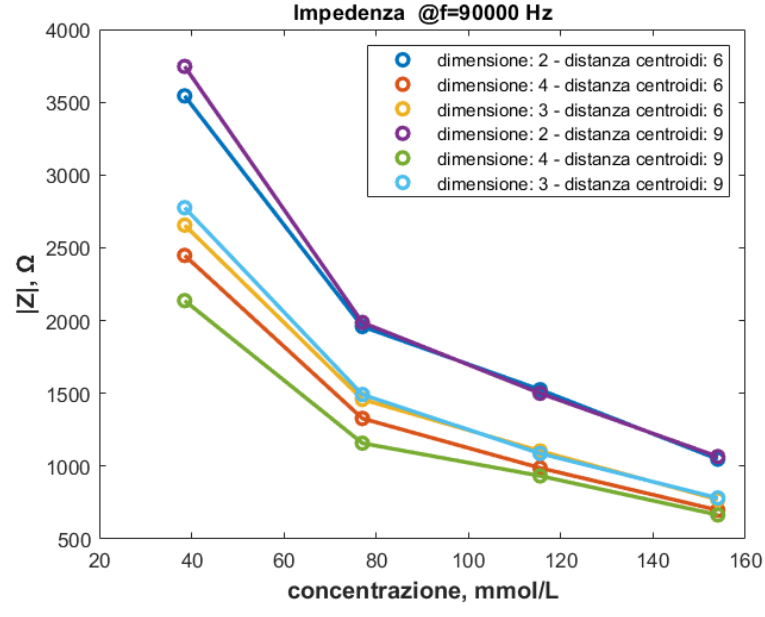


Figura 4.5: Confronto tra le distanze dei moduli di impedenza delle soluzioni a concentrazioni diverse alla frequenza di 90 kHz. Con lo stesso colore sono rappresentati i punti relativi alle stesse configurazioni di setup.

Come si può notare, alle alte frequenze, le variazioni di distanza tra gli elettrodi non risultano essere influenti, al contrario le curve sono accoppiate in funzione della dimensione risultante degli elettrodi. Si noti come le configurazioni caratterizzate da una ridotta superficie degli elettrodi mostrino moduli di impedenza complessivamente maggiori. Tale comportamento si può giustificare considerando un semplice modello geometrico costituito da un volume conduttore compreso tra due elettrodi piani e paralleli (condizione diversa da quella sperimentale ma utile al fine dell'interpretazione dei risultati). In un simile modello, vale infatti:

$$R = \rho \frac{L}{A},$$

dove ρ rappresenta la resistività della soluzione, L e A rispettivamente la distanza e la superficie degli elettrodi. I dati sperimentali sono in linea con questo modello, mostrando, a parità di concentrazione, un aumento dell'impedenza con la diminuzione dell'area degli elettrodi e con l'aumento della distanza degli elettrodi. Tuttavia, per le distanze testate, l'effetto della distanza degli elettrodi risulta essere meno rilevante rispetto alla variazione dell'area; infatti le curve sono accoppiate in funzione dell'area degli elettrodi.

In particolare, la configurazione con la dimensione minore degli elettrodi è risultata quella più sensibile alla variazione di concentrazione, in termini di pendenza della curva.

4.2 Adattabilità per lo studio sui farmaci

L'ipotesi iniziale sulle misure dei farmaci prevedeva che all'aumentare della concentrazione dei farmaci si avesse un aumento della conduttività della soluzione. Le molecole testate, infatti, sono dotate di carica elettrica; nello specifico le molecole di Enalapril espongono una carica netta pari a $-q$. Tale proprietà delle molecole non è casuale, ma viene sfruttata proprio per la gestione del rilascio di farmaco in nDS.

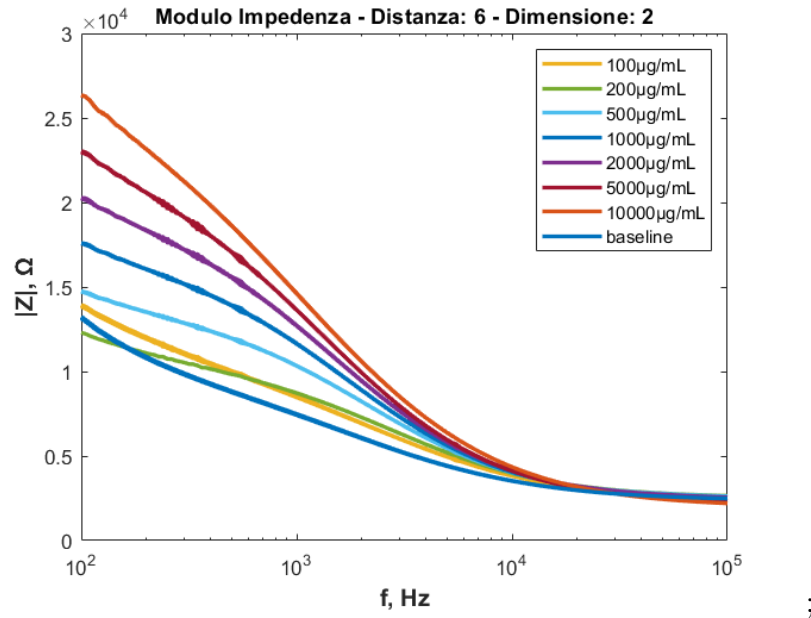


Figura 4.6: Misure EIS su diverse soluzioni con Enalapril a concentrazione diversa.

Come si può evincere dalle curve riportate, la concentrazione delle molecole di Enalapril ha degli effetti sulle misure a basse frequenze. Al contrario, alle alte frequenze le curve convergono allo stesso valore. Alle alte frequenze, infatti, prevalgono fenomeni di bulk, come la conducibilità della soluzione. Alle concentrazioni testate, tuttavia, le molecole in soluzione, sebbene dotate di carica elettrica, non influiscono in maniera impattante sulla conducibilità della soluzione, che viene determinata in maniera quasi totale dalla conducibilità del buffer utilizzato per le soluzioni.

Al contrario, le differenze tra le diverse curve si riscontrano per intervalli a basse frequenze. I fenomeni che influenzano le misure in questo range di frequenze, sono fenomeni di interfaccia tra gli elettrodi e la soluzione, e fenomeni di diffusione. Dunque, la concentrazione delle molecole indagate ha un effetto riscontrabile nella misura, ma l'effetto maggiormente apprezzabile non è sulla conducibilità della soluzione, bensì sui fenomeni di interfaccia. Alla luce di questi riscontri, si è deciso di valutare la risposta del sistema sulle soluzioni contenenti le molecole, ipotizzando, al contrario di quanto emerso dalle misure sulla soluzione salina, che un aumento delle dimensioni degli elettrodi potesse comportare un miglioramento nella capacità del sistema di distinguere le concentrazioni delle molecole.

Analogamente a quanto fatto per lo studio preliminare sulla soluzione salina, sono state condotte le misure in diverse configurazioni di setup sulle soluzioni contenenti le molecole farmacologiche.

Per la conduzione di tali esperimenti, ogni campagna di misure prevedeva di iniziare da una concentrazione massima, per poi diminuire la concentrazione alla misura successiva. Per ogni concentrazione, inoltre, sono state eseguite 10 misure in cascata, così da valutare la stabilità del sistema. Al termine della misura su un campione e prima della misura sul campione successivo, il setup è stato pulito con acqua deionizzata.

Vengono riportate alcune delle curve ottenute da tali misure.

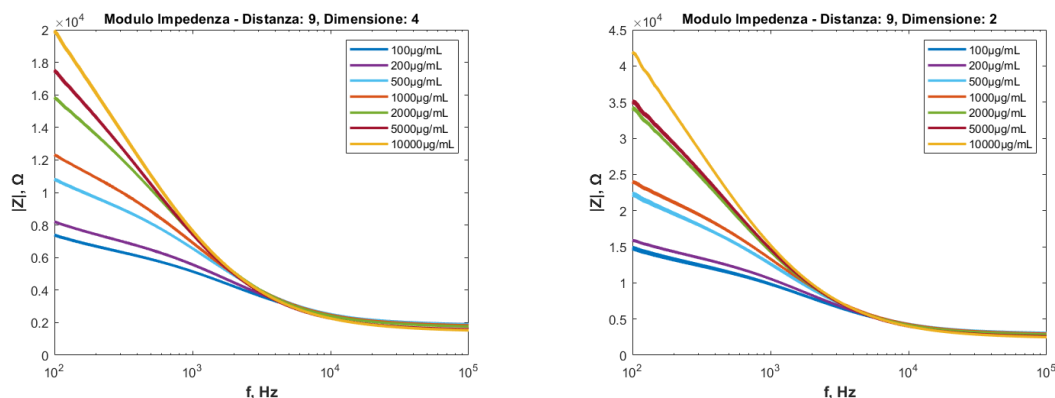


Figura 4.7: Andamenti delle curve di modulo di impedenza a diverse concentrazioni per due configurazioni di elettrodi. La superficie di ogni elettrodo è costituita, rispettivamente da (a) 4 pad, (b) 2 pad.

Come si può notare, anche in questo caso, la configurazione con 2 elettrodi mostra dei moduli di impedenza maggiori; tuttavia le curve relative a concentrazioni diverse sono meno distinguibili.

Dunque, per condurre le misure finali sulle soluzioni contenenti le molecole, è stata scelta la configurazione con 4 pad per ogni elettrodo risultante e una distanza

di 9 pad tra i centroidi degli elettrodi risultanti.

È bene sottolineare che, come è emerso a posteriori, in campagne di misure diverse e a parità di concentrazione delle molecole, le curve misurate non hanno mostrato gli stessi valori di impedenza. In altre parole, ripetendo le misure su soluzioni con le stesse concentrazioni, in momenti diversi, le curve non erano sovrapponibili. Nonostante ciò, all'interno della stessa campagna di misure, è sempre emersa una diminuzione del modulo di impedenza con la diminuzione di concentrazione. Una possibile giustificazione per questo comportamento si può ricercare nella natura dei fenomeni indagati. Infatti, trattandosi di fenomeni di interfaccia, nonostante si sia provato a standardizzare le misure e a introdurre procedure di pulizia tra le diverse misure, non si è potuto avere il massimo controllo sullo stato superficiale degli elettrodi, che potrebbero essere soggetti a fenomeni quali formazione di film superficiali oppure ad adsorbimento delle molecole sugli elettrodi, a causa di una loro probabile porosità.

Capitolo 5

Analisi Dati

5.1 Tecniche di analisi sui dati EIS

Come verrà discusso successivamente, i valori assoluti di modulo e fase hanno mostrato degli andamenti generali correlabili alla variazione di concentrazione delle molecole, specialmente se comparati ai dati raccolti nelle stesse campagne di acquisizione, tuttavia variavano in termini di valori assoluti tra trial diversi. Al fine di indagare in maniera più approfondita i fenomeni che si verificano durante la misura, è stato necessario applicare alcune tecniche avanzate per l'analisi dei dati acquisiti. Questo approccio è stato utile sia per estrarre features meno sensibili alle fluttuazioni inter trial, sia per comprendere a fondo il comportamento delle soluzioni all'interno della cella elettrochimica, al fine di ottimizzare ulteriormente il sistema di misura.

5.1.1 Modello equivalente

Una delle tecniche principali che viene applicata in combinazione con le misure EIS è la costruzione di un modello equivalente del sistema. Questo processo prevede di modellare i fenomeni che si verificano durante la misura con elementi concentrati che abbiano uno spettro di impedenza sovrapponibile a quello acquisito. Nel caso delle celle elettrolitiche, oltre ai tipici elementi concentrati come resistore, condensatore e induttore, si utilizzano altri elementi che non hanno un reale significato elettrico ma che derivano da un modello matematico utile a simulare i comportamenti elettrici di fenomeni fisici reali. Questi sono il Constant Phase Element (CPE) e l'elemento di Warburg (W).

Il CPE è caratterizzato dalla seguente impedenza complessa:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q(j\omega)^n},$$

dove i parametri che lo definiscono sono Q ed n . Come indicato dal nome, questa impedenza mantiene una fase costante, che però assume valori diversi da quella di un semplice condensatore o resistore. Si può notare come il comportamento di questo componente non sia definito univocamente, ma dipenda soprattutto da n , che può assumere i valori compresi nell'intervallo $[0,1]$.

Nello specifico, per:

- $n=0$, Z_{CPE} assume il comportamento di un elemento lineare perdendo la dipendenza dalla frequenza e dalla costante immaginaria j ;
- $n=1$, Z_{CPE} corrisponde all'impedenza di un condensatore.
- $n \in (0,1)$, Z_{CPE} assume un comportamento intermedio, più o meno distante dal comportamento agli estremi

L'elemento di Warburg, invece, ricade in un caso specifico di un CPE, in cui $n=0.5$ e dunque

$$Z_W = \frac{1}{\sqrt{Q(j\omega)}}.$$

Come si può ricavare, la fase di questo elemento è costante ed è pari a 45° . L'elemento di Warburg è utile per modellizzare fenomeni di diffusione o di trasporto di massa.

Di seguito si riporta una tabella riassuntiva degli elementi utilizzati per la costruzione di un modello elettrico equivalente.

Elemento	Fenomeno Modellizzato
R	Conduzione di cariche - Contatti della strumentazione
C	Doppio strato di carica
L	Induttanze della strumentazione
W	Fenomeni diffusivi o di trasporto
CPE	Fenomeni di natura intermedia

Tabella 5.1: Principali elementi concentrati utilizzati per la definizione di un modello elettrico equivalente di dati EIS e corrispettivo significato fisico.

In letteratura esistono modelli che simulano il comportamento di una cella elettrolitica contenente una soluzione ionica. Uno dei più utilizzati è costituito da 3 blocchi fondamentali: il primo modella il comportamento in bulk della soluzione, con un condensatore e un resistore correlati alla conducibilità; il secondo descrive i fenomeni di interfaccia, ed è costituito da un CPE; infine un terzo blocco correlato ai contatti elettrici e ai cavi, costituito da un resistore e un induttanza [16] [17]. Sebbene tale modello sia stato applicato per l'analisi dei dati e si sia rivelato

inadatto a modellizzare i dati acquisiti, ha costituito un punto di partenza utile per la comprensione dei fenomeni che si verificano.

La costruzione di un modello elettrico, infatti, costituisce una delle tecniche più rilevanti per l'analisi sui dati EIS, pertanto questa tecnica è stata implementata a partire da altri presupposti teorici e sperimentali, di cui si discuterà successivamente.

Per il fitting dei dati sperimentali con diversi modelli equivalenti è stato impiegato il tool EIS spectrum analyzer di Ragoisha G. A. Bondarenko A. S. [18].

5.1.2 Distribution of Relaxation Times

La Distribution of Relaxation Times (DRT) è una tecnica di analisi specifica per i dati EIS. La DRT prevede una trasformazione dei dati in frequenza nel dominio del tempo, analizzando le distribuzioni dei tempi del rilassamento del sistema. Infatti, una delle principali limitazioni del fitting dei dati con un modello equivalente, risiede nel fatto che non esiste un unico circuito che possa simulare il comportamento del sistema elettrochimico analizzato; inoltre le misure hanno mostrato alcune differenze in termini di dati grezzi tra diverse campagne di misure, con la conseguenza che un modello equivalente potesse fittare bene alcuni dati e non altri.

Più nello specifico, la DRT considera il sistema come se fosse costituito da una serie infinita di paralleli di resistori e condensatori, dove ogni ramo RC ha un diverso tempo caratteristico. Analogamente, esistono approcci che modellizzano i sistemi con rami di resistori e induttori, tuttavia, data la natura del sistema indagato, nel quale ci si aspetta che prevalgano fenomeni di trasporto di carica, formazione di doppi strati di carica ed altri fenomeni di superficie, la classificazione dei fenomeni come resistivo-capacitivo risulta essere quella più adatta.

Dal punto di vista matematico, il problema ricade nella risoluzione di un integrale di Fredholm, nel quale una funzione nota viene calcolata come integrale tra un kernel e una funzione di distribuzione.

$$z(x) = \int_a^b K(x, y) f(y) dy$$

In questo caso il kernel si ricava dalla funzione di trasferimento di un singolo elemento RC e la funzione nota è rappresentata dai dati sperimentali. Per cui, nel caso di un sistema resistivo-capacitivo, l'integrale diventa:

$$Z(j\omega) = R_0 + \int_0^\infty \frac{\tilde{h}(\tau)}{1 + j\omega\tau} d\tau$$

Si tratta dunque di un problema inverso, in cui l'incognita è proprio la funzione della distribuzione dei tempi $\tilde{h}(\tau)$ associata ad ogni elemento RC.

Dal momento che i dati vengono analizzati sulla scala logaritmica, viene introdotto il seguente cambio di variabile

$$u = \ln(\tau),$$

da cui

$$Z(j\omega) = R_0 + \int_{-\infty}^{\infty} \frac{h(\tau)}{1 + j\omega\tau} d\ln\tau = R_0 + R_P \int_{-\infty}^{\infty} \frac{g(\tau)}{1 + j\omega\tau} d\ln\tau$$

dove $h(\tau)$ è la funzione $\tilde{h}(\tau)$ a seguito del cambio di variabile, passando alla scala logaritmica, e $g(\tau)$ è la funzione $h(\tau)$ normalizzata in maniera tale che l'area totale dell'integrale sia pari a 1.

La risoluzione di questa funzione corrisponde a un problema inverso e mal posto. Per questo motivo esistono diversi approcci per stabilizzare la risoluzione del problema, come la normalizzazione di Tikhonov, che riduce la norma L2 della funzione residuale. Per la normalizzazione si può impostare un parametro ϵ di penalità, se si sceglie un valore eccessivamente alto aumenta la norma ammissibile della funzione residuale, viceversa se troppo basso si rischia un fitting stretto sui dati, con il rischio che il modello sia più suscettibile al rumore.

In uscita si ottengono dunque un vettore di scale temporali τ e un vettore γ che indica il peso dei fenomeni associati ad ogni scala temporale [19].

Tale approccio risulta essere efficace se si possono individuare regioni ben distinte lungo l'asse delle scale temporali. Infatti, ogni fenomeno fisico che avviene durante la misura ha una scala temporale specifica, dunque, idealmente, si possono isolare i contributi dei principali fenomeni fisici.

Una volta individuate le scale temporali dei fenomeni che si verificano, è possibile ipotizzare la natura dei fenomeni. Per validare tale ipotesi, è possibile fittare i dati con un modello elettrico equivalente che modella i fenomeni individuati.

Per l'implementazione dell'analisi DRT è stato impiegato il tool sviluppato dal gruppo di Ciucci Lab [20]

5.2 Esperimenti finali

5.2.1 Andamenti qualitativi delle misure al variare delle concentrazioni

Per testare la validità della EIS, sono state condotte delle misure conclusive secondo il seguente protocollo sperimentale. Sono state formate delle soluzioni contenenti Enalapril alle seguenti concentrazioni: 2mg/mL, 1mg/mL, 500 μ g/mL, 200 μ g/mL, 100 μ g/mL, 50 μ g/mL, in un buffer di NaCl 50 mM. I valori delle concentrazioni sono stati scelti al fine di essere compatibili con i valori di rilascio giornaliero

in vitro delle molecole di Enalapril da parte di nDS[8]. Successivamente sono state eseguite le misure EIS su un volume pari a 1mL per ogni concentrazione; ogni misura prevedeva 10 spettroscopie in cascata per valutare la stabilità del sistema. Le misure condotte a seguito della sostituzione della soluzione nel volume hanno mostrato un andamento "transitorio", caratterizzato da una dispersione delle curve che si riduceva con l'incremento del numero delle ripetizioni. Per questo motivo le prime misure sono state scartate, fino a quando tale dispersione non fosse trascurabile. Questa scelta risulta essere in linea con l'eventuale applicazione finale, dal momento che ci si aspetta che il contatto tra gli elettrodi e la soluzione si mantenga stabile e non ci siano eventi come l'asciugatura degli elettrodi tra un trial e il successivo. Prima di passare alla concentrazione successiva il setup veniva pulito con acqua deionizzata. Tale protocollo è stato ripetuto per 3 volte per valutare la ripetibilità delle misure. Inoltre, tali dati sono stati confrontati anche con quelli acquisiti durante la fase di studio della configurazione del setup, di cui al paragrafo 4.2, caratterizzati dallo stesso setup sperimentale, che verrà indicato come trial 0. La scelta di includere nello studio conclusivo anche i dati relativi allo studio del setup è dettata dal fatto che, come si discuterà, le prestazioni del sistema nel distinguere le concentrazioni delle molecole è peggiorato con l'utilizzo, dunque i dati preliminari sono ritenuti di qualità superiore rispetto a quelli relativi alle campagne successive. Sebbene per tutti i dati confrontati il protocollo sperimentale rimanga invariato, gli intervalli di concentrazioni testate non sono completamente sovrapponibili. È bene sottolineare che i diversi trial sono stati eseguiti in giorni diversi. Questo aspetto potrebbe essere stato determinante nella non ripetibilità delle misure.

Per ogni misura condotta, sono stati analizzati gli andamenti medi di modulo, fase, parte immaginaria dell'impedenza; inoltre è stata condotta un'analisi DRT e sono stati valutati i parametri estratti da modelli equivalenti del sistema. Vengono riportati i moduli delle impedenze per ogni concentrazione e per ogni trial.

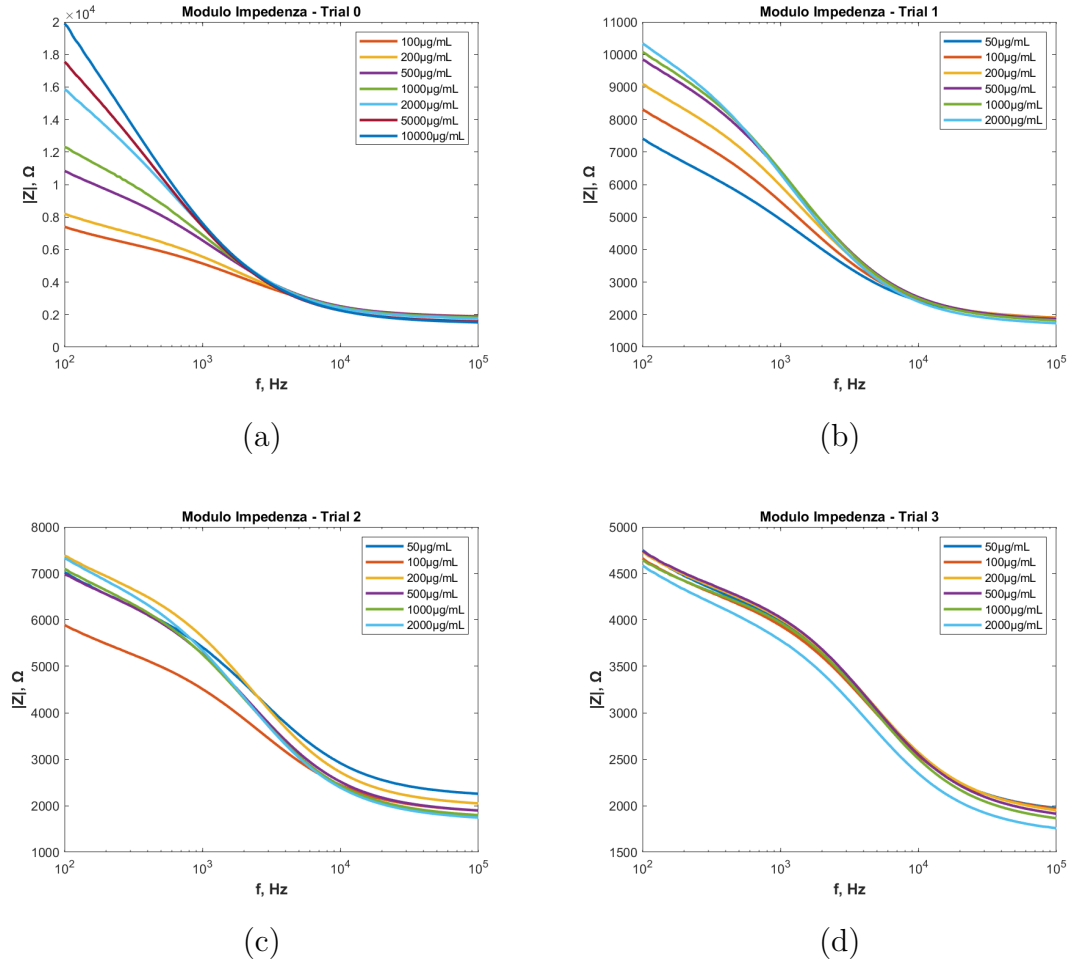


Figura 5.1: Andamento dei moduli dell'impedenza al variare della concentrazione. Confronto tra i diversi trial.

Il confronto dei moduli di impedenza dei sistemi valutati a diverse concentrazioni mette in luce uno degli aspetti fondamentali emerso dallo studio: le misure non sono infatti ripetibili tra giorni diversi. Se nei primi trial, le curve sono ben distinguibili a basse frequenze, non lo sono più nei successivi. La principale causa indiziata è da ricercare nello stato degli elettrodi. Gli elettrodi utilizzati, infatti, a seguito di ogni trial, venivano asciugati e conservati a contatto con l'aria. Questo aspetto potrebbe aver favorito delle modifiche interfacciali, come adsorbimento di molecole residuali dalla pulitura o formazione di film superficiali. Più avanti verranno discussi altri aspetti che sarebbero a sostegno di questa tesi.

Anche nel caso della fase, si evince chiaramente come il sistema perda la capacità di distinguere le diverse concentrazioni testate, cosa che, invece, avviene in maniera ottimale durante i primi trial.

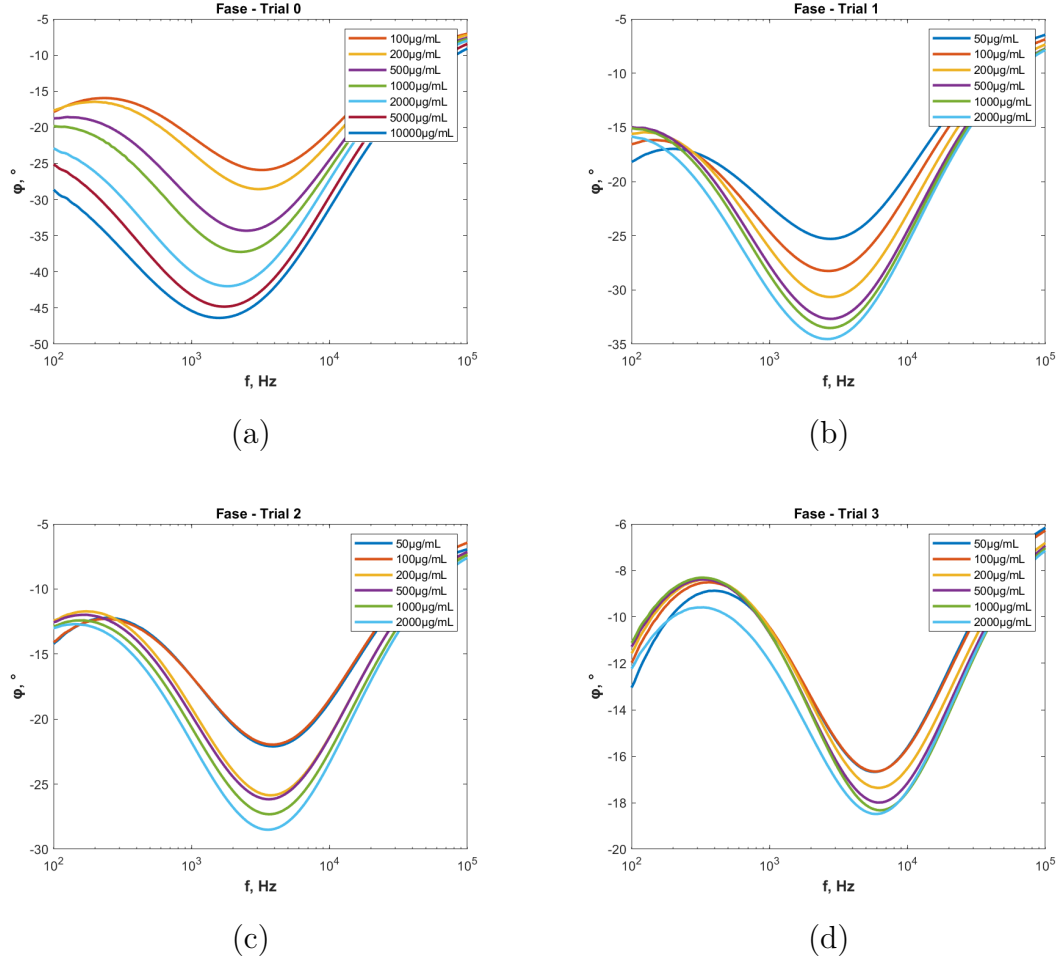


Figura 5.2: Andamento della fase dell'impedenza al variare della concentrazione. Confronto tra i diversi trial.

Come già discusso, l'influenza della concentrazione delle molecole sembrerebbe essere maggiore sulla formazione di doppi strati di carica all'interfaccia. Al contrario l'effetto sulla conducibilità sembrerebbe essere meno evidente. Tale ipotesi è stata formulata notando la maggiore dispersione delle curve alle basse frequenze rispetto alle alte, dove dominano fenomeni di bulk. Per questo motivo, sono stati valutati anche gli andamenti delle impedenze immaginarie, in quanto maggiormente informative rispetto a tali fenomeni di interfaccia. Di seguito vengono riportati i risultati.

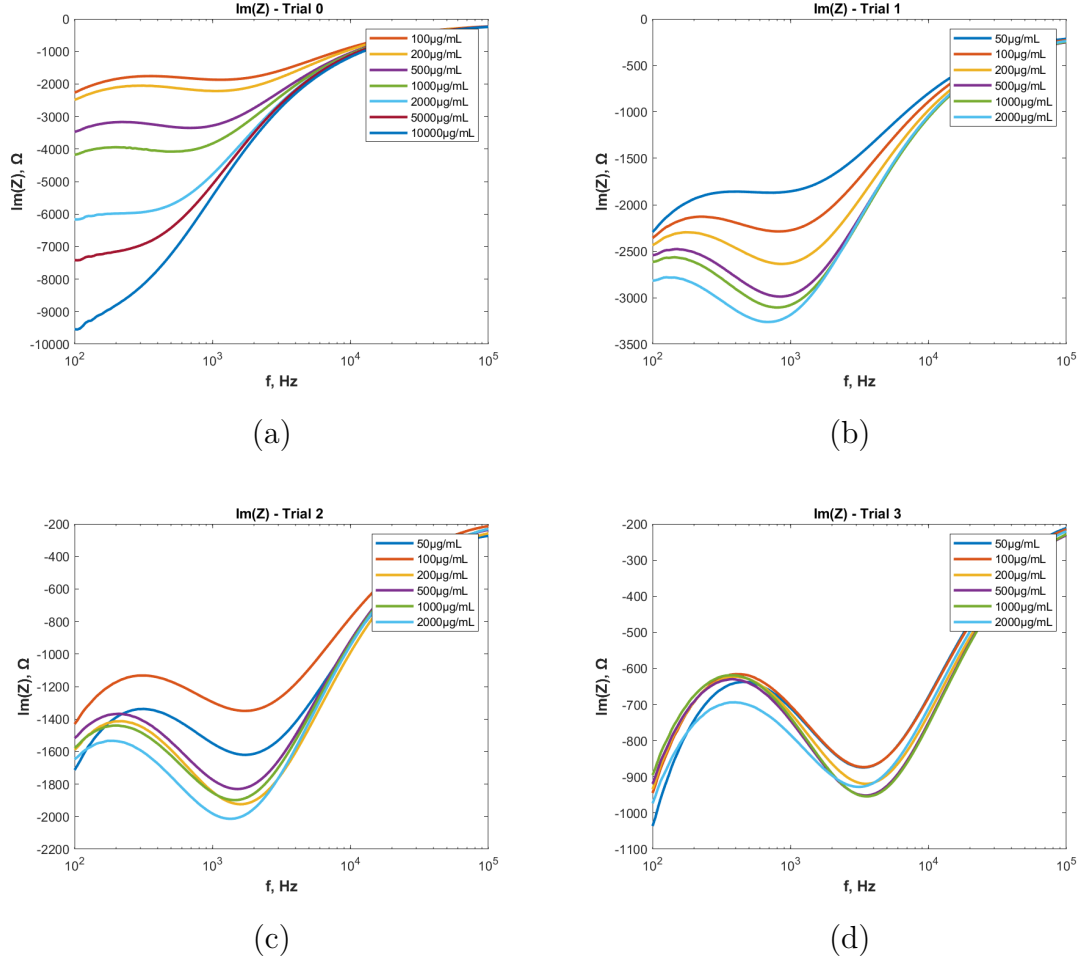


Figura 5.3: Andamento delle curve di impedenza immaginaria variare della concentrazione. Confronto tra i diversi trial.

Si noti come oltre allo schiacciamento delle curve e alla riduzione dei moduli di impedenza, si verifichi anche un cambiamento nella morfologia delle curve. Questo comportamento dimostra proprio un cambio nei tempi caratteristici del sistema.

I dati sperimentali sono stati analizzati anche con la DRT. In uscita da tale analisi, si ottengono delle curve simili come quelle riportate di seguito.

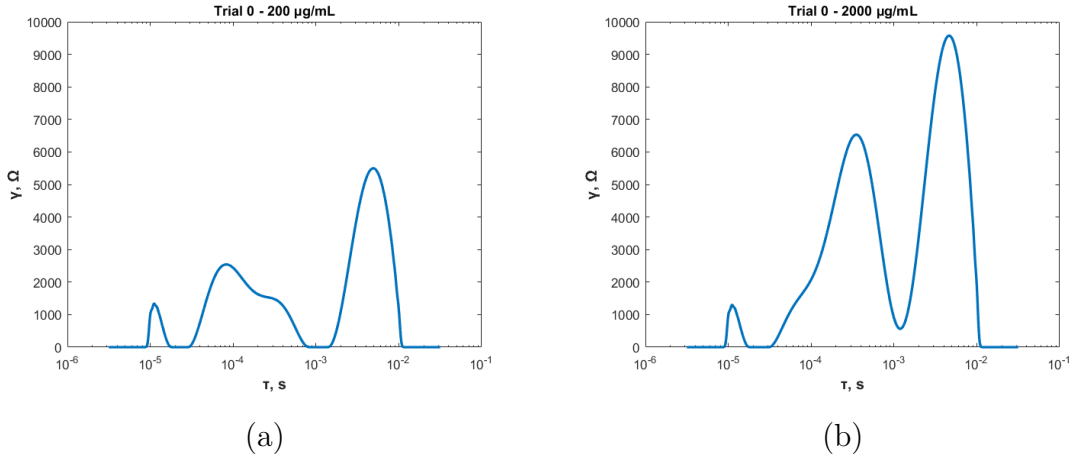


Figura 5.4: Confronto tra le curve DRT a concentrazioni diverse, rispettivamente $200 \mu\text{g/mL}$ e $2000 \mu\text{g/mL}$.

L'asse delle scale temporali che si ottiene dalla DRT è dipendente dall'intervallo di frequenze analizzato nella EIS. Le misure EIS eseguite hanno un intervallo di frequenze compreso tra i 100 Hz e i 100 kHz. La scelta di indagare il sistema è così giustificabile: al di sotto del limite inferiore, infatti, si richiederebbe di rendere eccessivamente sensibile il sistema a fenomeni locali che rispondono ad impulsi a bassa frequenza; mentre il limite superiore è sufficientemente alto per valutare il sistema nella regione conduttiva, senza entrare in regioni in cui dominano fenomeni inuttivi legati ai contatti della strumentazione che introdurrebbero rumore. L'asse delle scale temporali che si ottiene in uscita dall'analisi DRT va dunque dai 10^{-5} s ai 10^{-2} s.

Le analisi condotte hanno mostrato che si possono individuare 3 regioni in tutti i trial. È bene sottolineare che i tempi caratteristici del sistema, specialmente per valori più elevati, dipendono anche dalla geometria del sistema indagato; motivo per il quale non esiste un metodo univoco per attribuire una regione ad un preciso fenomeno fisico. Inoltre, i risultati in letteratura descrivono maggiormente il comportamento di componenti come batterie o celle di combustione [19]. Ad ogni modo, a partire dalla letteratura e iterando diverse analisi, sono state avanzate alcune ipotesi riguardo le corrispondenze tra le scale temporali e i fenomeni fisici.

Le regioni individuate sono le seguenti:

- Picco attorno ai 10^{-5} s. Tale picco è rappresentativo dei fenomeni caratterizzati da una piccola scala temporale, e che dunque prevalgono alle alte frequenze. In particolare la tale regione è informativa rispetto alla conducibilità del sistema. Infatti, quando l'impulso di eccitazione è caratterizzato da un'alta frequenza, le molecole cariche non hanno sufficientemente tempo per rispondere ai cambi di polarità degli elettrodi, facendo dominare i fenomeni di bulk. A dimostrazione

di questa ipotesi, si può notare che il contributo di impedenza relativo a questa regione è pressochè costante tra tutti i trial e mostra piccole variazioni correlate alla concentrazione delle molecole farmacologiche.

- Regione centrale compresa tra circa $5 \cdot 10^{-5} s$ e $10^{-3} s$. A questa regione vengono attribuiti i fenomeni di interfaccia come la formazione di uno strato di carica, fenomeni di riorganizzazione dello strato o di adsorbimento. Si può notare, infatti, come tale regione abbia, rispetto all'asse delle ascisse, un'ampiezza maggiore rispetto alle altre. Ciò suggerisce che non ci sia un singolo fenomeno che si verifichi a quella scala temporale. La formazione di strati di cariche sugli elettrodi, in particolare, è compatibile con la diminuzione delle frequenza di eccitazione, che permette alle molecole di organizzarsi in risposta ai cambi di polarità degli elettrodi.
- Picco tra $10^{-3} s$ e $10^{-2} s$. Questa regione è compatibile con fenomeni di diffusione e di trasporto di carica. Per grandi scale temporali dell'eccitazione, infatti, è ipotizzabile che le molecole riescano a passare e diffondere all'interno delle porosità degli elettrodi.

Uno degli aspetti positivi di tale analisi risiede nel fatto che la morfologia delle curve DRT si sia rivelata costante tra tutti i trial e abbia mostrato variazioni relative simili tra le diverse campagne al variare della concentrazioni, nonostante i dati grezzi di modulo e fase non fossero sovrapponibili. Ad esempio, la regione che è risultata maggiormente influenzata dalla variazione di concentrazione delle soluzioni è proprio la regione centrale. Come già detto, per queste scale temporali, si assume che si manifestino fenomeni di interfaccia, pertanto l'aumento di concentrazione delle molecole può avere un effetto sull'impedenza attribuibile a questa regione.

Per verificare la validità di tali ipotesi riguardo la natura dei fenomeni che si manifestano durante le misure EIS, è stato proposto un modello elettrico equivalente che modella proprio questi fenomeni. La costruzione di un modello equivalente a seguito dell'interpretazione fisica dei fenomeni a partire dall'analisi DRT costituisce una procedura che trova largo impiego anche in letteratura [21]. Nel caso delle analisi preliminari DRT, sono state fatte le seguenti associazioni tra elementi elettrici e fenomeni fisici: la conducibilità del sistema può essere modellizzata come un resistore, i fenomeni di interfaccia possono essere simulati come un parallelo tra un CPE e un resistore, infine i fenomeni di trasporto di massa e di diffusione vengono simulati da un elemento di Warburg. Pertanto il circuito elettrico equivalente potrebbe essere schematizzato dalla serie di questi blocchi.

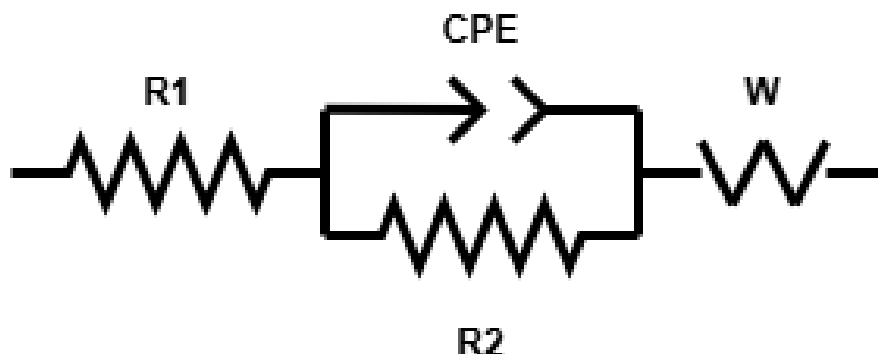


Figura 5.5: Modello elettrico equivalente.

Tale modello è stato valutato con un fitting dei dati sperimentali. Per il fitting è necessario definire il modello elettrico e definire la funzione da minimizzare per il fitting. È stato impiegato l'algoritmo di Powell per la minimizzazione della funzione d'errore, con un massimo di 500 iterazioni. In uscita si ottengono i valori dei parametri concentrati. Il modello si è dimostrato robusto per tutti i dati acquisiti, arrivando sempre a convergenza, nonostante un margine di errore variabile. Inoltre, i parametri ottenuti si sono rivelati coerenti con il significato fisico. Infatti i valori assunti dai parametri estratti dal fitting, rimangono nello stesso range di grandezza; inoltre i valori assunti da tali parametri sono riconducibili a valori estraibili dai dati sperimentali e correlati ai fenomeni fisici. Tutto ciò dimostrerebbe come il fitting dei dati non sia stato solamente una semplice convergenza del modello matematico. L'aderenza del modello equivalente al fenomeno fisico verrà discussa di seguito.

5.2.2 Estrazione di metriche per l'analisi

Parametri dalle curve

Dalle misure condotte sono state estratte delle metriche per valutare la dipendenza del sistema dalla concentrazione.

Come già discusso, una delle variabili che risente della concentrazione delle molecole è la conducibilità. Questa proprietà emerge ad alte frequenze, pertanto sono stati considerati i moduli di impedenza alla stessa frequenza, nell'intorno dell'estremo destro dell'intervallo di frequenze.

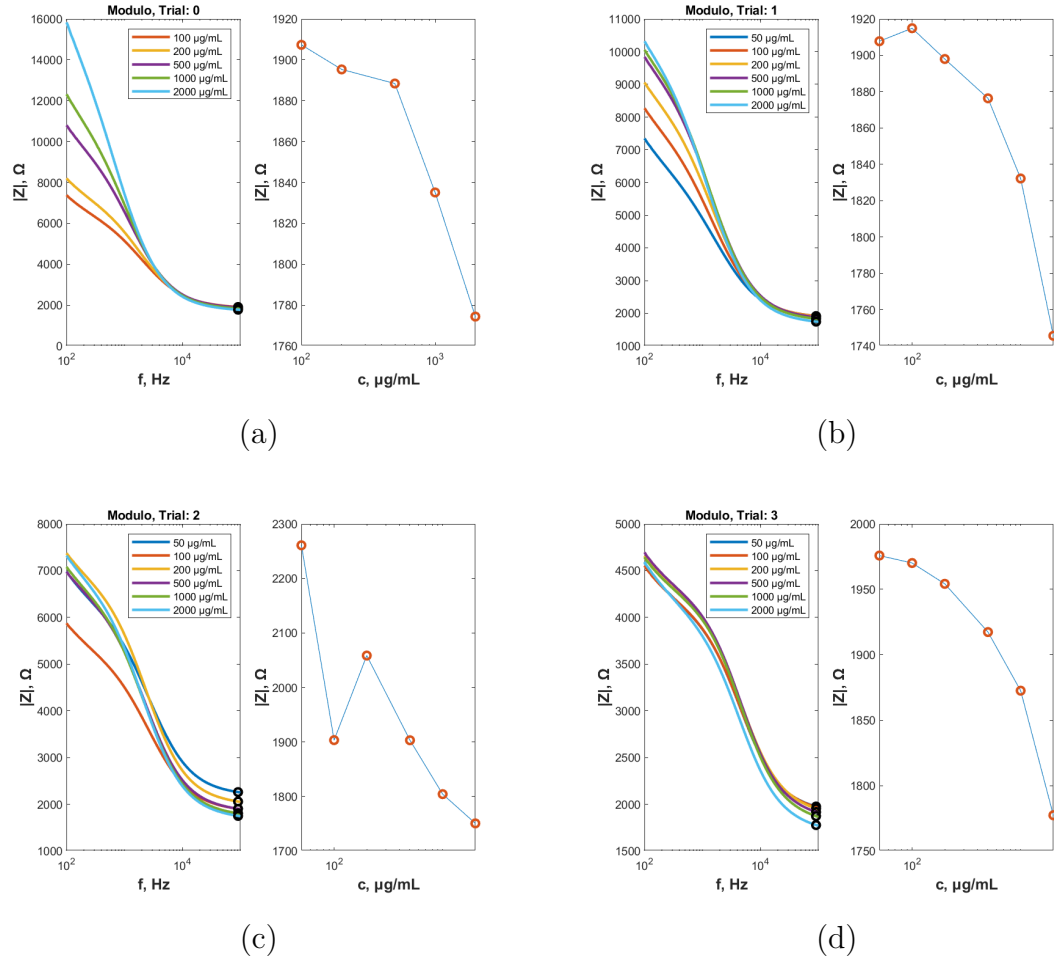


Figura 5.6: Estrazione dei valori del modulo di impedenza ad alte frequenze

Fatta eccezione per pochi punti, emerge chiaramente il trend di diminuzione di impedenza con l'aumento della concentrazione. Infatti, le molecole analizzate hanno una carica netta, dunque all'aumentare della concentrazione aumenta anche la conducibilità.

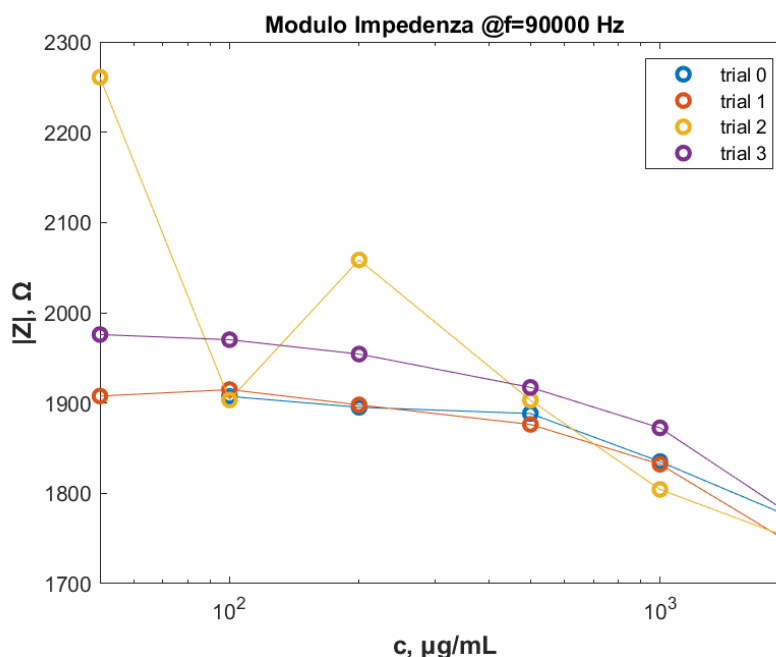


Figura 5.7: Confronto tra gli andamenti dei moduli di impedenza inter trial.

In Figura vengono sovrapposte le curve relative all'andamento dei moduli di impedenza tra i diversi trial.

Come si può evincere, i punti, oltre a mostrare una tendenza di diminuzione con la concentrazione, mostrano lo stesso ordine di grandezza. Ancora una volta questo elemento dimostra che in questo range di frequenze, il modulo dipende quasi esclusivamente dalla conducibilità della soluzione, che risente per gran parte della conduttività del buffer della soluzione, il quale è lo stesso per tutte le soluzioni e che ha una concentrazione molto maggiore rispetto a quella delle molecole.

Come ipotizzato, la concentrazione delle molecole ha un effetto sui fenomeni di interfaccia con gli elettrodi. L'effetto di questo fenomeno si può riscontrare dall'andamento della fase della cella elettrochimica.

Analogamente a quanto fatto per l'impedenza, si confrontano i valori estratti dalle curve relative alla fase. In questo caso si confrontano i valori minimi, che, in ogni trial si attestano intorno allo stesso valore di frequenza. Tuttavia la frequenza associata ai minimi si sposta verso frequenze più alte da un trial al successivo.

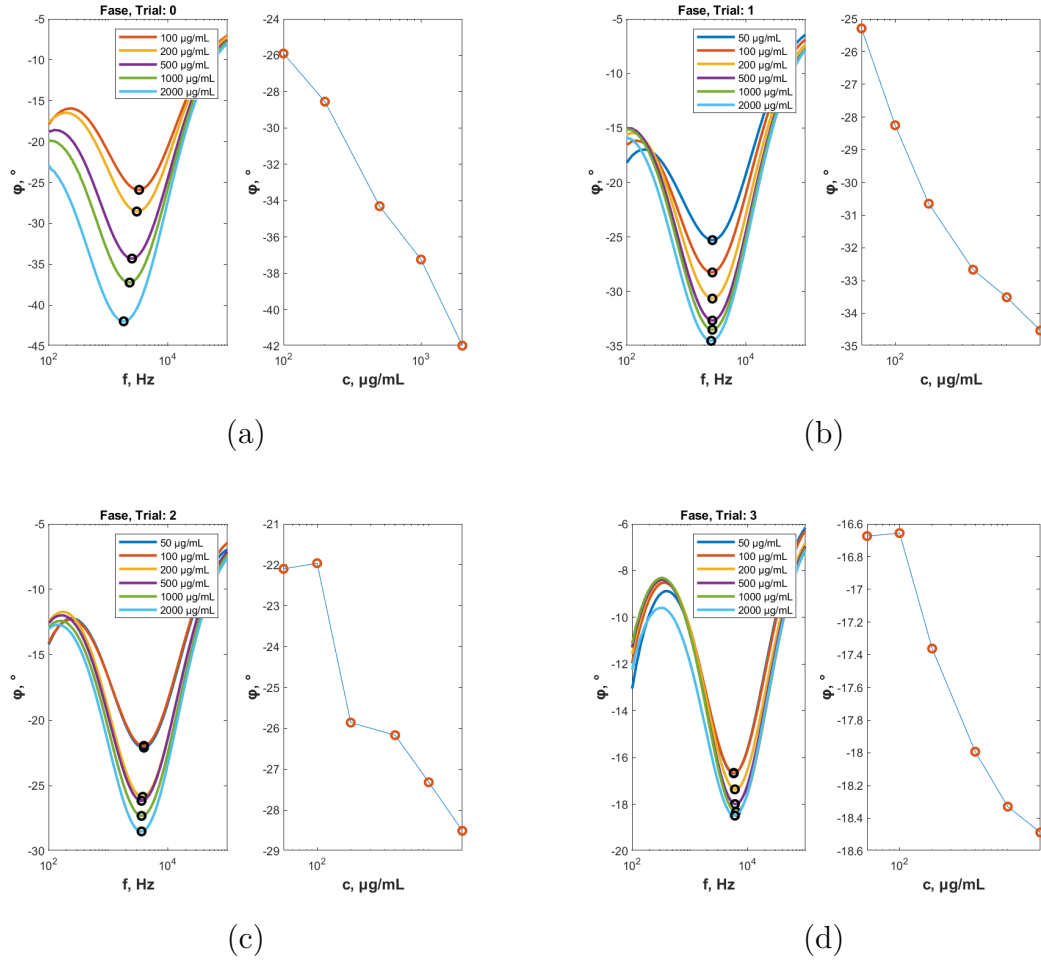


Figura 5.8: Estrazione dei valori minimi della fase

Sebbene questo parametro vari con lo stesso trend all'interno dello stesso trial, i valori assunti non sono sovrapponibili.

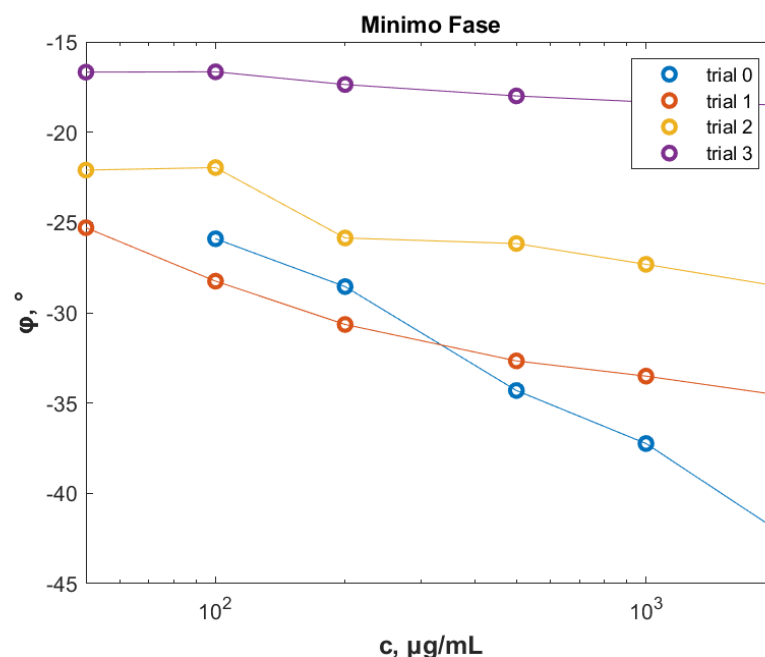


Figura 5.9: Confronto tra gli andamenti dei minimi delle fasi tra i diversi trial

Parametri dall'analisi DRT-Modello equivalente

La morfologia delle curve DRT ottenute si è dimostrata anch'essa sensibile alle variazioni di concentrazioni, con cambiamenti confrontabili tra i diversi trial. Le differenze principali sono riscontrabili nella regione centrale ed in quella destra. Come accennato, la regione centrale è stata associata a fenomeni di interfaccia tra la soluzione e gli elettrodi, con una costante temporale compresa tra $5 \cdot 10^{-5} s$ e $10^{-3} s$. All'interno delle misure dello stesso trial, si nota come questa regione diminuisca la sua area relativa rispetto all'area totale e come il baricentro di questa regione si sposti verso costanti temporali minori, al diminuire della concentrazione, come si può evincere qualitativamente della Figura 5.2.1.

Questi parametri sono stati quantizzati e confrontati nella Figura seguente.

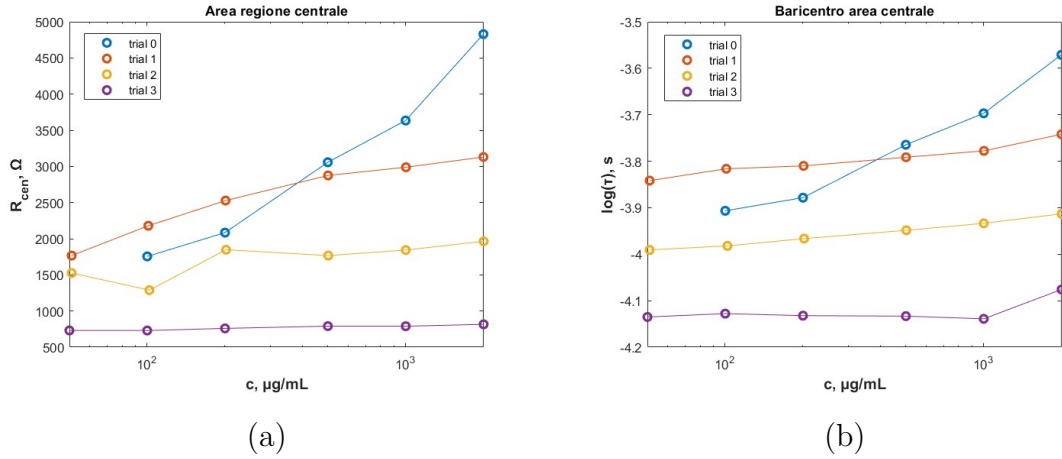


Figura 5.10: Andamenti dell'area(a) e del baricentro(b) della regione centrale delle curve DRT al variare della concentrazione.

In particolare l'area della regione è stata calcolata come segue:

$$A = \int_{5 \cdot 10^{-5}}^{10^{-3}} \gamma(\ln(\tau)) d\ln(\tau)$$

Analogamente il baricentro come:

$$A = \frac{\int_{5 \cdot 10^{-5}}^{10^{-3}} \gamma(\ln(\tau)) \ln(\tau) d\ln(\tau)}{\int_{5 \cdot 10^{-5}}^{10^{-3}} \gamma(\ln(\tau)) d\ln(\tau)}$$

dove $\gamma(\ln(\tau))$ è la curva dell'impedenza associata ad ogni costante temporale τ .

Per quanto concerne la regione destra, caratterizzata da tempi caratteristici compresi nell'intervallo tra $10^{-3}s$ e $10^{-2}s$, questa ha mostrato una variazione del valore massimo al variare delle concentrazioni nel primo trial, rimanendo pressochè invariato nei trial successivi. Questo comportamento è in linea con l'ipotesi di attribuire questa regione a fenomeni diffusivi, come quelli all'interno delle porosità degli elettrodi. Se prima del primo trial, gli elettrodi non erano stati sottoposti ad altre misure, e dunque tali porosità erano disponibili per accogliere le molecole della soluzione, i trial successivi mostrano una saturazione di tali regioni, mostrando un contributo via via minore di ipedenza in questa regione. Tale saturazione potrebbe essere dovuta, come detto, ad eventuali residui di roluzione, a seguito della pulizia alla fine di ogni trial. Di seguito si mostra l'andamento del valore massimo di tale regione.

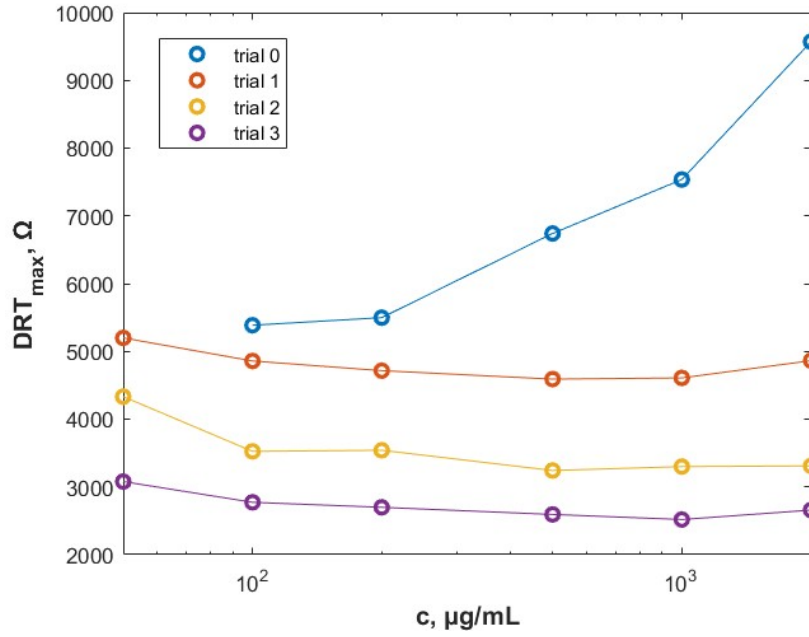


Figura 5.11: Valori massimi della regione associata ad alte scale temporali dall'analisi DRT per le diverse concentrazioni e trial.

Per quanto riguarda il modello equivalente, come anticipato, questo è risultato particolarmente robusto e in grado di fittare tutte le curve proposte.

L'impedenza di tale modello equivalente vale:

$$Z = R1 + \frac{R}{RQ(j\omega)^n} + \frac{W}{\sqrt{j\omega}}$$

Per valutare l'errore dovuto alla modellizzazione, è stato considerato il modulo dell'impedenza equivalente, calcolato nelle stesse frequenze sperimentali, ed è stato confrontato con i dati sperimentali. In particolare l'errore è stato definito come:

$$err_i = \frac{|Z_i^{sper} - Z_i^{mod}|}{Z_i^{sper}}$$

dove Z^{sper} è il vettore contenente il modulo delle impedenze sperimentali, e Z_i^{mod} è il vettore contenente i moduli delle impedenze ricavate dal modello equivalente.

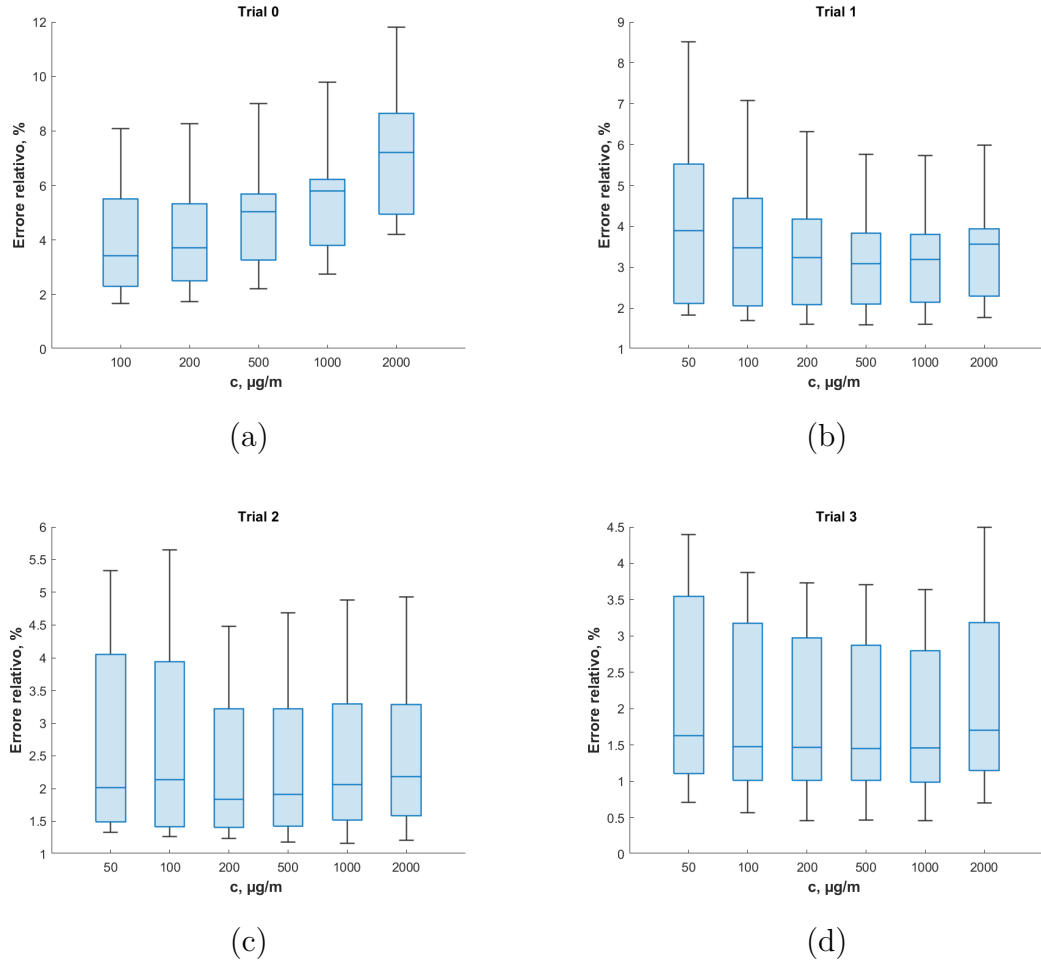


Figura 5.12: Errori relativi del modello equivalente, rispettivamente per i trial 0 (a), 1 (b), 2 (c), 3 (d)

Si può notare come l'errore medio per ogni punto sia inferiore al 10%, inoltre il l'errore diminuisce per i trial successivi. Pertanto, i parametri ricavati dal fitting sono confrontabili tra i diversi trial.

Il primo elemento del modello equivalente è la resistenza che simula la conduttività, $R1$. Di seguito viene confrontato il suo valore tra i diversi trial e concentrazioni.

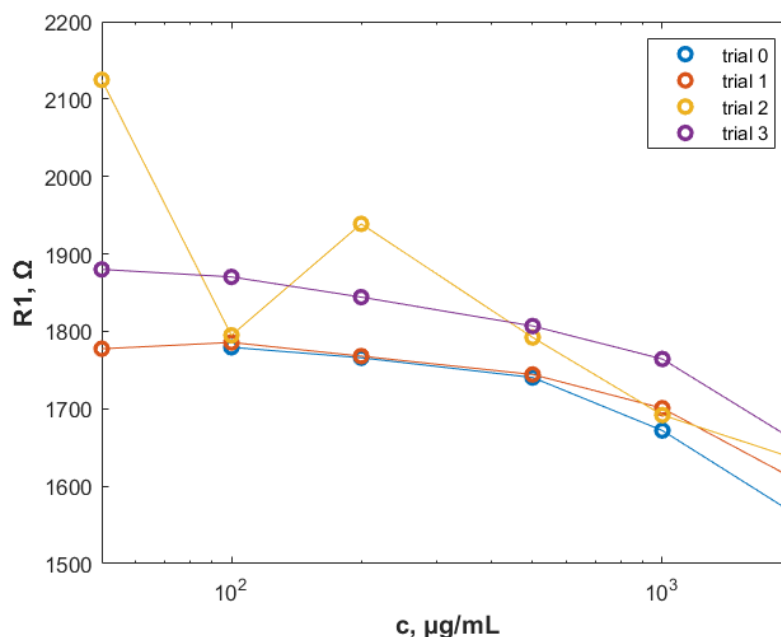


Figura 5.13: Andamento dei valori di R1 al variare della concentrazione e tra i diversi trial.

Si noti come questo grafico sia molto simile a quello mostrato in Figura 5.7. Questa similitudine non è casuale, infatti in quest'ultimo grafico si confronta i valori di impedenza ad una frequenza elevata, dove si rilevano i fenomeni di conducibilità. Questa similitudine dimostra che il blocco R1 modella in maniera molto valida questo tipo di fenomeni.

Riguardo al blocco costituito dal parallelo tra CPE e R2, questo è stato proposto per modellizzare i fenomeni di interfaccia, che hanno costante temporale compresa nella regione centrale della curva DRT individuata. Uno dei parametri più significativi è l'esponente n dell'impedenza associata al CPE. Tale parametro, infatti, determina quanto il comportamento del CPE sia simile a quello di un condensatore o di elemento lineare.

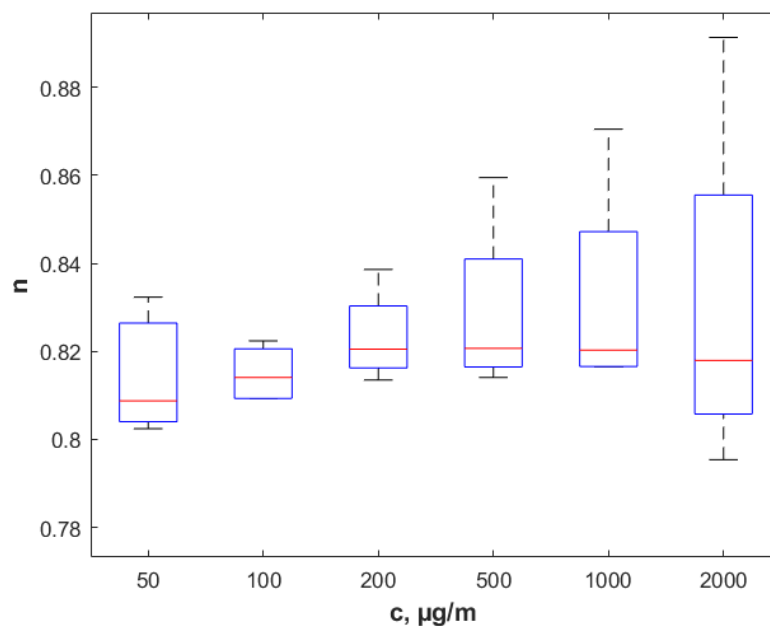


Figura 5.14: Confronto tra i valori assunti da n per le diverse concentrazioni e i diversi trial.

Come si può evincere dai grafici riportati, il valore di tale parametro rimane costante pressochè per tutte le concentrazioni e per tutti i trial, con un valore intorno a 0.8. Questo valore è molto vicino a 1, dunque si può concludere che il CPE abbia un comportamento simile a quello di un condensatore. Il comportamento capacitivo del CPE dimostrerebbe come all'interfaccia degli elettrodi, si formi uno strato di cariche.

L'altro elemento costitutivo del blocco relativo ai fenomeni di interfaccia è il resistore R_2 . Questo elemento simulerebbe l'opposizione dello strato di molecole al passaggio di cariche elettriche.

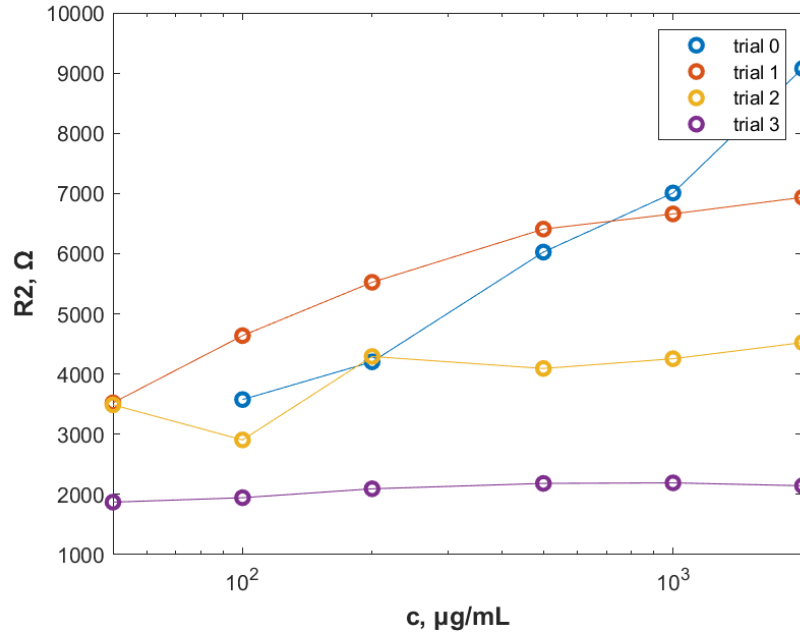


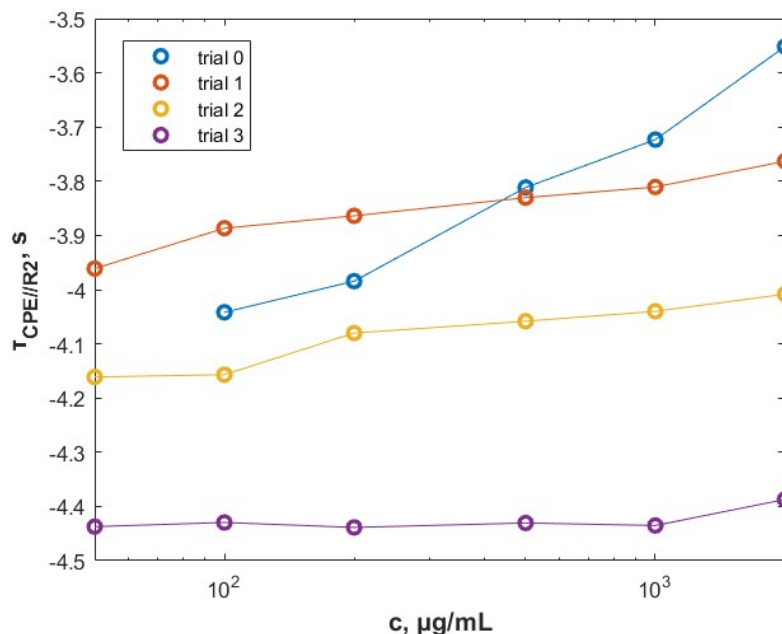
Figura 5.15: Andamento dei valori di R_2 al variare della concentrazione e tra diversi trial.

Si può notare come per tutti i trial, questo parametro mostri un trend di aumento all'aumentare della concentrazione. Tale comportamento rafforza l'ipotesi del comportamento capacitivo per le scale temporali intermedie. Infatti all'aumentare della concentrazione si verifica un aumento dell'accumulo di molecole all'interfaccia degli elettrodi, che si oppone al passaggio di carica. Questo parametro, ottenuto dal fitting numerico, è correlabile ad un parametro relativo all'analisi DRT. In particolare queste curve sono direttamente confrontabili con le curve mostrate in Figura 5.10 (a), dove vengono riportati i valori dell'area della regione centrale individuata con l'analisi DRT.

Un parametro che si può estrarre per valutare complessivamente la modellizzazione del blocco CPE- R_2 è la valutazione del tempo caratteristico. Analogamente a quanto vale per un parallelo tra un resistore e un condensatore, il tempo caratteristico del parallelo di un resistore e un CPE si può scrivere come:

$$\tau = (RQ)^{\frac{1}{n}}$$

Di seguito viene riportato l'andamento di questo parametro.



Andamenti dei tempi caratteristici dei blocchi CPE//R2 per le diverse concentrazioni e i diversi trial.

Anche questa curva è correlabile ad un altro parametro di cui si è discusso, ovvero il baricentro della regione centrale delle curve DRT, riportato in Figura 5.10 (b).

Si può concludere che i fenomeni che si verificano per una scala temporale intermedia nelle curve DRT, sono modellizzabili con buona approssimazione con un blocco costituito da un CPE in parallelo ad un resistore e che questi fenomeni siano riconducibili alla formazione di strati di carica a ridosso degli elettrodi.

Infine l'ultimo elemento del modello equivalente è l'elemento di Warburg. Esso simulerebbe i fenomeni diffusivi o di trasporto di massa del sistema.

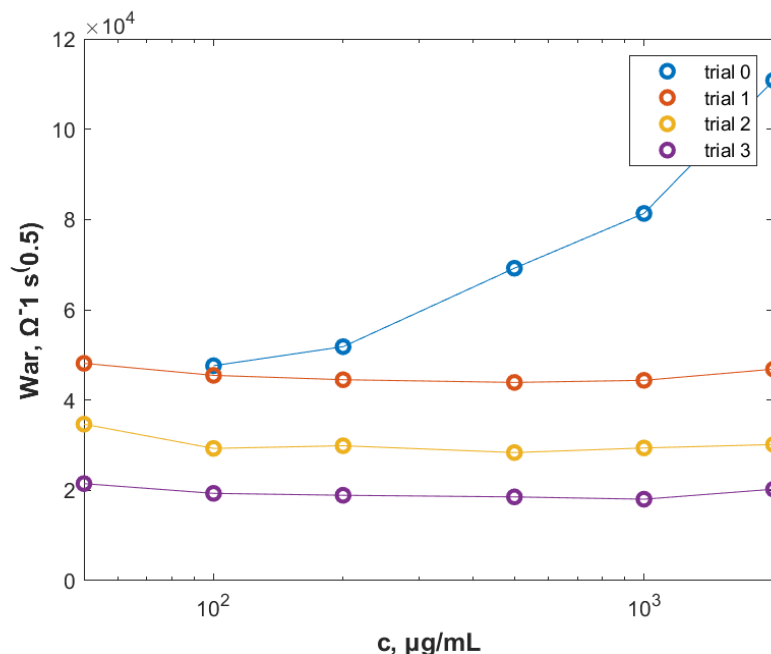


Figura 5.16: Andamenti del parametro di Warburg per le diverse concentrazioni e i diversi trial.

Anche in questo caso l'andamento è correlato qualitativamente al grafico in Figura 5.11, che mostra i valori massimi delle regioni che vengono modellizzati proprio dall'elemento di Warburg. Ancora una volta, questa confrontabilità irrobustirebbe l'ipotesi secondo la quale i fenomeni relativi alla regione con scala temporale più alta siano fenomeni diffusivi, che si potrebbero manifestare ad esempio all'interno delle porosità degli elettrodi.

5.2.3 Conclusioni sui dati raccolti

In conclusione, le misure eseguite sulle molecole di Enalapril mostrano dei trend sovrapponibili tra i diversi trial, in funzione della concentrazione. In particolare, per quanto riguarda i parametri direttamente estraibili dai dati sperimentali, si può notare un'influenza della concentrazione sulla conducibilità della soluzione, che si manifesta ad alte frequenze. Il modello elettrico proposto permetterebbe, invece, di interpretare la natura dei fenomeni che si manifestano durante l'esecuzione della misura. I parametri ottenuti da tale modello sono, infatti, correlabili ad altri parametri estraibili dai stessi dati sperimentali. È bene ribadire come i parametri relativi al modello equivalente e quelli relativi alle analisi DRT siano stati ottenuti da analisi differenti, in particolare quelli ricavati dalla DRT rispecchiano un comportamento fisico e sono completamente svincolati dal fitting del modello

equivalente. Questa corrispondenza tra parametri dalla diversa genesi rafforzerebbe l'ipotesi per la quale i fenomeni simulati dal modello equivalente siano corretti.

Di seguito vengono riportati i valori di correlazione di Pearson, calcolata tra i parametri estratti dal modello equivalente e dai parametri con cui sono stati messi a confronto in precedenza.

	R1 - $ Z $	R2 - A.c.	$\tau_{\text{CPE-R2}}$ - B.c.	War - Max A.d.
Trial 1	0.9973	0.9997	0.9998	0.9993
Trial 2	0.9999	0.9993	0.9834	0.9525
Trial 3	0.9996	0.9995	0.9716	0.9492
Trial 4	0.9985	0.8836	0.9862	0.8792

Tabella 5.2: Correlazione di Pearson tra i parametri del modello equivalente e i parametri estratti dalle curve sperimentali o dall'analisi DRT. Le espressioni A.c., B.c, A.d. indicano rispettivamente Area centrale, Baricentro centrale, Area destra, con riferimento alle regioni individuate nelle curve DRT, di cui al paragrafo 5.2.1.

Infine, le misure mostrerebbero una ridotta ripetibilità. Il fenomeno principalmente indiziato per comprendere questo comportamento è la variazione dello stato superficiale degli elettrodi, dovuto a fenomeni quali l'assorbimento delle molecole o la formazione di film superficiali tra un trial e il successivo. Infatti, le analisi DRT mostrano variazioni su scale temporali informative rispetto ai fenomeni locali a livello degli elettrodi, mostrando una minore sensibilità alle variazioni di concentrazione; mentre i parametri correlati alla conducibilità sono pressochè ripetibili e direttamente confrontabili tra i diversi trial.

Capitolo 6

Integrazione

La fase finale del presente progetto di Tesi è stata finalizzata alla miniaturizzazione del sistema di misura utilizzato, sia per una possibile integrazione su nDS, che per l'esecuzione di misure in vitro. Quest'ultimo scenario risulterebbe utile per la conduzione di un grande numero di misure in parallelo, ad esempio per confrontare i risultati con la tecnica Gold Standard, ovvero la spettroscopia di assorbimento UV/VIS, al fine di validare la tecnica EIS. Inoltre, la proposta del modello geometrico degli elettrodi permetterebbe di condurre le misure in vitro su un setup il più simile possibile ad nDS.

6.1 Integrazione dell'AD5940

L'integrazione dell'AD5940 richiede l'inserimento degli elementi necessari per il suo funzionamento. Il primo aspetto valutato per questa fase è l'alimentazione. Il chip utilizza tre canali di alimentazione: uno per i segnali analogici, uno per i dati digitali e uno per i pin di Input/Output. Ognuno di questi ha un circuito di condizionamento della tensione di alimentazione caratterizzato da dei condensatori di bypass, utili al contenimento del rumore sulla linea di alimentazione. Nominalmente, l'AD5940 necessita di una tensione di alimentazione tra i 2.8 V e i 3.6 V. Un altro aspetto circuitale riguarda i condensatori di disaccoppiamento, inseriti per fornire la corrente necessaria durante i transitori. L'AD5940 è un Analog Front End non stand alone, dunque necessita di un microcontrollore che gestisca i dati e che fornisca l'alimentazione. Per quanto riguarda il trasferimento dei dati, il chip utilizza una comunicazione SPI, costituita da 4 linee di comunicazione: il clock di SPI e il chip select per la gestione del protocollo di comunicazione e le linee per lo scambio dei dati, ossia il MISO e il MOSI. Per quanto concerne l'implementazione delle misure, sono state considerate 2 linee per la connessione agli elettrodi, dal momento che la tecnica testata prevede l'utilizzo di due elettrodi. Il primo è stato collegato al pin

relativo all'elettrodo di Sensing, il secondo invece al pin del Counter electrode e cortocircuitato a quello del Reference electrode. Infine, è stato previsto di disporre un resistore di precisione per l'implementazione delle misure raziometriche, definito in precedenza come resistore di calibrazione, dal valore di $10\text{ k}\Omega$. Per lo svolgimento delle misure, così come sono state condotte durante il progetto, non è necessario inserire altri collegamenti, dal momento che altri elementi utili come il cristallo oscillatore o il resistore di transimpedenza sono già presenti nel chip. Di seguito viene riportato uno schema a blocchi per l'integrazione con il microcontrollore e con il reservoir di un dispositivo per il rilascio di farmaco.

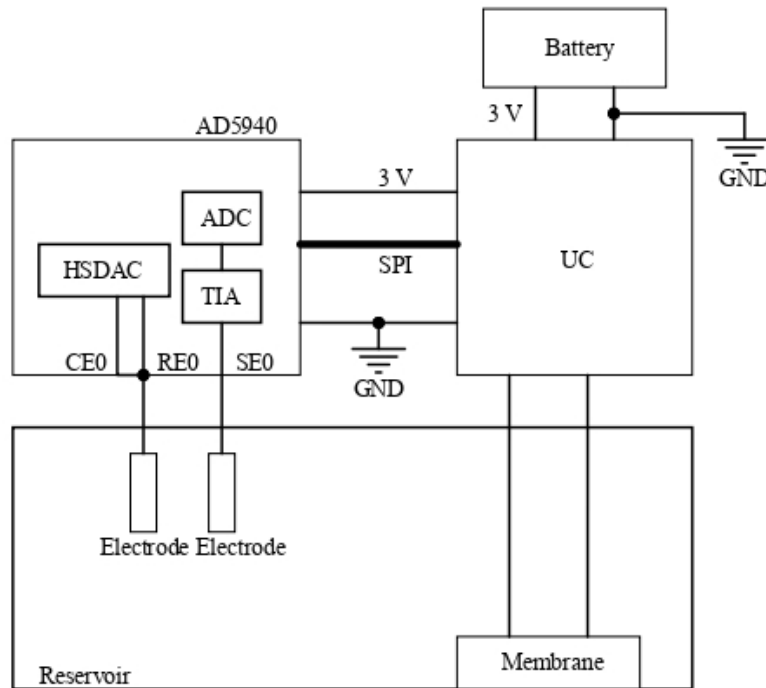
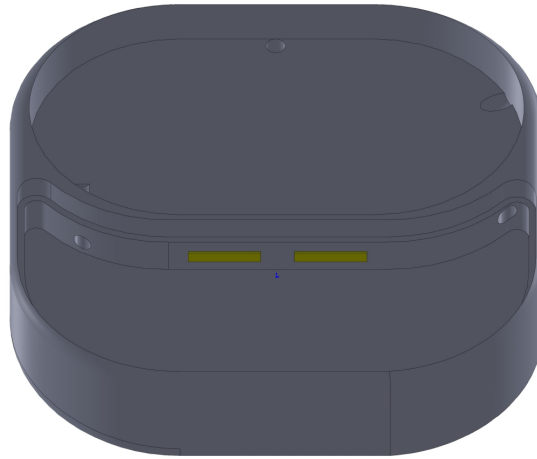


Figura 6.1: Schema a blocchi per l'integrazione dell'AD5940 per un'applicazione custom.

6.2 Design degli elettrodi

Per il dimensionamento degli elettrodi è stato tenuto in considerazione sia quanto visto sull'effetto della geometria sulla misura, sia la configurazione del reservoir nel dispositivo impiantabile. A partire dal progetto di nDS è stato proposto un modello geometrico, che viene riportato di seguito.



SOLIDWORKS Educational Product. Solo per uso didattico.

Figura 6.2: Proposta di integrazione geometrica degli elettrodi su nDS.

Gli elettrodi hanno una dimensione di $3\text{ mm} \times 0.5\text{ mm}$ e sono stati posti sulla stessa parete del reservoir. Tali dimensioni permettono di ottenere un buon compromesso tra la superficie degli elettrodi e quella disponibile sulla parete di nDS, come si evince dalla Figura 6.2.

Viene riportata una vista complessiva con le dimensioni di nDS e degli elettrodi al loro interno.

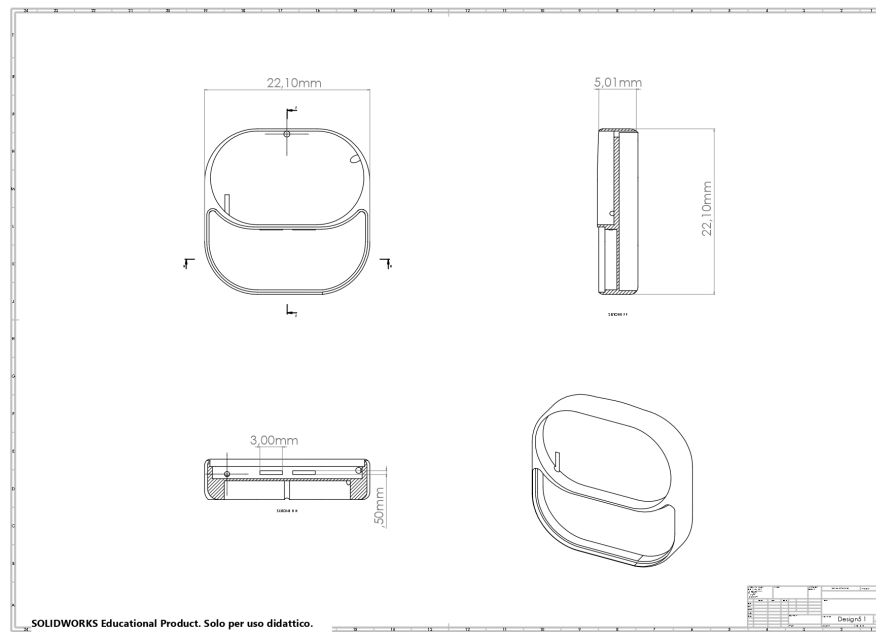


Figura 6.3: Dimensione degli elettrodi all'interno di nDS.

Infine, è stato realizzato il design di un pcb su un supporto di Kapton flessibile, utile per la realizzazione degli elettrodi e per la loro connessione all'esterno.

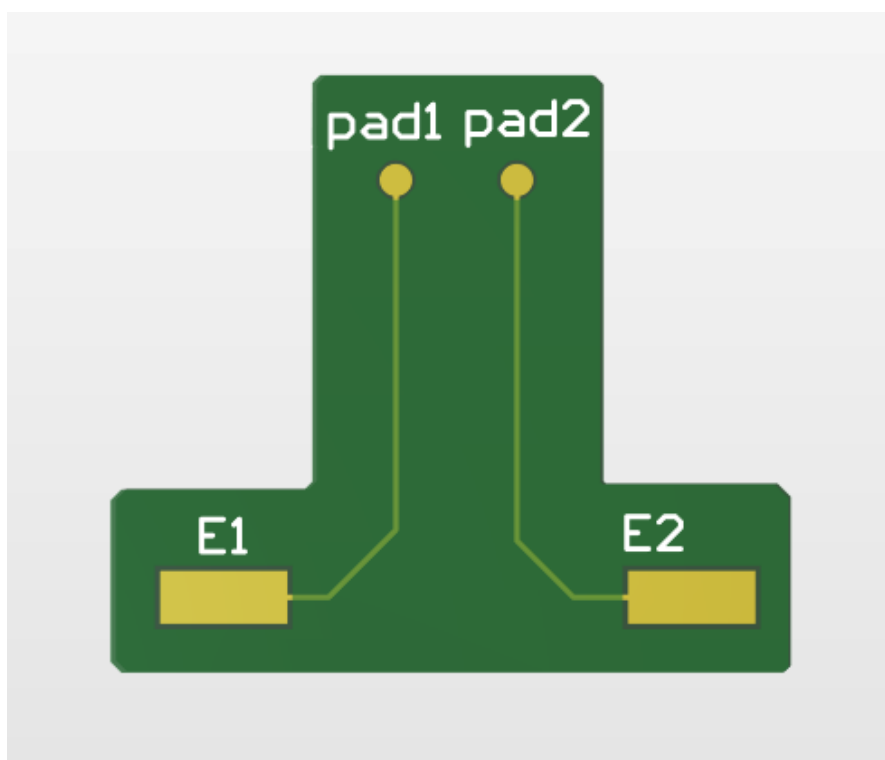


Figura 6.4: Proposta di un PCB su Kapton flessibile per l'esposizione degli elettrodi nel reservoir.

Capitolo 7

Conclusioni e Sviluppi futuri

È stata indagata la Electrochemical Impedance Spectroscopy al fine di misurare la concentrazione di molecole terapeutiche all'interno di un reservoir di un dispositivo attivo impiantabile per il rilascio di farmaco. È stato sviluppato un setup sperimentale su misura. Il setup è stato progettato al fine di stabilizzare le misure e renderle comparabili, indagando le migliori configurazioni in termini di sensibilità. La tecnica si è rivelata sensibile alle variazioni di concentrazione, mostrando cambiamenti in termini di modulo e fase di impedenza, mostrando tuttavia una variazione della sensibilità tra un trial e il successivo. È stato indagato il sistema elettrochimico per mezzo della Distribution Relaxation Time, una tecnica per l'analisi delle scale temporali di un sistema elettrochimico. È stato proposto un modello elettrochimico al fine di interpretare i risultati e le informazioni estratte. Il modello si è dimostrato robusto e coerente con i fenomeni fisici che sono stati ipotizzati. È emerso che le molecole terapeutiche indagate, al variare della loro concentrazione, agiscono per scale temporali e frequenze diverse su conducibilità e formazioni di strati sugli elettrodi. Per poter risalire alla concentrazione delle molecole, dunque, si potrebbe sfruttare solo uno di questi fenomeni informativi, permettendo di indagare il sistema in un range di frequenze ridotto, oppure si potrebbero unire le informazioni su questi fenomeni per ottenere una misura più accurata, ad esempio utilizzando algoritmi di classificazione a partire da più features.

Una delle principali limitazioni del progetto di Tesi risiede nella limitata ripetibilità delle misure in termini di valori assoluti. A fronte dell'analisi condotta sul sistema, la causa è da ricercare nello stato variabile della superficie degli elettrodi, che, con il protocollo sperimentale utilizzato, non sono stati tenuti in una condizione controllata. Si sospetta che l'esposizione all'aria tra un trial e l'altro possa aver favorito la formazione di film sulla superficie o l'adsorbimento non reversibile delle molecole residue negli elettrodi. Pertanto, al fine di un possibile sviluppo futuro del progetto, si ritiene necessario modificare il protocollo al fine

di mantenere controllato lo stato degli elettrodi, per garantire continuità nelle condizioni sperimentali.

Un altro approccio da seguire per degli sviluppi futuri potrebbe essere quello di utilizzare elettrodi che abbiano una caratterizzazione superficiale in grado di renderli meno suscettibili a fenomeni di adsorbimento. A tal proposito, sono stati individuati come possibili alternative degli elettrodi in carbonio vetroso, i quali sono meno soggetti a questa tipologia di fenomeni e che sono compatibili con applicazioni biomedicali [22].

Infine, potrebbe essere utile utilizzare un componente diverso da quello utilizzato in questo progetto di Tesi. Un'alternativa è stata individuata nel MAX30134, un AFE in grado di condurre misure EIS e dalle dimensioni ridotte, ovvero di $2.93 \text{ mm} \times 2.93 \text{ mm}$. Inoltre, il MAX30134 ha dei consumi inferiori rispetto a quelli dell'AD5940. I consumi previsti da tale dispositivo, sono di circa un'ordine di grandezza inferiori rispetto a quelli dell'AD5940 [23].

Bibliografia

- [1] World Health Organization. *The top 10 causes of death*. World Health Organization. Lug. 2021. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (cit. a p. 1).
- [2] World Health Organization. *Failure to take prescribed medicine for chronic diseases is a massive, world-wide problem*. World Health Organization. Lug. 2003. URL: <https://www.who.int/news/item/01-07-2003-failure-to-take-prescribed-medicine-for-chronic-diseases-is-a-massive-world-wide-problem> (cit. a p. 1).
- [3] Del Bono F et al. «Active implantable drug delivery systems: engineering factors, challenges, opportunities». In: *Lab Chip* 25.15 (2025), pp. 3608–3629 (cit. a p. 1).
- [4] Grattoni et al. «Analysis of a nanochanneled membrane structure through convective gas flow». In: *JOURNAL OF MICROMECHANICS AND MICROENGINEERING* 19.11 (2009), p. 115018 (cit. alle pp. 2, 4).
- [5] Unione europea. *Regolamento (UE) 2017/745 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 5 aprile 2017*. 2017 (cit. a p. 3).
- [6] Wong K. et al. Kaur G. Phillips C. «Timing is important in medication administration: a timely review of chronotherapy research». In: *INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL PHARMACY* 35.3 (2013), pp. 344–358 (cit. a p. 3).
- [7] Laracuenta ML et al. «Zero-order drug delivery: State of the art and future prospects». In: *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE* 327 (2020), pp. 834–856 (cit. a p. 4).
- [8] Di Trani N et al. «Remotely controlled nanofluidic implantable platform for tunable drug delivery». In: *LAB ON A CHIP* 19.13 (2019), pp. 2192–2204 (cit. alle pp. 4, 29).
- [9] Di Trani N et al. «Electrostatically gated nanofluidic membrane for ultra-low power controlled drug delivery». In: *LAB ON A CHIP* 20.9 (2020), pp. 1562–1576 (cit. a p. 4).

-
- [10] Silvestri A. et al. «Silicon Carbide-Gated Nanofluidic Membrane for Active Control of Electrokinetic Ionic Transport». In: *MEMBRANES* 11.7 (2021), p. 535 (cit. a p. 5).
- [11] Muneer Fadr. Abdulaziz Amro. «Electrochemical Method Development for Enalapril Determination in a Pharmaceutical Formulation». In: *Asian Journal of Pharmaceutics* 14.4 (2020), pp. 550–555 (cit. a p. 7).
- [12] Eda Mehmeti et al. «Determination of Enalapril in Pharmaceuticals using Electrochemical Sensing with Amperometric Detection». In: *ANALYTICAL BIOANALYTICAL ELECTROCHEMISTRY* 9.8 (2017), pp. 1000–1007 (cit. a p. 7).
- [13] AhmedS. Elwakil Abdulwadood A. Al-Ali Brent J.Maundy. *Design and Implementation of Portable Impedance Analyzers*. Gewerbestrasse, Switzerland: Springer, 2019 (cit. a p. 7).
- [14] Analog Devices. *AD5940 DataSheet* (cit. a p. 9).
- [15] Analog Devices. *AN-1563: Optimizing the AD5940 for Electrochemical Measurements*. Analog Devices. URL: <https://www.analog.com/jp/resources/app-notes/an-1563.html> (cit. a p. 11).
- [16] Miller JH Sanabria H. «Electric impedance of aqueous KCl and NaCl solutions: Salt concentrationdependence on components of the equivalent electric circuit». In: *PHYSICAL REVIEW E* 74.5 (2006), p. 051505 (cit. a p. 26).
- [17] Lima L.F. et al. «Electric impedance of aqueous KCl and NaCl solutions: Salt concentrationdependence on components of the equivalent electric circuit». In: *JOURNAL OF MOLECULAR LIQUIDS* 241 (2017), pp. 530–539 (cit. a p. 26).
- [18] Ragoisha G. A. Bondarenko A. S. *EIS Spectrum Analyser*. Freeware software for electrochemical impedance spectroscopy analysis. 2005 (cit. a p. 27).
- [19] Plank C et al. «A review on the distribution of relaxation times analysis: A powerful tool for process identification of electrochemical systems». In: *JOURNAL OF POWER SOURCES* 594 (2024), p. 233845 (cit. alle pp. 28, 33).
- [20] Wan TH et al. «Influence of the discretization methods on the distribution of relaxation times deconvolution: implementing radial basis functions with DRTtools». In: *ANALYTICAL BIOANALYTICAL ELECTROCHEMISTRY* 184 (2015), pp. 483–499 (cit. a p. 28).
- [21] Maradesa A et al. «Advancing electrochemical impedance analysis through innovations in the distribution of relaxation times method». In: *JOULE* 8.7 (2024), pp. 1958–1981 (cit. a p. 34).

- [22] Dieker J. W. Van der Linden W. E. «Glassy carbon as electrode material in electro-analytical chemistry.» In: *Analytica Chimica Acta* 119.1 (1980), pp. 1–24 (cit. a p. 55).
- [23] Analog Devices. *MAX30131 DataSheet* (cit. a p. 55).