

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Determinazione dei polifenoli nei vini:
ottimizzazione di un metodo analitico basato sui
transistor elettrochimici organici

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Igor Damaschin

RELATORE

Chiar.ma Prof.ssa Erika Scavetta

CORRELATORE

Dr. Isacco Gualandi

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Vino e polifenoli	4
1.2 Determinazione dei polifenoli nei vini	9
1.3 Sistemi commerciali per l'analisi dei fenoli e polifenoli	11
1.4 Polimeri conduttori	12
1.4.1 PEDOT e PSS	13
1.5 Transistor elettrochimico a base organica	16
1.5.1 OECT con elettrodi interamente fatti in PEDOT:PSS	18
2. SCOPO DELL'ELABORATO	22
3. PARTE SPERIMENTALE	23
3.1 Strumentazione	23
3.2 Reagenti	25
3.3 Costruzione e preparazione del transistor	25
3.4 Misure elettrochimiche	26
3.5 Trattamento dei vini	27
3.6 Metodo di Folin – Ciocalteu	29
3.7 Indice di polifenoli I₂₈₀	30
4. RISULTATI E DISCUSSIONI	31
4.1 Studio della risposta del PEDOT:PSS all'acido gallico	31
4.2. Prove cronoamperometriche	32
4.2.1 Influenza del pH sulla sensibilità e stabilità della risposta	35
4.2.2 Misure nei campioni di vino	37
4.3 Prove con il transistor	38
4.3.1 Curva I_d – t pulsata a potenziali differenti	43
4.3.2 Curva trans-caratteristica al bipotenzio stato	44
4.4 Confronto tecniche elettrochimiche per la riproducibilità	47
4.5 Tecnica di analisi spettrofotometrica	50
4.5.1 Metodo di Folin-Ciocalteu	50
4.5.2 Indice di polifenoli totali I₂₈₀	51
4.6 Estrazione del segnale per il confronto dei metodi spettrofotometrici con quello elettrochimico	52
5. CONCLUSIONI	57
6. BIBLIOGRAFIA	58

1. INTRODUZIONE

1.1 Vino e polifenoli

In quanto simbolo culturale duraturo di vita raffinata, il ruolo del vino si è evoluto nel tempo, passando da fonte di nutrimento importante a complemento culturale del cibo e della convivialità compatibile con uno stile di vita sano [1].

Il vino è una bevanda alcolica prodotta dalla fermentazione del mosto ottenuto da uve fresche o leggermente appassite, in presenza di saccaromiceti [2].

La vinificazione è apparsa in Europa con l'espansione dell'Impero romano nel Mediterraneo, quando si formarono molte grandi regioni vitivinicole ancor oggi esistenti [3].

Il processo di vinificazione presenta più passaggi, tra cui:

- *Raccolta delle uve*: dal giusto stato di maturazione dell'uva potrà dipendere la bontà del prodotto futuro.
- *Pigiatura*: ha lo scopo di schiacciare l'acino e lacerarne la buccia, portando in contatto con l'aria tutti i componenti situati al suo interno e permettendo così ai saccaromiceti di agire.
- *Fermentazione*: è un complesso di processi chimici e fisici provocati dai saccaromiceti, funghi unicellulari, presenti nell'aria e nelle bucce dell'uva, capaci di secernere un sistema enzimatico, la *zimasi alcolica* che trasforma glucosio in etanolo, anidride carbonica, glicerina, acido succinico, e tracce di aldeidi. La prima fase della fermentazione è accompagnata da schiumeggiamento dovuto ad abbondante evoluzione di CO₂, che porta in superficie i graspi e le bucce. Entro 4-10 giorni, questa fase si arresta ed allora si procede alla svinatura.
- *Svinatura*: il mosto vino, spogliato delle bucce e dei graspi, viene travasato in botti pulite e solforate, non completamente chiuse, nelle quali avviene la fermentazione che dura da uno a tre mesi, durante i quali precipitano il cremortartaro, i fermenti morti, le gomme, i tannini e le mucillagini. Al sopraggiungere dell'inverno il vino viene travasato nelle botti di conserva, dove diverrà limpido, sapido, profumato per la formazione degli eteri enantici dovuti alla maturazione. A primavera dopo un nuovo travaso il vino sarà pronto per il consumo.

La composizione dei vini è molto varia a seconda del tipo e della qualità del vitigno, della condizione di coltura, delle tecniche di produzione e dei trattamenti subiti. La composizione percentuale tipica dei vini oscilla tra i seguenti valori:

- Acqua: 80-94%

- Alcol (% in volume): vini da pasto 9-12, vini da taglio 15-18
- Estratto secco (zuccheri esclusi): da 15 a 45 g/L
- Acidità totale (espressa in acido tartarico): da 4 a 15 g/L
- Glicerina (in % sull'alcol): da 6 a 14
- Metanolo (in % sull'alcol): 0,25
- Alcoli superiori: 160-500 mg/L
- Acetaldeide: 40-120 mg/L
- Acido acetico: 400-1000 mg/L

Sono presenti inoltre sostanze coloranti (enocianine ed enoflavine) provenienti dalle bucce e tannine provenienti dai vinaccioli e dai graspi [2]. Queste sostanze fanno parte del gruppo dei polifenoli.

Il contenuto di polifenoli è un importante parametro che determina alcune proprietà organolettiche e sensoriali dei vini [4].

I composti polifenolici sono un complesso gruppo di sostanze che possiedono una struttura comune comprendente un anello aromatico con uno o più sostituenti ossidrilici. I principali gruppi di polifenoli sono acidi fenolici, come ad esempio l'acido gallico e flavonoidi, come ad esempio la quercetina.

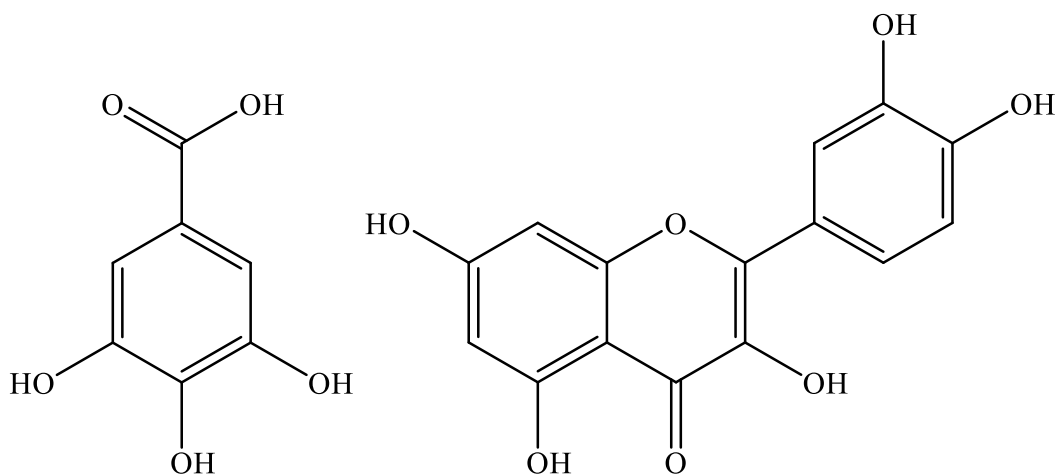


Figura 1 Struttura chimica dell'acido gallico e della quercetina

Nelle piante possono fungere da fitoalessine, antiossidanti e attrattivi per gli impollinatori, contribuiscono alla pigmentazione e agiscono come agenti protettivi contro i raggi UV [5]. Negli alimenti, invece, i polifenoli possono contribuire all'amarezza, all'astringenza, al colore, al sapore, all'odore e alla stabilità ossidativa del cibo. Nell'uomo questi composti sono molto importanti perché hanno molteplici proprietà biologiche che vanno dal cardio-protettore, anti-infiammatorio, antiallergico e anti-cancerogeno, a antivirale e antibatterico. In effetti, alcune

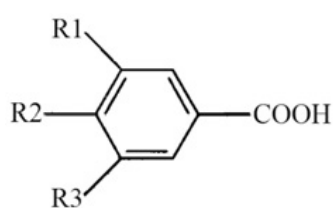
indagini hanno indicato che il consumo moderato di vino è associato a un ridotto rischio di malattie cardiovascolari e cancro [6-11] e ha effetti benefici sul sistema immunitario e sulle funzioni cognitive. È stato accertato che l'assunzione di fenoli mediante il vino oppure con suoi sottoprodotti, può risultare, nel lungo periodo, efficace nella riduzione dell'aterosclerosi [12].

Queste proprietà biologiche sono attribuite principalmente alla loro potente attività antiossidante e antiradicalica [13], che è correlata alle proprietà redox dei polifenoli. Pertanto, possono svolgere ruoli importanti nel ridurre e neutralizzare i radicali liberi, spegnere ossigeno singoletto e tripletto o perossidi in decomposizione [14].

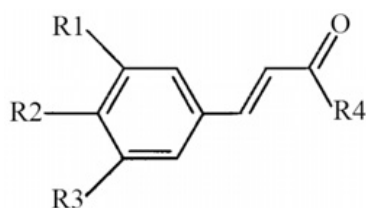
Lo sviluppo di metodi analitici per la loro determinazione è, quindi, importante in più settori quali ad esempio, i alimentare, agricolo, farmaceutico e cosmetico [15].

I vini sono bevande complesse che contengono numerosi componenti che influenzano i loro attributi di qualità. Come menzionato sopra, i composti fenolici contribuiscono alle caratteristiche organolettiche del vino (ad esempio astringenza, amarezza, sapore e colore). Queste caratteristiche sono influenzate da molti fattori nella produzione e nell'invecchiamento del vino. Inizialmente, le qualità organolettiche dei vini sono influenzate dalla maturità dell'uva. Durante l'invecchiamento dei vini in barrique, si verificano importanti reazioni chimiche che modificano la loro composizione chimica. Ne derivano cambiamenti nelle loro caratteristiche organolettiche che migliorano la qualità fornendo al vino le apprezzate caratteristiche sensoriali [16]. I composti colorati sono stabilizzati e si verifica una diminuzione dell'astringenza, oltre a una chiarificazione spontanea e all'arricchimento della fragranza da parte di composti rilasciati dal legno [17].

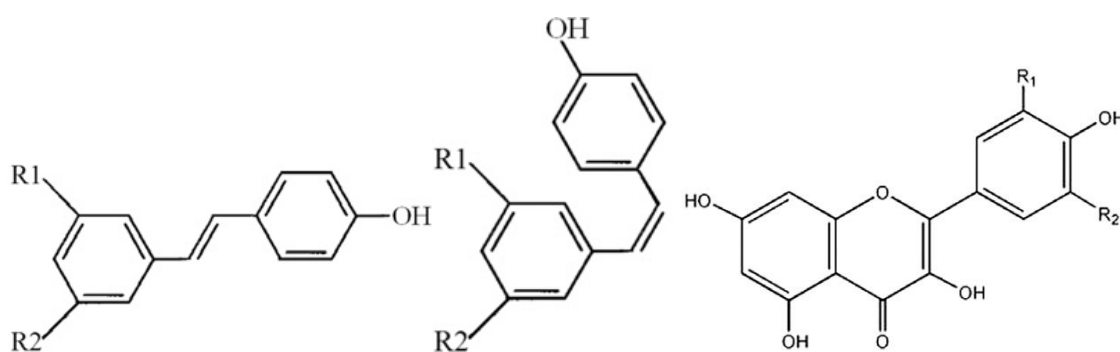
I composti fenolici presenti nei vini derivano principalmente da acidi benzoici e cinnamici semplici, stilbeni e flavonoidi. Da queste strutture di base, composti più complessi sono formati da condensazione, glicosilazione e polimerizzazione. Questo porta a una composizione polifenolica molto complessa, dove i contributi rilevanti sono dati da acidi tannici (polimeri di acido gallico attorno a un centro di glucosio), antociani (derivati di 3-O-glucoside di antocianidine), dimeri di stilbene (viniferina e pallidolo), esteri tartarici di acidi cinnamici e proantocianidine (tannini condensati formati da reazioni di condensazione di flavanoli, antociani e / o monomeri di acido fenolico) [4,18-20] (Figura 2).



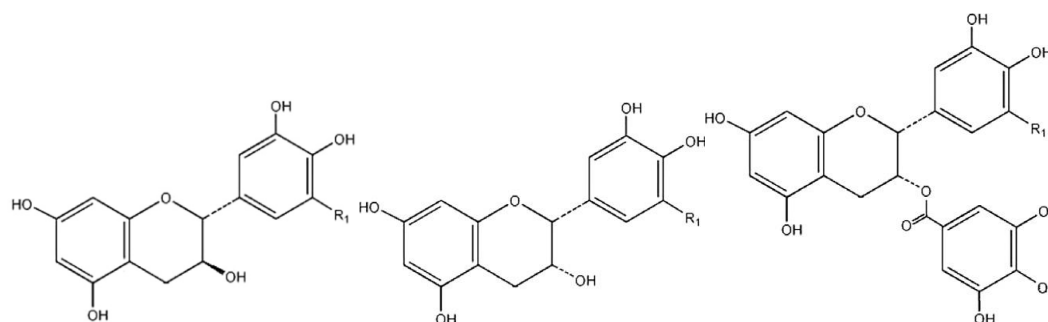
Derivati di acido benzoico



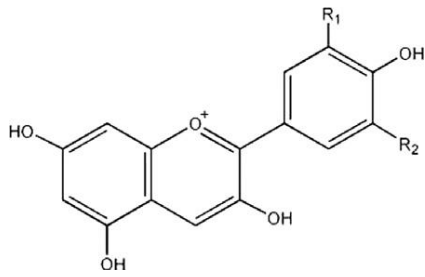
Derivati di acido cinnamico



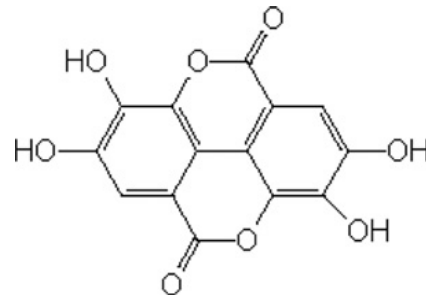
Stilbeni



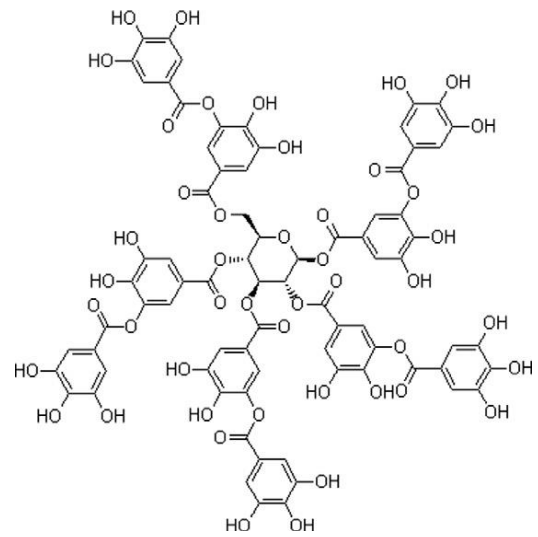
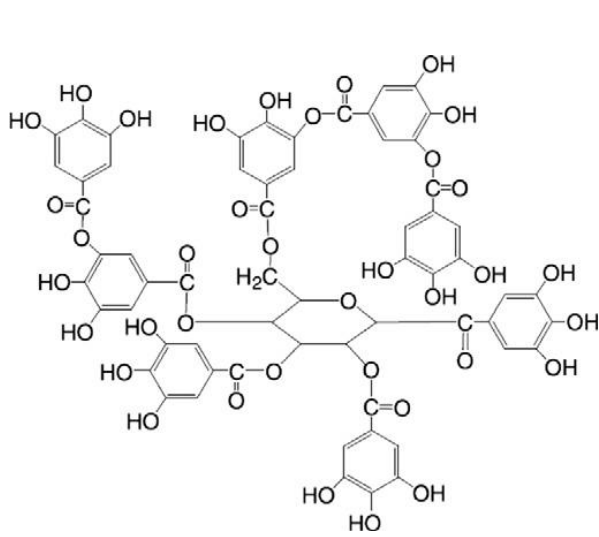
Flavanoli



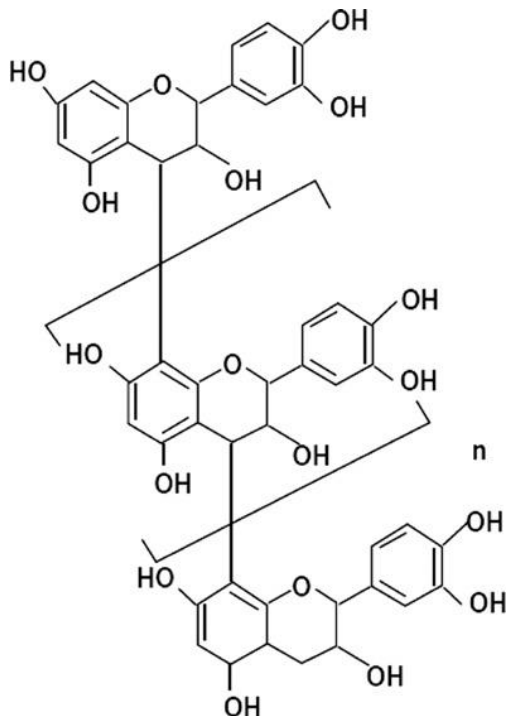
Antocianidine



Acido ellagico



Acidi tannici



Protocianidine

Figura 2 Struttura dei polifenoli solitamente presenti nei vini.

I precursori di tutti questi composti si trovano principalmente in semi, tessuti cutanei e cellule epidermiche dell'uva. Il loro contenuto in uva e vino dipende dalla varietà di uva, dal tempo di maturazione, dal suolo e dalle pratiche agricole.

Normalmente, la concentrazione dei polifenoli totali nel vino rosso è nell'intervallo 1,80-4,06 g / L, mentre nel vino bianco è 0,16-0,33 g / L [21]. I fenoli ossidabili sono anche importanti nella produzione di vino poiché la stabilità e la conservazione dei vini sono influenzate da questi composti. Nei vini bianchi, uno sviluppo del sapore "rancio", un approfondimento del colore e la produzione di sedimenti sono generalmente dovuti all'ossidazione dei polifenoli, un processo chiamato "maderizzazione". Nei vini rossi, la scomparsa dell'amarezza e dell'astringenza durante l'invecchiamento è attribuita all'ossidazione e alla condensazione di questi composti [22].

1.2 Determinazione dei polifenoli nei vini

Esistono due approcci generali per esaminare e quantificare il contenuto di polifenoli negli alimenti e, quindi, più specificatamente nei vini:

- a. la determinazione di un indice totale mediante rivelazione spettrofotometrica, solitamente effettuata utilizzando il metodo Folin-Ciocalteu e / o la misurazione dell'assorbanza a 280 nm, che viene comunemente utilizzata nelle pratiche enologiche per la sua semplicità;
- b. separazione delle singole specie antiossidanti e loro successiva rilevazione [15]; le tecniche più comunemente utilizzate sono la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) o l'elettroforesi capillare (CE) con rivelazione UV, fluorimetrica, spettrometria di massa (MS) o elettrochimica (ECD), con metodi basati su cromatografia liquida ampiamente utilizzati perché gli acidi fenolici hanno punti di fusione elevati e si decompongono quando riscaldati al di sopra di circa 200° C [14].

Un importante svantaggio analitico delle misure spettrofotometriche dirette potrebbe essere attribuito alla mancanza di selettività propria di questi metodi, principalmente perché sovrastimano il contenuto fenolico [23].

Oltre ai metodi spettrofotometrici, anche le procedure basate su HPLC non costituiscono un approccio facile, rapido o economico; inoltre, richiedono personale qualificato e non possono essere eseguiti in situ o con il minimo pretrattamento del campione. Questi possono costituire punti molto critici in quelle situazioni, come nel corso della raccolta dell'uva, in cui la rapida valutazione del potenziale aromatico e polifenolico è più spesso determinante per il risultato

enologico finale. Recentemente, nell'ambito della chimica analitica lo sviluppo di nuovi dispositivi e metodi efficaci per la valutazione del contenuto polifenolico introduce sensori basati sulla trasduzione elettrochimica chiamate "lingue elettroniche" (ET). Alcune caratteristiche che questi nuovi dispositivi devono possedere è la capacità di effettuare il rilevamento online, di operare su piccoli volumi di campione, e il non richiedere alcun pretrattamento del campione (o al massimo un minimo pretrattamento). Il rilevamento elettrochimico può dare importanti contributi per raggiungere questo obiettivo [24]. La voltammetria ciclica (CV) è stata utilizzata per determinare il contenuto totale di polifenoli e la concentrazione di alcuni singoli gruppi di polifenoli [25-28] sfruttando anche la microdialisi su un sistema lineare con sistemi amperometrici [29]. Sono stati anche proposti metodi analitici basati sulla voltammetria differenziale degli impulsi (DPV) per la determinazione del contenuto di polifenoli nei vini, utilizzando sistemi di nanocompositi con elettrodi di carbonio vetroso [30-33] o elettrodi metallici. Crono amperometria e crono coulombometria possono essere usate per la valutazione delle proprietà antiossidanti dei vini rossi e bianchi [34, 35].

Le proprietà antiossidanti di questi composti sono legate alla loro capacità di donare elettroni. Pertanto, la possibilità di ossidazione elettrochimica a potenziali moderati può essere sfruttata per il loro rilevamento. Queste caratteristiche consentono la rilevazione selettiva di polifenoli con una buona sensibilità, anche in campioni molto complessi, come il vino, e le risposte sono indipendenti dalla torbidità del campione [36].

Tra i metodi elettrochimici proposti per la determinazione dei polifenoli, troviamo anche biosensori enzimatici, in cui si sfruttano enzimi quali polifenolo-ossidasi (ad esempio, PPO, tirosinasi e laccasi ossidasi) o gli enzimi perossidasi. In questi sistemi viene monitorata la risposta elettrochimica dei prodotti generati per via enzimatica [37].

I sensori elettrochimici possono essere considerati un'interessante alternativa ai metodi spettrofotometrici e sono già utilizzati come elementi di rilevamento in ET per l'analisi di matrici alimentari, grazie ai notevoli vantaggi dovuti all'uso di strumentazione elettrochimica a basso costo, che può essere facilmente incorporata in sistemi miniaturizzati [38-42].

La diversa natura dei materiali degli elettrodi porta presumibilmente a risposte che possiedono informazioni diverse, parzialmente complementari. Vengono già evidenziati in letteratura i vantaggi offerti dall'uso di *polimeri conduttori* come materiali modificanti delle superfici degli elettrodi negli ET impiegati nel riconoscimento di diversi tipi di succhi di frutta [43] e nella distinzione di diversi vini bianchi e rossi rispetto alla varietà, origine geografica e altre caratteristiche di interesse [44-46].

1.3 Sistemi commerciali per l'analisi dei fenoli e polifenoli

Esistono già strumenti in commercio per la determinazione rapida di fenoli e polifenoli. Tali strumentazioni, il cui funzionamento si basa su una trasduzione ottica (nel primo caso) o amperometrica (nel secondo caso) sono ancora poco vantaggiosi economicamente:



Figura 3 Test kit dei fenoli HI-3864

1. Il kit di test dei fenoli HI-3864 è un sistema portatile che rappresenta un modo semplice per eseguire un'analisi chimica accurata. Questo kit per i fenoli determina la concentrazione di fenolo nell'acqua tramite il disco di controllo. Composti fenolici reagiscono per formare un colorante giallo-arancio con 4-ammino-antipirina in soluzione alcalina tamponata a pH circa 10. L'assorbanza di questo prodotto colorato è proporzionale alla concentrazione di fenoli presenti nel campione acquoso. [47]
2. NomaSense PolyScan P200 è l'analizzatore che misura il contenuto in polifenoli di mosto o vino in tempo reale in diverse fasi di vinificazione. Il metodo è semplice, diretto e rapido. Una goccia campione viene posizionata su un elettrodo monouso. I risultati vengono visualizzati sul touchscreen dell'analizzatore dopo alcuni secondi sotto forma di indici - EasyOx e PhenOx - che indicano rispettivamente i polifenoli facilmente ossidabili e i livelli di polifenoli totali. Questi indici consentono all'enologo di gestire fasi critiche come le frazioni di stampa o il contatto con la pelle di fermentazione sulla base di misurazioni oggettive della qualità del mosto e del vino [48].

1.4 Polimeri conduttori

Con il termine polimero si intende comunemente una macromolecola composta da una catena di unità ripetitive vincolate da legami covalenti, formatasi tramite il processo chimico di polimerizzazione dei monomeri (i reagenti della reazione).

Lo studio di polimeri naturali come caucciù, cellulosa, acidi nucleici o proteine ha portato alla sintesi in laboratorio dei polimeri più comunemente conosciuti ed utilizzati, quali nylon, gomme sintetiche e materie plastiche in generale.

Allo scopo di utilizzare tali polimeri per la produzione di strumenti elettronici per la misura di parametri biologici, di particolare interesse sono i polimeri conduttori.

La conducibilità, invece, è una caratteristica che si presenta solamente nei polimeri coniugati, a differenza dei polimeri saturi, che sono isolanti. Nonostante l'atomo di carbonio alla base della struttura organica del polimero abbia una struttura elettronica di tipo $1s^2 2s^2 2p^2$, a causa dell'ibridizzazione degli orbitali s e p può formare da uno a quattro legami covalenti con gli atomi vicini.

Nel caso di polimeri saturi l'ibridizzazione del carbonio è di tipo sp^3 e ciò significa che i legami covalenti nella catena del polimero sono tutti di tipo σ . L'alta energia di gap di un legame di tale tipo rende questi materiali isolanti. Per quanto riguarda invece i polimeri coniugati, l'ibridizzazione del carbonio è di tipo sp^2 (o sp), pertanto si hanno solamente tre legami di tipo σ . L'orbitale atomico p che non partecipa all'ibridazione sp^2 è disponibile per formare un orbitale molecolare di tipo π [49]. Considerato che ogni atomo di carbonio della catena polimerica ha idealmente a disposizione un orbitale di p, si forma un sistema π coniugato, evidenziato nella formula struttura di questi polimeri da un'alternanza di legami singoli e doppi legami (figura 4). Questo genera una banda elettronica unidimensionale che si sviluppa lungo la catena polimerica e che presenta un'ampiezza di gap tra 1 e 4 eV circa, inferiore a quella osservabile in presenza di legami di tipo σ . Quando il numero di atomi di carbonio coinvolti nella formazione del sistema coniugato, e quindi di orbitali p utilizzati nella formazione degli orbitali molecolari, è sufficientemente elevato si otterrà un continuum energetico che può essere definito da un sistema a "bande energetiche", grazie al quale il polimero acquisisce caratteristiche di un materiale semiconduttore.

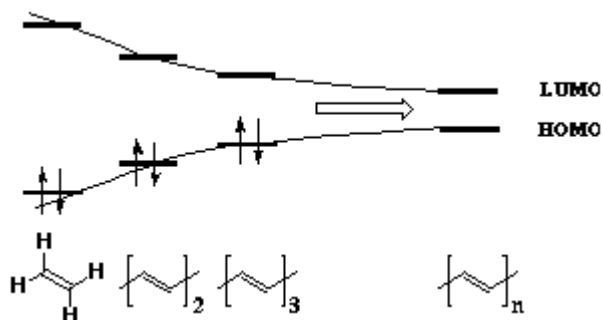


Figura 4. Livelli energetici relativi a molecole e macromolecole organiche caratterizzate da legami π coniugati.

La conducibilità del polimero coniugato può essere aumentata tramite drogaggio, fino ad ottenere un comportamento di tipo metallico. Il termine drogaggio, originario della fisica dello stato solido, dove indica l'introduzione di impurità nel reticolo e quindi un cambiamento nella struttura elettronica dello stesso, nei polimeri coniugati è il processo che porta alla creazione di nuovi stati elettronici e si riferisce ad una reazione chimica di riduzione o ossidazione.

1.4.1 PEDOT e PSS

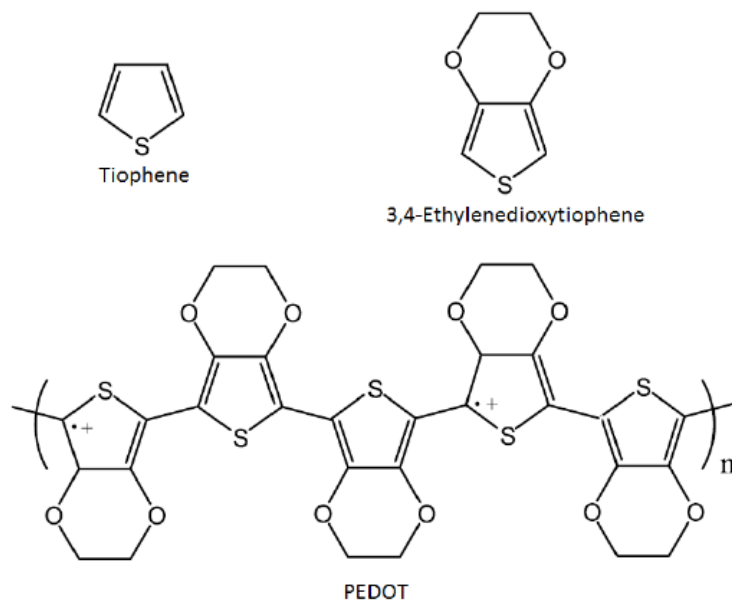


Figura 5 Struttura chimica del thiophene, del 3,4-ethylenedioxythiophene (EDOT) e del poly(3,4- ethylenedioxythiophene) (PEDOT).

Il PEDOT, ovvero poli(3,4-etilendioossitiofenene), è uno dei polimeri organici più studiati e utilizzati nella ricerca. Sintetizzato nell'aprile del 1988 dai laboratori della BayerAG, il

PEDOT è un derivato del politiofene, risultato della polimerizzazione del monomero EDOT (etilendiossitifene), entrambi visibili in figura 5. Il PEDOT mostra alta conducibilità intrinseca e buona stabilità nel suo stato drogato [50]. L'esigenza di sviluppare un polimero con queste proprietà nasce dal fatto che il politiofene, pur essendo maggiormente stabile rispetto agli altri polimeri conduttori non mostra grandi potenzialità in ambito industriale in quanto la sua conducibilità non presenta stabilità nell'arco di lunghi periodi di tempo. Questo problema può essere risolto diminuendo il potenziale di ossidazione del polimero, ovvero introducendo un gruppo alcossilico, cioè con carattere di donatore di elettroni, in sostituzione del tiofene. Oltre alla struttura, anche la lunghezza delle catene polimeriche influenza la conducibilità del polimero; in particolare la conducibilità è maggiore per polimeri aventi catene corte.

Il PEDOT è dotato delle seguenti proprietà [50]:

➤ *Stato di drogaggio reversibile*

Il PEDOT può essere ripetutamente drogato e riportato al suo stato originario senza incorrere in effetti permanenti. Inoltre, è facile identificare visivamente il suo stato di drogaggio tramite opacità e colore: il PEDOT è infatti blu scuro e opaco nel suo stato neutro, ma, una volta ossidato, diventa trasparente e azzurro. Ciò è dovuto alla variazione del gap di energia nella regione del visibile e quindi, si presenta come ottimo componente per applicazioni ottiche.

➤ *Eccellente stabilità*

Il PEDOT presenta un'ottima stabilità sia termica, sia chimica e le sue proprietà inerenti alla conducibilità elettrica sembrano rimanere pressoché invariate nel tempo.

➤ *Struttura regolare*

Il PEDOT presenta una struttura molto regolare, dovuta alla lunghezza ridotta delle catene del gruppo alcossilico. Inoltre, con specifici solventi, per esempio glicole etilenico o metanolo, può essere sottoposto a trattamenti in grado di modificare la struttura polimerica e la relativa conformazione andandone in alcuni casi a migliorare la conducibilità. [51]

➤ *Alta conducibilità*

Rispetto al politiofene, il PEDOT possiede una band gap inferiore, di circa 1.5-1.6 eV. Nello stato drogato, questo gap diminuisce ulteriormente fino ad essere inferiore ad 1 eV. Questo comporta un'alta conducibilità elettrica (circa 550 S/cm).

➤ *Proprietà elettrochimiche*

Film di PEDOT sintetizzati per via elettrochimica presentano non solo bassi potenziali di riduzione e ossidazione, ma anche un'eccellente stabilità nel loro stato drogato, tanto che i picchi redox rimangono pressoché invariati nel corso di varie scansioni di potenziale.

Film sottili di PEDOT vengono anche utilizzati per modificare superfici elettrodiche in quanto il ricoprimento con il film polimerico consente di minimizzare gli effetti di fouling (avvelenamento o passivazione) sulla superficie dell'elettrodo a causa dell'ossidazione dei polifenoli, che porta alla formazione di un film polimerico passivante su superfici di materiali elettrodici convenzionali.

Inoltre, gli elettrodi modificati con PEDOT funzionano correttamente nei mezzi acquosi, il che li rende interessanti per l'analisi diretta delle matrici alimentari. [52].

Il fatto che il PEDOT sia un polimero insolubile in acqua complica notevolmente il processo di deposizione di questo materiale per ottenere film sottili e uniformi. Per ovviare a questo problema spesso si utilizza alla sintesi di un *complesso polielettrolita* (PEC), formato dal PEDOT con l'acido polistirene sulfonato (PSS), chiamato PEDOT:PSS, nella forma di dispersione stabile. Un metodo alternativo per formare film sottili di PEDOT:PSS è la deposizione elettrochimica (o elettrodeposizione). L'elettrodeposizione è una tecnica di polimerizzazione in situ, dove la deposizione del PEDOT avviene proprio grazie alla polimerizzazione del monomero EDOT sul substrato. Il processo di elettrodeposizione avviene mediante l'immersione di due elettrodi in una soluzione elettrolitica acquosa, contenente il monomero EDOT e il dopante PSS, un elettrodo funge da substrato del PEDOT:PSS e uno è utilizzato come controelettrodo per polarizzare la soluzione. Si applica poi un voltaggio positivo variabile entro pochi volt alla soluzione elettrolitica mediante il controelettrodo e lo si fa ciclicamente e progressivamente passare da $V = 0 \text{ V}$ a $V = V_{\text{max}}$. L'elettrodeposizione richiede un substrato conduttore per il PEDOT:PSS, mentre parte delle applicazioni dei film sottili di PEDOT, come i transistor, necessitano di un substrato isolante. Un modo di ovviare a tale problema è utilizzare come substrato un vetrino isolante con un film sottile di PEDOT:PSS, quindi conduttore, già depositato sopra tramite altre tecniche (spin coating o Ink-jet printing). Il PEDOT viene, quindi, elettrodepositato sul film sottile preesistente. La struttura finale del polimero è raffigurata in figura 6.

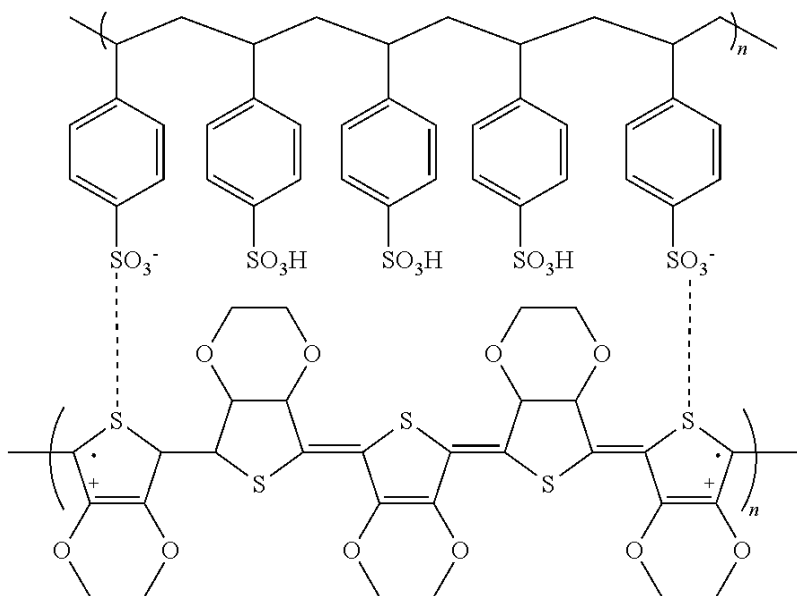


Figura 6 Il complesso polielettrolita PEDOT:PSS formato dall'interazione coulombiana tra le lacune del PEDOT e le cariche negative scoperte del PSS.

Il PSS è un polianione, che funge da drogante per il PEDOT, compensando le lacune nella backbone con le sue cariche negative. Così facendo, le corte catene di PEDOT si allineano alle più lunghe catene di PSS: il PEDOT ha ora una disposizione spaziale tipica di una catena cationica, nella quale può scorrere corrente tramite il trasporto di lacune. Il PSS è storicamente il primo polielettrolita utilizzato per un PEC con il PEDOT e dal 1990 è rimasto poi uno standard industriale. I vantaggi relativi all'utilizzo del PSS come controione per il PEDOT sono vari, tra questi, larga disponibilità commerciale, solubilità in acqua, formazione di film resistenti nel tempo e trasparenza [53].

È stato dimostrato che il sistema PEDOT: PSS è in grado di produrre film e sistemi microstrutturati con ottime proprietà elettrochimiche, conducibilità ionica elevata, buona stabilità elettrochimica e una capacità specifica adatta all'uso pratico nei supercondensatori elettrochimici [54-58]. Inoltre, grazie alle sue ottime caratteristiche, il PEDOT: PSS è stato recentemente impiegato per la fabbricazione di Transistor Organici Elettrochimici (OECTs) interamente in plastica [59-61].

1.5 Transistor elettrochimico a base organica

I sensori elettrochimici offrono molti vantaggi rispetto alle tecniche analitiche tradizionali, come l'utilizzo di procedure semplici e veloci, ma la determinazione è comunque relativamente costosa in quanto richiede un potenziostato e, di conseguenza, un'elettronica di

lettura complessa per l'acquisizione del segnale, insieme ad un elettrodo di riferimento che impedisce anche la miniaturizzazione di questi dispositivi.

I transistor elettrochimici organici (OECT) sono valide opzioni per superare tali inconvenienti (Figura 7). Il transistor elettrochimico organico è un dispositivo composto da 3 terminali chiamati source, drain e gate. I terminali di source e drain sono connessi da uno strato di materiale organico conduttore che prende il nome di canale. Il gate, su cui è posto il terzo terminale, può essere formato da un altro strato di materiale organico conduttore oppure da un elettrodo metallico. Parte essenziale ed integrante del transistor è l'elettrolita (solido, liquido o gel), che pone in contatto canale e gate, altrimenti separati [62].

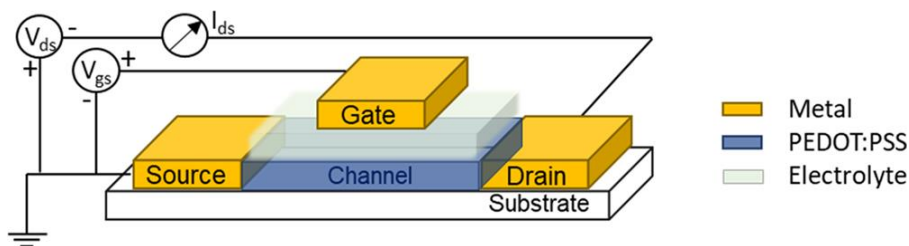


Figura 7 Rappresentazione schematica di un transistor elettrochimico.

La corrente del canale può essere modulata dalla tensione di gate attraverso reazioni elettrochimiche che cambiano la concentrazione dei portatori di carica nel polimero, e quindi, la sua conducibilità. Poiché i processi elettrochimici sono debolmente influenzati dalla distanza tra gli elettrodi, un OECT non richiede un'architettura elaborata e la sua fabbricazione è molto semplice. La configurazione del transistor garantisce l'amplificazione del segnale in quanto piccole variazioni di potenziale dovute alla presenza dell'analita sono seguite da una grande variazione della corrente del canale, assicurando così un'alta sensibilità e un bassissimo limite di rilevabilità (LOD). Inoltre, l'elettronica di lettura può essere più semplice ed economica di quanto richiesto per un sensore amperometrico, cioè un potenziostato. Infine, considerando che il gate agisce sul canale mediante una reazione elettrochimica, sono necessari bassi potenziali (<1 V) per il funzionamento di questi dispositivi che sono quindi particolarmente adatti per esempio, per l'interfacciamento e lo studio di cellule. In effetti, gli OECT sono stati utilizzati in diverse applicazioni biologiche come il monitoraggio dell'integrità tissutale [63] e la morte cellulare, [64] il rilascio di neurotrasmettitori *in vivo*, [65] l'adesione cellulare [66] e il controllo elettronico della presenza di ioni [67].

Quando questi dispositivi funzionano come sensori chimici, gli analiti agiscono nei processi elettrochimici che controllano il drogaggio di polimeri conduttori modificando la corrente che fluisce nel canale. Due regimi operativi possono essere identificati in un OEET: [68] un regime faradaico in cui il doping / dedoping è accoppiato a una reazione di riduzione / ossidazione all'elettrodo di gate e un regime capacitivo in cui il drogaggio del polimero è accoppiato alla carica di un doppio strato ionico all'elettrodo di gate.

La corrente del canale di un OEET (I_{DS}) è data dalla seguente equazione:

$$I_{DS} = \frac{q\mu p_0 t w}{L V_p} \left(V_p - V_g^{eff} + \frac{V_{DS}}{2} \right) V_{DS} \text{ dove } |V_{DS}| \ll |V_p - V_g^{eff}|$$

$$V_p = q p_0 / C_i$$

$$V_g^{eff} = V_g + V_{offset}$$

dove q è la carica elettronica, μ la mobilità del foro, p_0 la densità del foro iniziale nel semiconduttore organico quando la tensione di gate è zero. w e L sono rispettivamente la larghezza e la lunghezza del canale. t è lo spessore dello strato attivo. C_i è la capacità di gate effettiva del transistor, V_p è la tensione di spegnimento, V_g^{eff} è la tensione di gate effettiva e V_{offset} è la tensione di offset correlata alla caduta potenziale delle due interfacce: gate / elettrolita ed elettrolita/canale [69].

Poiché gli OEET non hanno bisogno di un elettrodo di riferimento, che a sua volta è ampiamente utilizzato nei sensori elettrochimici standard, possono essere prodotti mediante tecniche di fabbricazione soft, come spin coating, la lavorazione roll-to-roll e la stampa ink jet, consentendo la loro facile implementazione in oggetti reali come tessuto [70-72], carta [73] e plastica [74,75].

Di conseguenza, i sensori basati su transistor offrono numerosi vantaggi, tra cui alta sensibilità, possibilità di miniaturizzazione e una semplice lettura elettrica. Diversi OEET, dotati di un elettrodo di gate metallico, sono stati sviluppati per misurare la concentrazione di diversi composti chimici come cationi, [76,77] dopamina, [78,79] adrenalina [80] e glucosio [81-85].

1.5.1 OEET con elettrodi interamente fatti in PEDOT:PSS

A differenza dei semiconduttori classici che possono essere arricchiti di cariche o lacune, i semiconduttori organici durante un drogaggio elettrochimico scambiano in contemporanea elettroni e ioni che bilanciandosi svolgono un processo paragonabile a un'ossidazione in una cella elettrolitica. L'ossidazione del polimero conduttore PEDOT:PSS avviene lungo

l'asse relativo allo scambio di elettroni. Per mantenere l'elettroneutralità del polimero avviene anche uno scambio di ioni che coinvolge le molecole di solvente della sfera di solvatazione come schematizzato in figura 8.

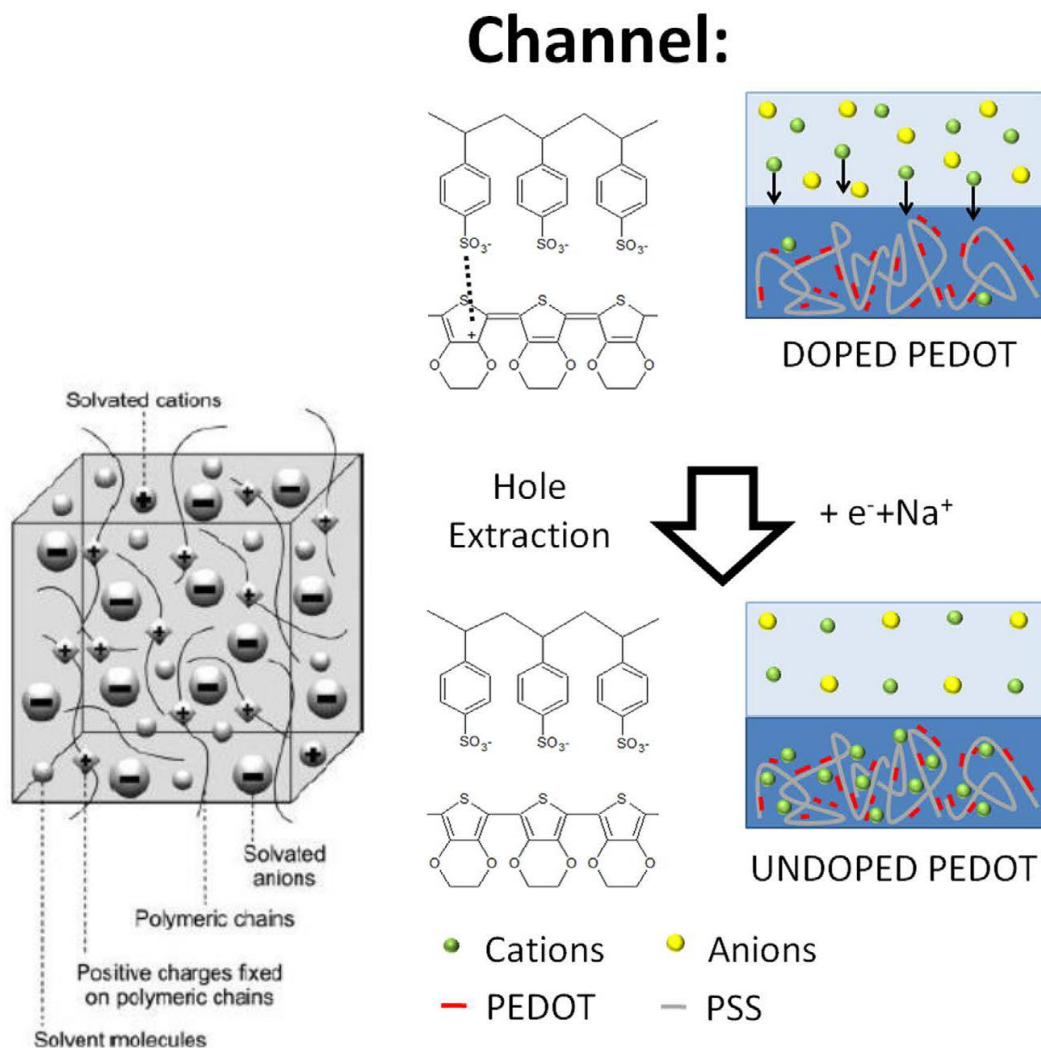


Figura 8 Immagine schematizzata del reticolo polimerico del PEDOT:PSS in uno stato drogato.

L'elettrodo di gate controlla il livello di drogaggio del polimero nel canale: quando viene applicato un voltaggio positivo all'elettrodo di gate, i cationi migrano dall'elettrolita al canale ed entrano nel polimero rimuovendo il drogaggio (de-dopandolo) diminuendone di conseguenza la conducibilità. Questo fenomeno di de-doping del canale è tipico per drogaggi di tipo p i quali sono tipici dei polimeri coniugati. La reazione elettrochimica di base è:

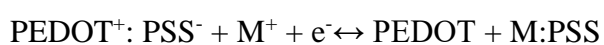




Figura 9 OEET di PEDOT:PSS su vetro

Gli OEET in cui tutti gli elettrodi sono realizzati in PEDOT: PSS (Figura 9) quando utilizzati come sensori, sfruttano la capacità di tale polimero di ossidare elettrocataliticamente i polifenoli. Questa caratteristica garantisce numerosi vantaggi rispetto ai dispositivi che utilizzano metalli come elettrodo di gate. Il costo di fabbricazione è significativamente ridotto, perché il costoso elettrodo di gate metallico viene sostituito da PEDOT: PSS, che consente anche l'impiego di una tecnica di deposizione unica ed economica per l'intero dispositivo. [86] Inoltre, grazie alle sue proprietà meccaniche, PEDOT:PSS è particolarmente adatto per applicazioni di elettronica flessibile [87]. Sebbene gli OEET realizzati completamente da un polimero conduttore siano stati descritti in letteratura, [88,89] solo pochi articoli [90,91] li hanno proposti come sensori chimici ed entrambi utilizzano una trasduzione enzimatica. Dal momento che il PEDOT ossida direttamente le molecole redox-attive nessun enzima o altro mediatore redox è necessario per il sensing, riducendo il costo della fabbricazione del dispositivo.

Nel laboratorio presso cui ho svolto la tesi, è stato studiato in modo approfondito il funzionamento dell'OEET come sensore, prendendo come riferimento di analita l'acido ascorbico, dato che il suo comportamento redox è ben noto. La figura 10 mostra il grafico I_d -tempo (per $V_g = +0.4V$ e $V_d = -0.3V$) mentre diverse quantità di acido ascorbico vengono aggiunte alla soluzione elettrolitica. Poiché i potenziali non sono applicati rispetto a un elettrodo di riferimento, come accadrebbe impiegando un potenziostato, V_g e V_d possono variare durante l'ossidazione dell'acido ascorbico portando a una variazione di I_d . L'acido ascorbico aggiunto in queste condizioni (V_g positivo) reagisce all'elettrodo di gate, iniettando elettroni nel PEDOT:PSS e spingendo V_g verso valori più bassi. Di conseguenza, alcuni siti del PEDOT:PSS subiscono ossidazione, aumentando I_g per mantenere la differenza di potenziale tra il gate e il source, il quale non è implicato nei processi dell'acido ascorbico. I_g

più elevati portano ad un maggiore de-doping del canale che è misurato dalla diminuzione di I_d . Osservando il grafico, il valore di I_d dipende linearmente dal $\log C_{\text{acido ascorbico}}$, ciò indica che il transistor può essere adoperato per determinare la concentrazione di tale composto [52].

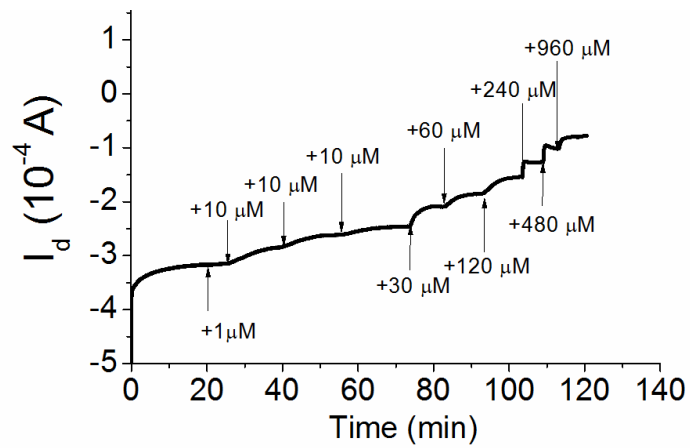


Figura 10 Corrente di drain al variare della concentrazione di acido ascorbico nella cella elettrolitica ($V_g=+0.4\text{V}$ $V_d=-0.3\text{V}$).

2. SCOPO DELL'ELABORATO

Lo scopo dell'elaborato consiste nell'ottimizzazione dei parametri di un metodo analitico in cui sono utilizzati dei transistor OECT fabbricati interamente in PEDOT:PSS e utilizzati come sensori elettrochimici dei polifenoli. In particolare, la ricerca è stata rivolta all'analisi della riproducibilità del segnale elettrochimico sensibile ai polifenoli, alla determinazione della concentrazione totale dei polifenoli in campioni di vino di diverse tipologie e provenienze, e infine, al confronto della concentrazione ottenuta con quella ottenuta con i metodi ufficiali spettrofotometrici come il metodo Folin-Ciocalteu e l'indice di polifenoli totali I_{280} . I parametri da ottimizzare riguarderanno la scelta del tampone utilizzato come elettrolita, il pH del tampone, i valori/ l'intervallo dei valori di potenziale applicati ai transistor, la concentrazione di vino nella cella elettrochimica.

3. PARTE SPERIMENTALE

Vengono di seguito riportate tutte le specifiche relative ai reagenti ed alla strumentazione analitica impiegata per la realizzazione delle prove sperimentali.

3.1 Strumentazione

Strumento	Specifiche
Potenziostato	CHINSTRUMENTS Electrochemical WorkStation, Modello 660C
Potenziostato	AUTOLAB Metrohm PGSTAT 128N
Bilancia analitica	AT21 Comparator, Mettler Toledo Incertezza: ± 0.000001 g Pesata massima: 22 g
Bilancia analitica	SCALTEC SPB32 Incertezza: ± 0.0001 g Pesata massima: 120 g
milliVoltmetro/ pH-metro	Mod.338, AMEL INSTRUMENTS Elettrodo a vetro combinato, mod 211/SGG/12, AMEL
Bagno ad ultrasuoni	Bandelin Sonorex Super RK 510 H
Bipotenziostato	CHINSTRUMENTS Electrochemical WorkStation, Modello 900B
Spettrofotometro	Hewlett Packard

Per gli esperimenti elettrochimici iniziali con il potenziostato normale è stata utilizzata una comune cella a tre elettrodi (Figura 11) composta da:

- Elettrodo di lavoro (WE): Gate dell'OECT in PEDOT:PSS
- Elettrodo di riferimento (RE): elettrodo al calomelano saturo (SCE), AN25716A
- Contro-elettrodo (CE): filo di Pt, Sigma-Aldrich.

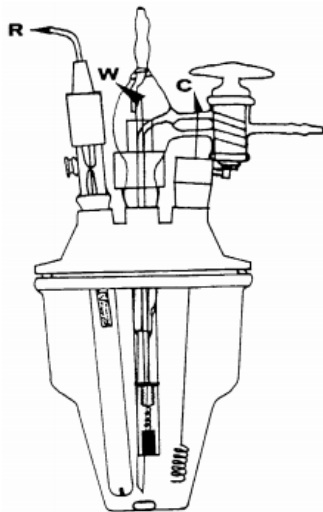


Figura 11 Schema di una cella a tre elettrodi

Per gli esperimenti elettrochimici successivi con il bipotenziostato nella cella a tre elettrodi viene inserito solamente il transistor, per cui nel source vengono cortocircuitati i contatti del elettrodo di riferimento e del contro elettrodo, l'elettrodo di lavoro è in contatto con il gate, il drain viene collegato con l'elettrodo ausiliario.

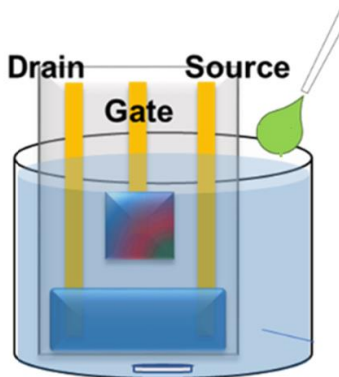


Figura 12 Raffigurazione schematica di un OEET all'interno della cella elettrochimica

Per preparare le soluzioni è stata utilizzata comune vetreria da laboratorio, comprendente:

- Becker
- Micropipette tarate
- Pipette tarate
- Matracci
- Celle elettrochimiche
- Imbuti
- Agitatori magnetici

I grafici sono stati elaborati con il programma Origin 9.0 e le rette di calibrazione sono state costruite con Microsoft Excel 2013 e con Origin 9.0.

3.2 Reagenti

Nome	Formula chimica	Casa produttrice	Titolo minimo	Specifiche
Sodio acetato anidro	CH ₃ COONa	Sigma-Aldrich	≥ 99.0 %	82.03 g/mol
Acido acetico	CH ₃ COOH	Sigma-Aldrich	99-100 %	60.05 g/mol
Fosfato di potassio monobasico	H ₂ KPO ₄	Sigma-Aldrich	99.5 %	136.09 g/mol
Idrossido di sodio	NaOH	Sigma-Aldrich	≥ 98%	39.997 g/mol
Acido gallico	C ₇ H ₆ O ₅	Sigma-Aldrich	≥ 98.0 %	170.12 g/mol
Etanolo	C ₂ H ₆ O	Fluka	99.8 %	46.07 g/mol
Idrossido di potassio	KOH	Emplura	≥84.0%	56.11 g/mol

Tutte le soluzioni sono state utilizzate usando acqua UPP, ottenuta da un sistema che opera in osmosi inversa (Waters) in modo tale da evitare ogni interferenza o contaminazione durante la misura.

3.3 Costruzione e preparazione del transistor

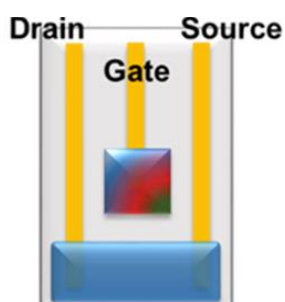


Figura 13 Raffigurazione schematica di un OEET di PEDOT:PSS su vetro

La Figura 13 mostra una rappresentazione schematica dei transistor utilizzati nel progetto di tesi. Il dispositivo è composto da tre elettrodi paralleli di Cr/Au che lavorano come terminali di source, drain e gate. Le piste di Cr/Au sono depositate attraverso evaporazione termica con l'ausilio di una maschera. Lo strato di Au è depositato su uno strato di Cr precedentemente depositato in modo di aumentarne l'adesione al supporto di vetro.

Il film di PEDOT:PSS che funge da canale nel transistor è depositato con spin-coating in modo da essere in contatto con gli elettrodi di source e drain. La soluzione utilizzata per lo spin coating è composta da PEDOT:PSS CleviosTM PH 1000 (78.95 %), etilen glicole (20 %), 3-glicidilossipropiltrimetossisilano (1 %) e acido dodecilbenzen sulfonico (0.05 %) ed è immersa per 10 min in bagno ad ultrasuoni prima dell'uso. Sulla superficie del substrato su cui è applicata una maschera in teflon è posta la soluzione, e lo spin coating è effettuato applicando una rotazione di 500 rpm per 10 s. Dopo una fase di essiccamento e cottura si ottiene un film sottile di PEDOT:PSS dello spessore di circa 800 nm. Una piccola quantità di pasta d'argento è depositata sull'estremità degli elettrodi di source, gate e drain in modo da evitare il loro deterioramento in seguito alla connessione con l'elettronica di lettura con l'ausilio di coccodrilli. La pasta viene fatta asciugare per 15 minuti e si controlla con l'OCP l'integrità del transistor e il contatto elettrico fra l'OEET e la pasta d'argento aderita. Prima di effettuare le misure elettrochimiche per "una buona idratazione della parte polimerica" il transistor viene immerso nella cella contenente il tampone fino a coprire la parte in PEDOT:PSS del gate e poi viene eseguita una voltammetria ciclica di quattro cicli, applicando una scansione lineare del potenziale sul gate da -0.7V a + 0.7 V e sul drain un potenziale di -0.1V nel tampone fosfato 0.1 M a pH 5.5 usato come elettrolita, alla velocità di scansione di 0.01V/s. Lo stesso procedimento viene eseguito per "pulire" il transistor dopo aver effettuato la prova elettrochimica sul campione o sullo standard cercando di ridurre gli effetti dell'avvelenamento del transistor. Dopo l'utilizzo il transistor viene mantenuto in un luogo asciutto a temperatura ambiente.

3.4 Misure elettrochimiche

- *Misure con il potenziostato*

Per le prove preliminari è stato scelto come analita l'acido gallico, che può essere ossidato ad un elettrodo modificato con PEDOT:PSS polarizzato ad un potenziale anodico opportuno; inoltre la concentrazione totale dei polifenoli è solitamente espressa in quantità di acido

gallico equivalenti. Eseguendo voltammetrie cicliche in tampone (fosfato a pH 5.5 e pH 7, acetato a pH 4.5), per aggiunte crescenti di acido gallico si osserva un aumento crescente della corrente anodica, più o meno intenso a seconda del tampone, dovuta all'ossidazione dell'acido gallico, accompagnato da un de-doping del PEDOT che reagisce con l'acido. Sulla base delle indicazioni fornite dalla risposta in voltammetria ciclica, per eseguire le misure cronoamperometriche in presenza dell'analita, si è deciso di lavorare a +0.35 V (Figura 14). La cronoamperometria è una tecnica potenziostatica che permette di registrare come varia nel tempo la corrente, in funzione della concentrazione dell'analita di interesse. Dai valori di corrente e di concentrazione si costruiscono le rette di calibrazione, le cui pendenze indicano la sensibilità del sensore nei confronti dell'analita e dell'elettrolita in cui si trova.

- *Misure con il bipotenziostato*

Dal potenziostato normale si è passato al bipotenziostato, in cui vengono fatte misure per la caratterizzazione del transistor eseguendo voltammetrie cicliche per creare delle curve caratteristiche, mantenendo costante V_g e variando V_d per ogni misura, viceversa, a V_d costante e V_g variabile in un certo intervallo (es. da -0.7V a +0.7V) per sviluppare le curve transcaratteristiche. Si definisce transcaratteristica (o più semplicemente caratteristica) la funzione di trasferimento che, in uno strumento di misura, lega la grandezza d'uscita con la grandezza d'ingresso:

$$G_{out} = f(G_{inp})$$

dove: G_{out} = grandezza d' uscita

G_{inp} = grandezza d'ingresso

f = transcaratteristica

I valori della corrente rilevate da quest'ultime a concentrazioni crescenti di acido gallico servono a costruire le rette di calibrazione, a concentrazioni crescenti o costanti di vino per dimostrare la riproducibilità del segnale.

Tecniche eseguite al bipotenziostato:

- Curva Corrente (I_d) – tempo (t) ($V_d = -0.1V$, $V_g = +0.5V$) per 120s
- Curva Corrente (I_d) – tempo (t) pulsata a potenziali differenti ($V_d = -0.1V$, $V_{g1} = -0.5V$, $V_{g2} = +0.7V$) per 60s
- Curva transcaratteristica ($V_d = -0.1V$ $V_g = -0.7...+0.7V$)

3.5 Trattamento dei vini

I vini, dopo l'apertura e il prelievo con la micropipetta o la pipetta tarata, sono mantenuti sotto flusso di azoto, tappati e conservati in frigo a 4°C per la conservazione. Per le misure

elettrochimiche e spettrofotometriche sono state prelevate quantità di vino in base ai dati forniti in letteratura sulla loro concentrazione totale di polifenoli indicativa per i vini rossi, quelli bianchi e quelli rosati, affinché rientrino nella metà delle rette di calibrazione con acido gallico.

Lista dei vini utilizzati per le analisi con le loro etichette, i valori del pH e le conduttanze specifiche:

<i>Vino</i>	<i>Nominativo</i>	<i>pH</i>	<i>Conduttanza specifica ($\omega^{-1}cm^{-1}$)</i>
Remolè Toscana	Tosc	3,35	2,275
Nero D'Avola	NDA	3,36	2,567
Sangiovese Rubicone	SG	3,29	2,752
Chianti	CH	3,45	2,884
Ronco San Crispino Sangiovese-Merlot	M	3,45	2,847
Vino rosso Tavernello	T	3,55	2,861
Vino rosso Acinello	A	3,42	2,972
Vino rosso COOP	C	3,54	3,238
Vino bianco Tavernello	TaverB	3,14	2,171
Vino bianco COOP	CoopB	3,37	2,376
Ronco San Crispino Pinot-Chardonnay	PinCh	3,16	2,484
Freschello	Fresch	3,30	2,595
Vino di cantina Franconia 1	Franc1	3,43	2,547
Vino di cantina Franconia 2	Franc2	3,62	2,707
Vino di cantina Lambrusco	Lambr	3,45	2,686
Vino di cantina Toscano	Tosccant	3,47	2,460
Rocca Ventosa Cerasuolo d'Abruzzo	I	3,15	1,808
Assieme Sangiovese- Cabernet Sauvignon	II	3,44	2,879

Mezzacorona Schiava Trentino	III	3,47	2,594
Tenuta Ca'Vescovo Cabernet Sauvignon	IV	3,55	2,663
San Cipriano Merlot	V	3,40	2,376
La Mora Morellino di Scansano	VI	3,48	2,563
Rosé Lambrusco di Modena	VII	3,28	2,749
Fontanafredda Langhe	VIII	3,57	2,586
Tiare Cabernet Franc	IX	3,61	1,760
Lamberti Rosato delle Venezie	X	2,99	2,852
Tenuta Ca'Vescovo Merlot	XI	3,53	2,542
Ancillotto	XII	3,72	3,342
Primitivo	XIII	3,49	3,102

3.6 Metodo di Folin – Ciocalteu

Il metodo di Folin-Ciocalteu per la determinazione del contenuto totale dei polifenoli è stato svolto secondo le modalità e variazioni suggerite dagli articoli di Singleton e Rossi [92,93].

In matracci tarati da 10 mL sono state effettuate le seguenti aggiunte nell'ordine indicato:

- a) 1mL della soluzione di standard o campione diluito da analizzare;
- b) 5 mL del reattivo di Folin-Ciocalteu (FCR), diluito in rapporto 1:10 con H₂O distillata;
- c) soluzione 75g/L di Na₂CO₃ (pH>11), fino al volume di 10mL.

Le soluzioni così preparate, sono state vigorosamente agitate per circa un minuto, aspettando successivamente un periodo di 1.5-2 ore al buio alla temperatura di 25°C, affinché possa decorrere completamente la reazione e l'assorbanza raggiunga un valore stabile.

Al termine della reazione tra il reattivo di Folin-Ciocalteu e i vari substrati ossidabili, si effettua la quantificazione per via spettrofotometrica, lavorando alla lunghezza d'onda di 765 nm. È stata poi costruita una retta di calibrazione impiegando come standard l'acido gallico,

composto che nell'articolo di Singleton viene impiegato per esprimere il contenuto totale di polifenoli, valutato in termini acido gallico equivalenti (Gallic Acid Equivalents o GAE).

3.7 Indice di polifenoli I₂₈₀

Per la determinazione del contenuto totale di composti polifenolici nei vini è stato anche considerato l'indice di polifenoli I₂₈₀: il vino è stato diluito con acqua bidistillata (1:100 o 1:50 per i vini rossi, 1:10 per i vini bianchi e per i rosati) e l'assorbanza è stata misurata direttamente a 280 nm. Il valore di I₂₈₀ per ciascun campione è stato dato come assorbanza moltiplicata per il proprio fattore di diluizione.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Studio della risposta del PEDOT:PSS all'acido gallico

Essendo il transistor costituito interamente da PEDOT:PSS la parte iniziale del mio lavoro ha riguardato lo studio della risposta dell'acido gallico ad un elettrodo di PEDOT:PSS, per poi passare successivamente all'analisi della risposta del transistor. Per fare ciò l'elettrodo di gate del transistor è collegato al potenziostato ed utilizzato come elettrodo di lavoro, in una normale cella a tre elettrodi in cui il potenziale è misurato rispetto ad un elettrodo a calomelano saturo (SCE). L'elettrodo è stato inizialmente sottoposto a cinque cicli voltammetrici da -0.2 V a +0.6 V, con velocità di scansione pari a 0.01 V/s registrando la voltammetria in presenza della sola soluzione elettrolitica (bianco). In seguito, sono state eseguite alcune aggiunte di acido gallico (AG), come riportato in figura 14, per testare il comportamento redox del PEDOT:PSS.

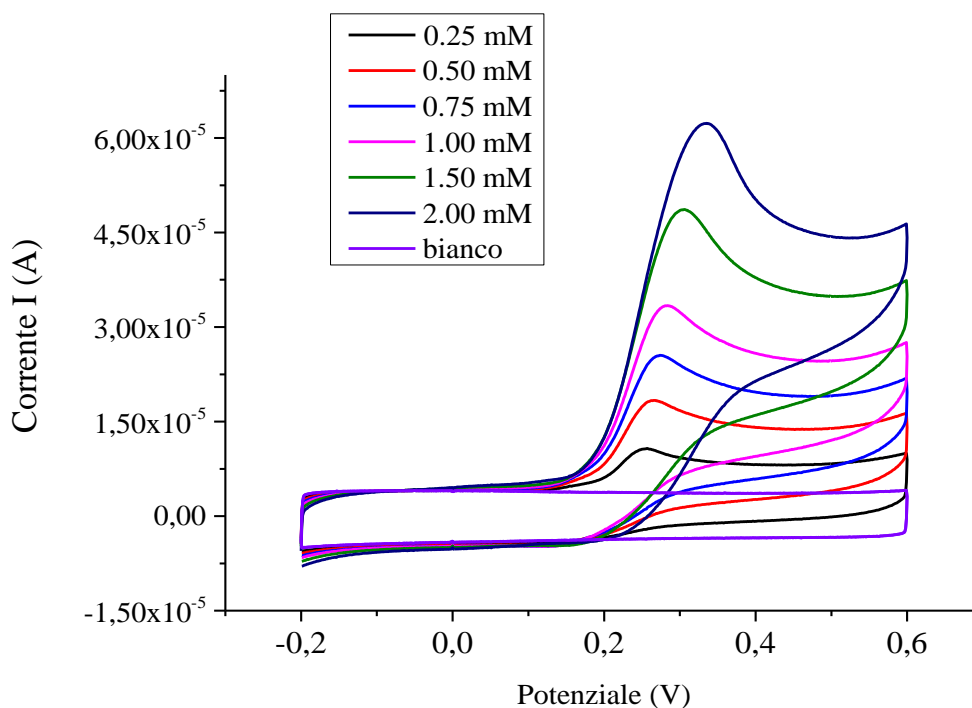


Figura 14 Curve CV registrate in tampone acetato 0.1 M, ad una velocità di scansione di 0.005 V/s, relative alla risposta di un transistor a seguito delle aggiunte di acido gallico.

Con l'aggiunta di acido gallico si osserva una nuova onda redox con un massimo a circa +0.35 V.

La corrente di picco anodica aumenta con il crescere della concentrazione di acido gallico, quindi, il valore del potenziale di picco anodico viene scelto per le prove seguenti in cronoamperometria, poiché rappresenta la condizione in cui la reazione di ossidazione dell'acido gallico è più favorita.

L'assenza di onde catodiche suggerisce che PEDOT: PSS ossida l'acido gallico seguendo una via elettrocatalitica [94]. La reazione tra acido gallico e PEDOT ossidato può essere spiegata con questo schema di reazione:



4.2 Prove Cronoamperometriche

Inizialmente, è stata condotta una cronoamperometria sotto agitazione costante (Figura 15), ad un potenziale di 0.35 V scelto in base alle prove voltammetriche mostrate in precedenza. L'aggiunta di analita a concentrazione nota (per esempio 20 μL di soluzione 0.1M di acido gallico) veniva eseguita ogni 100 s dopo una stabilizzazione del segnale di 200 secondi.

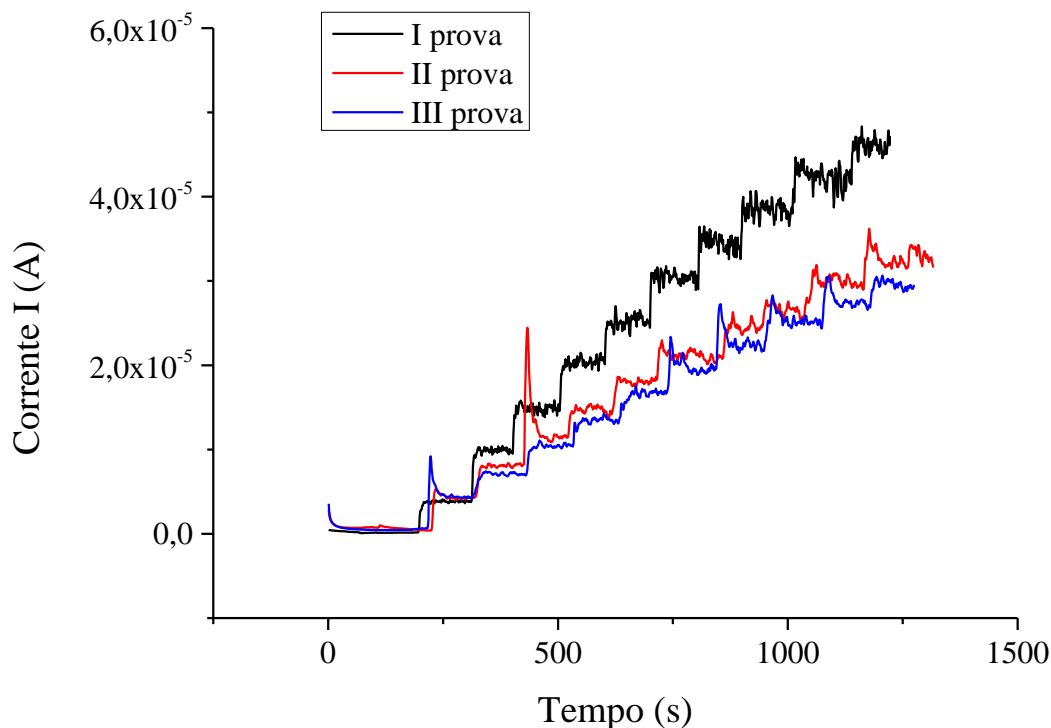


Figura 15 Risposta cronoamperometrica, registrata a +0.35 V, per aggiunte crescenti di acido gallico (20 μL di soluzione 0.1M) ad un elettrodo di PEDOT:PSS

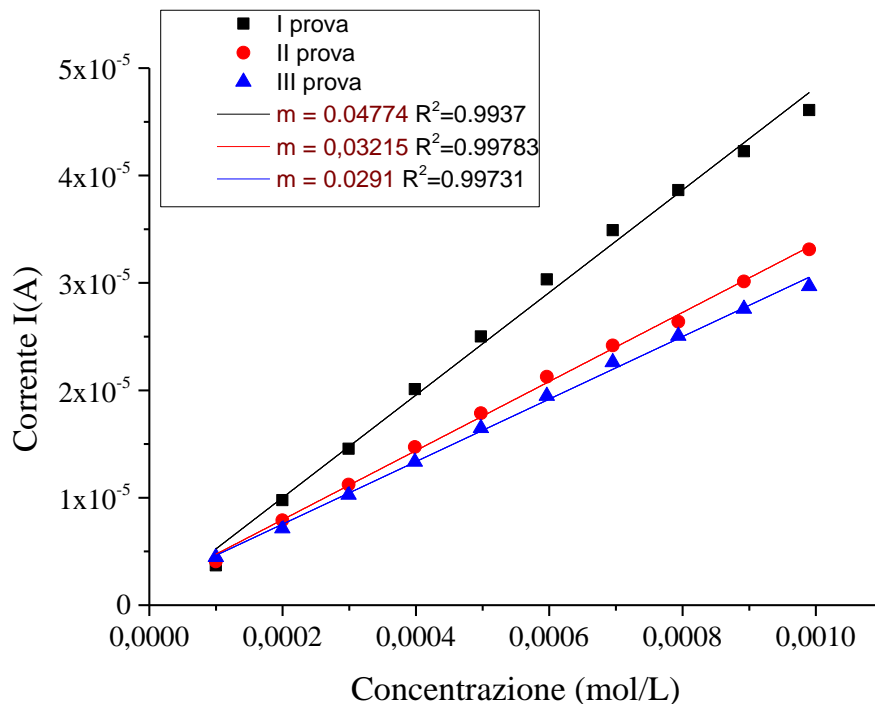


Figura 16 Rette di calibrazione riferite alle misure cronoamperometriche, registrate a 0.35 V con agitazione, per aggiunte crescenti di acido gallico con un elettrodo di PEDOT:PSS al tampone fosfato salino 0.1M a pH 5.5

In base ai valori registrati di corrente quando il segnale si stabilizza, vengono costruite le rette di calibrazione comprendenti questi valori in funzione della concentrazione dell'analita nella cella in seguito alle aggiunte.

Eseguendo prove successive, sempre nelle stesse condizioni, si osserva una diminuzione di sensibilità dovuta all'avvelenamento del PEDOT:PSS costituente l'elettrodo di lavoro (Figura 16).

Poiché le misure precedenti hanno mostrato una diminuzione della sensibilità nel tempo, si è utilizzato un secondo metodo, la cronoamperometria senza agitazione. In questa metodologia dapprima si registra il valore della corrente del "bianco" (in assenza di analita) fino a stabilizzazione (2 minuti), poi si aggiungono 20 μL di soluzione di acido gallico 0.1M e si fa partire l'agitazione per un tempo di circa 30s. Trascorso tale tempo si registrano di nuovo i valori della corrente, in assenza di agitazione. Il metodo è stato ripetuto per un minimo di 5 aggiunte per consentire la costruzione della retta di taratura e per la calibrazione sono stati considerati i valori di corrente registrati al 120-esimo secondo dall'applicazione del potenziale (Figura 17).

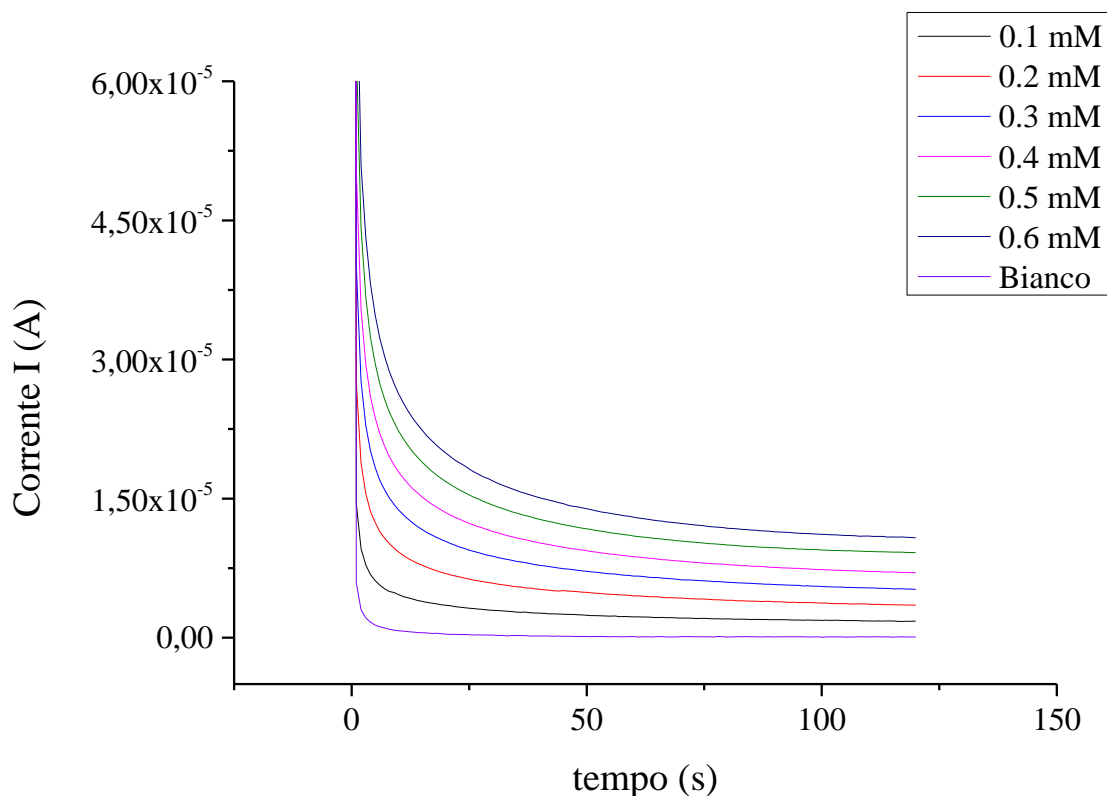
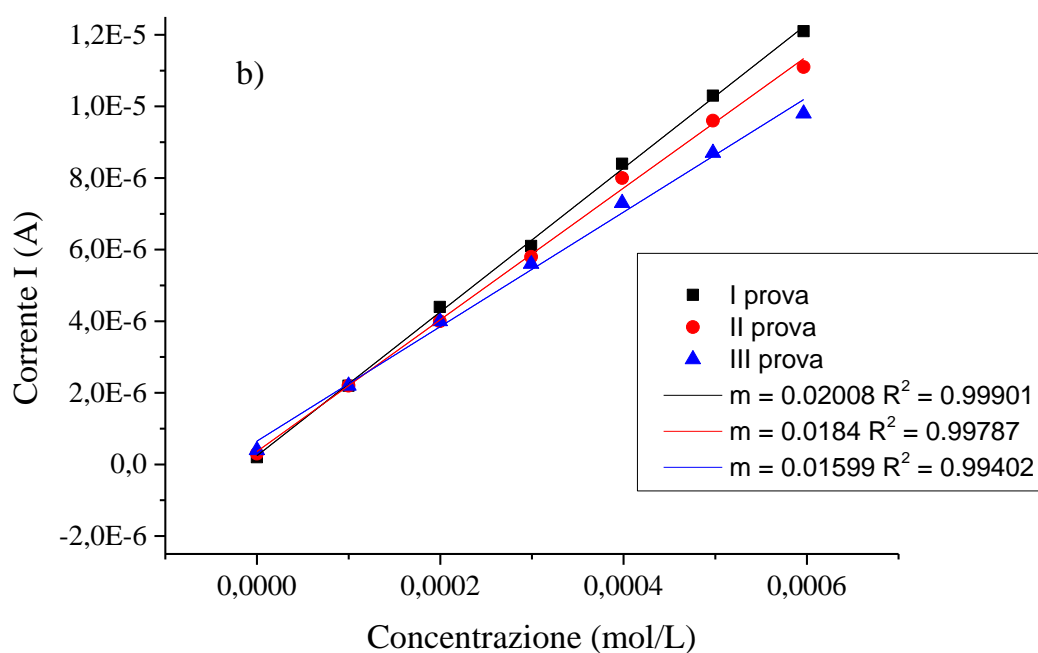
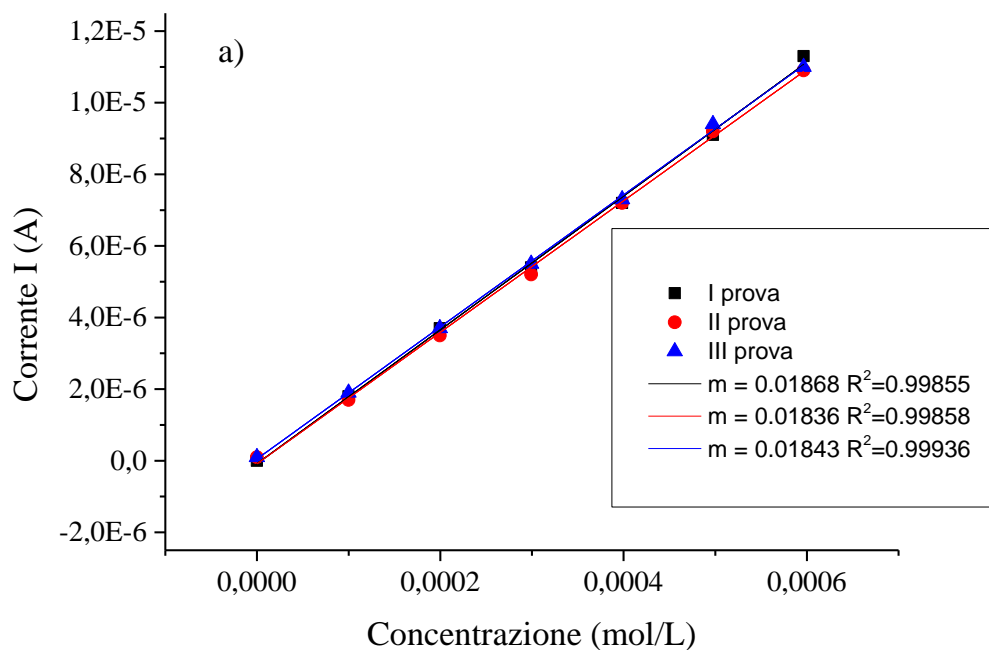


Figura 17 Risposte cronoamperometriche relative a concentrazioni crescenti di acido gallico in PBS 0.1M a pH 5.5, ottenute con il metodo della cronoamperometria senza agitazione, operando a $E=+0.35$ V, ad un elettrodo di PEDOT:PSS (aggiunte da 20 μ L, tempo di agitazione 120 s).

Questo metodo fornisce una riduzione del rumore strumentale ed un aumento della precisione del dato, utile per la riproducibilità. Infatti, dalla figura del grafico le tre prove eseguite con le stesse condizioni mostrano una maggiore riproducibilità dei dati rispetto alle prove svolte con agitazione. Si deduce anche un minore “avvelenamento” del transistor per la mancata agitazione (Figura 18 a).

4.2.1 Influenza del pH sulla sensibilità e stabilità della risposta



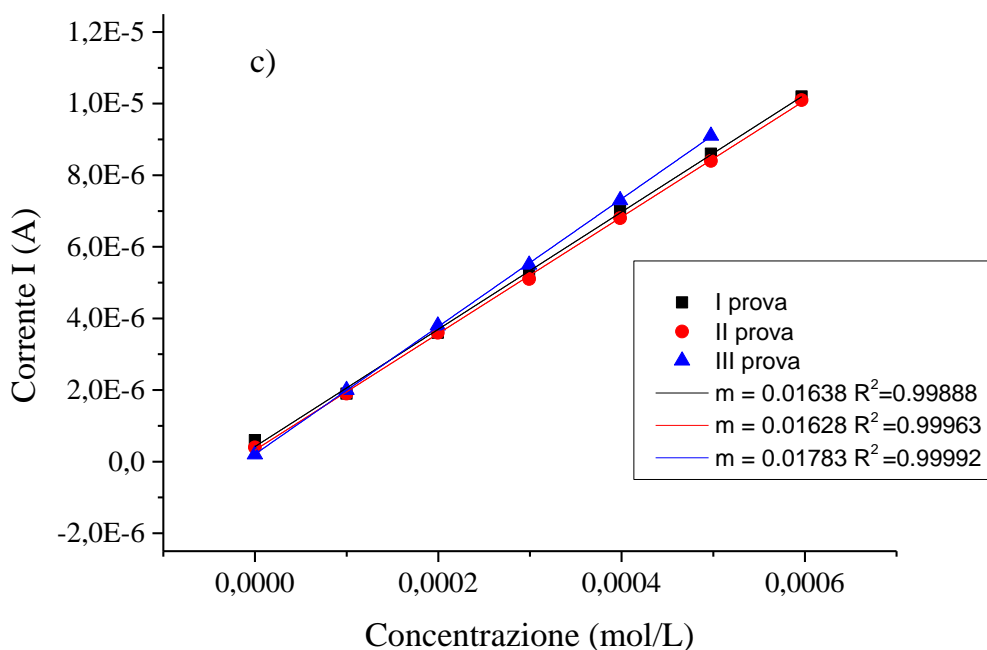


Figura 18 Rette di calibrazione riferite alle misure cronoamperometriche, registrate a 0.35 V, per aggiunte crescenti di acido gallico (20 μ L 0.1M) ad un elettrodo di PEDOT:PSS diversi tamponi: a) tampone fosfato salino 0.1M a pH 5.5 b) tampone fosfato salino 0.1M a pH 7 c) tampone acetato 0.1 M a pH 4.5

Variando il pH del tampone, portandolo da 5.5 a 7 (figura 18 b) si ha un leggero aumento di pendenza della retta di calibrazione, ma eseguendo più prove la pendenza diminuisce notevolmente.

Se invece si utilizza come soluzione tampone acetato di pari forza ionica e pH 4.5 la sensibilità della risposta decresce leggermente rispetto a quella nel tampone PBS e la risposta resta inalterata in misure successive (figura 18 c).

4.2.2 Misure nei campioni di vino

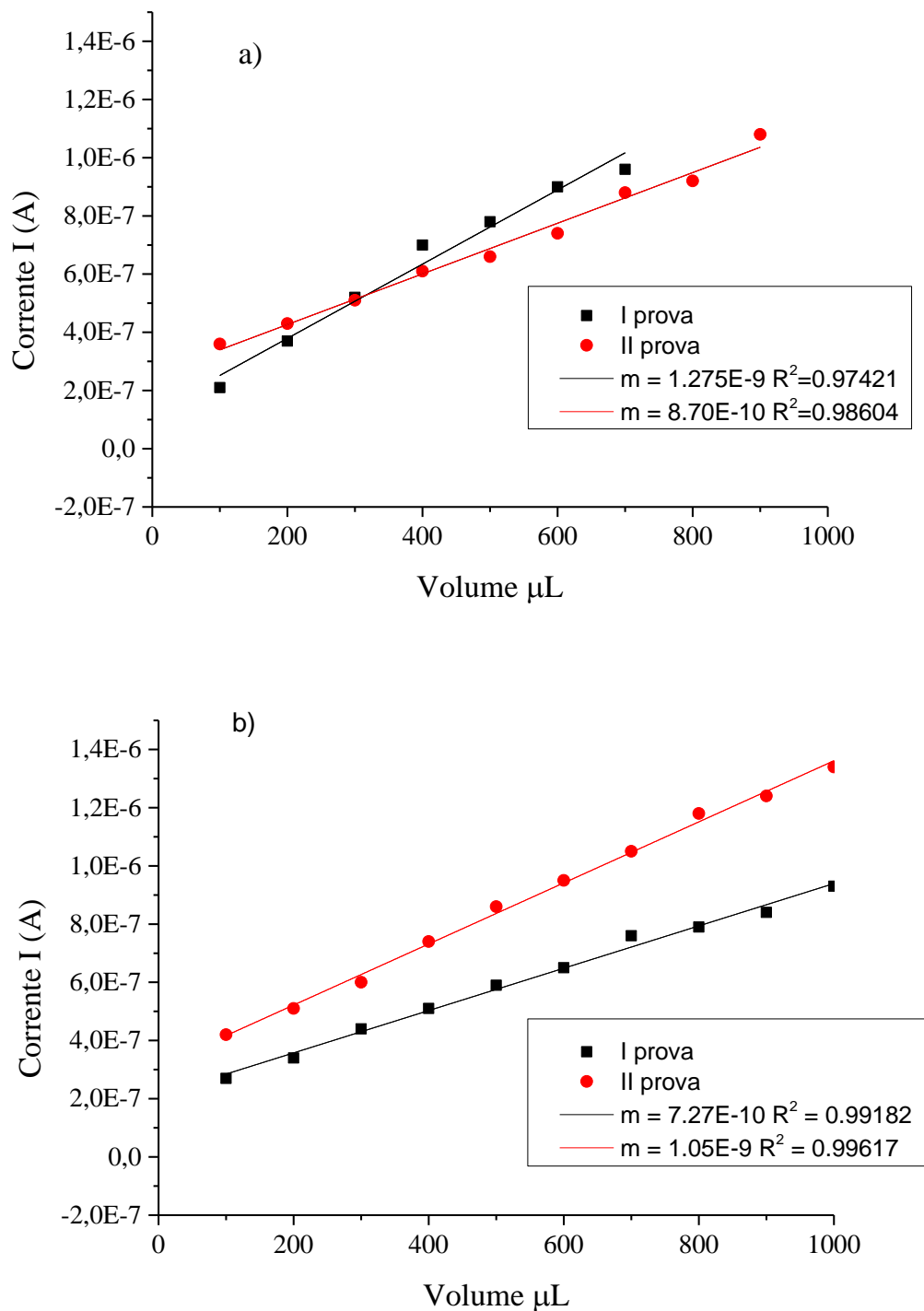


Figura 19 Rette di calibrazione riferite alle misure cronoamperometriche, registrate a 0.35 V, per aggiunte crescenti di vino ($100\mu\text{L}$) ad un elettrodo in PEDOT:PSS a diversi tamponi: a) tampone fosfato salino 0.1M a pH 5.5 b) tampone acetato 0.1 M a pH 4.5

Nelle condizioni sperimentali migliori (pH 4.5 e pH 5.5) sono state eseguite misure con il campione di vino.

Il vino è una matrice complessa che oltre all'acido gallico contiene altri polifenoli, inoltre, anche altri composti ossidabili che possono interferire o sommarsi con il segnale dei polifenoli. Il vino utilizzato per le prove iniziali di cronoamperometria è il vino Barbera "Oltrepò Pavese". Nel caso la misura venga eseguita in tampone fosfato a pH 5.5 aumentando con aggiunte costanti (per esempio 100 μ L) la quantità di vino nella cella si osserva sì, la crescita della corrente anodica, ma con un andamento che superando un certo valore tende a deviare da lineare a "quasi" logaritmico (curva nera figura 19 a). Nella seconda prova invece si osserva una diminuzione della sensibilità e una variazione del valore del "bianco", che compromette la riproducibilità del dato.

Per quanto riguarda invece la misura eseguita in tampone a pH 4.5 si percepisce una maggiore variazione dell'intercetta ripetendo ulteriormente la prova, inoltre i valori dei segnali sono poco riproducibili.

Queste prove evidenziano che la tecnica cronoamperometrica non appare idonea all'analisi di campioni reali di vino, ma il metodo deve essere ancora ulteriormente ottimizzato, in particolare per ridurre l'avvelenamento del PEDOT che causa la scarsa riproducibilità. Si è quindi deciso di ottimizzare il metodo analitico passando al transistor mantenendo il tampone PBS 0.1M a pH 5.5.

4.3 Prove con il transistor

I risultati delle prove amperometriche riportate nei paragrafi precedenti dimostrano che se il PEDOT:PSS è abbastanza ossidato ($E > 0.30$ V vs SCE), esso può subire riduzione da parte dell'acido gallico. Questa caratteristica è alla base della modalità operativa del transistor come sensore elettrochimico.

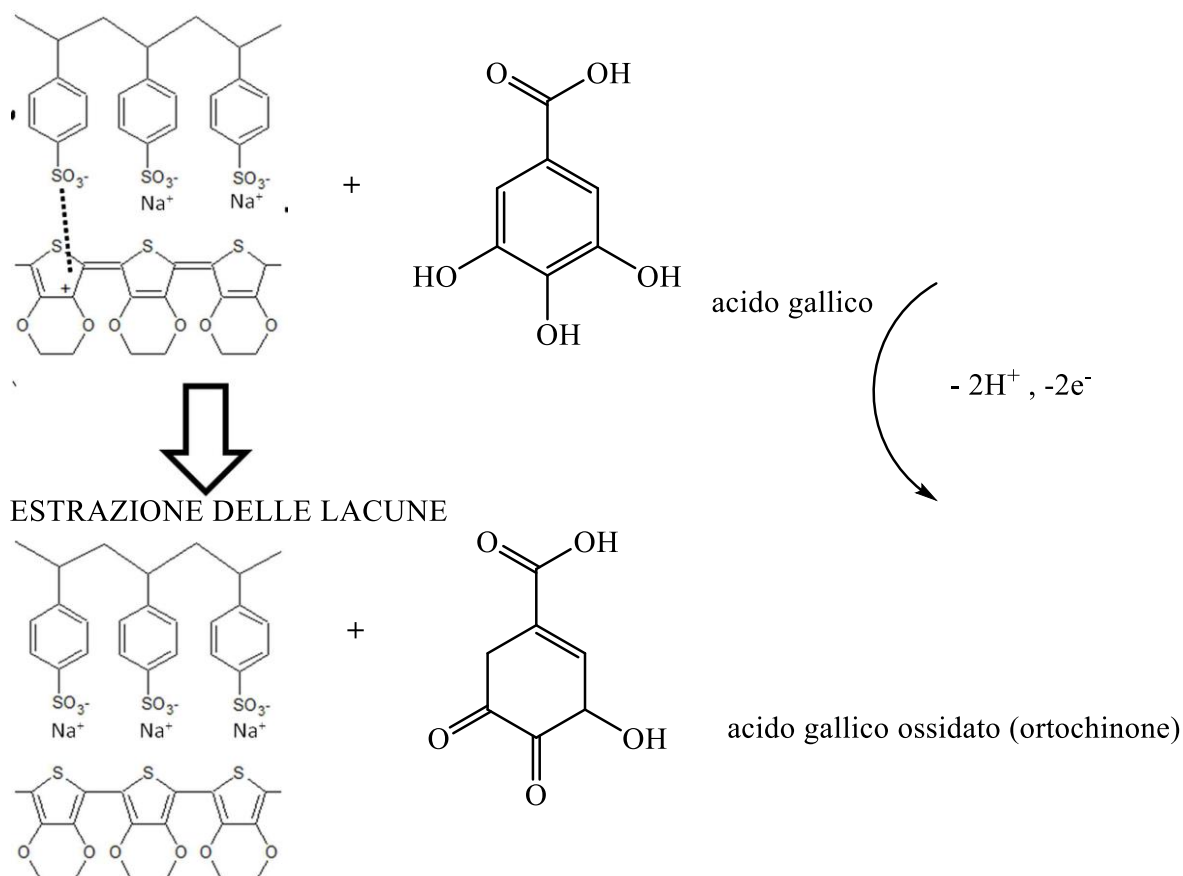


Figura 20 Reazione chimica tra acido gallico e PEDOT:PSS

Al bipotenziostato viene controllata l'integrità di tutte le parti costituenti il transistor, perciò viene misurata sia la corrente nel canale che unisce Source e Drain (I_d), sia la corrente che fluisce tra canale e Gate (I_g) (Figura 7). Per dimostrare il funzionamento del transistor come sensore una delle tecniche eseguite è la curva $I_d - t$. Si applica al gate il potenziale ($V_g = 0.5V$) in cui avviene maggiormente l'ossidazione dell'acido gallico in contatto con il PEDOT, il quale si trova sulla superficie del gate che opera analogamente all'elettrodo di lavoro in un sensore amperometrico. Questa reazione (Figura 20) di ossidazione induce la riduzione del PEDOT nel canale ovvero un suo de-doping facendo passare, quindi, meno corrente tra source e drain (I_d) per la progressiva mancanza di portatori di carica al suo interno (de-doping). Aumentando la concentrazione di acido gallico nella cella la diminuzione della corrente di drain è sempre più marcata. Dalla figura 21 si osserva, come atteso, una diminuzione della corrente I_d (presa come valore assoluto) direttamente proporzionale con la concentrazione di acido gallico.

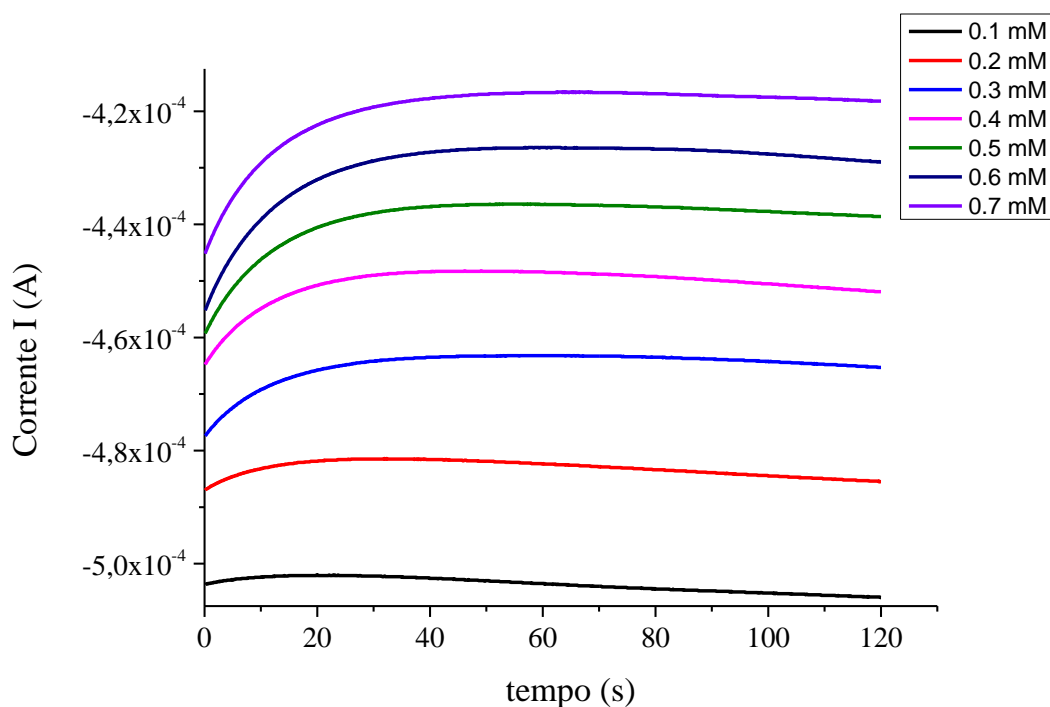


Figura 21 Risposte delle curve I_d-t relative alla corrente del canale e alle concentrazioni crescenti di acido gallico in PBS 0.1M a pH 5.5, ottenute con il metodo della cronoamperometria senza agitazione, operando a $V_g +0.5$ V e $V_d -0.1$ V, con il transistor fatto interamente in PEDOT:PSS (aggiunte da 20 μ L, tempo di agitazione 120 s).

La figura 22 fa riferimento alle rette di taratura ricavate dalle misure delle curve $I_d - t$ eseguite per due volte nelle stesse condizioni. Essendo l'analita (acido gallico) puro, esso causa un limitato avvelenamento sul PEDOT del transistor, quindi, il ripetersi della prova provoca un cambiamento trascurabile del valore della corrente I_d registrato nella prima prova, analogamente a quanto visto per le misure amperometriche precedenti. Tuttavia, come si osserva dalla Figura 22 le due prove mostrano un andamento non perfettamente lineare della risposta dalla concentrazione di acido gallico.

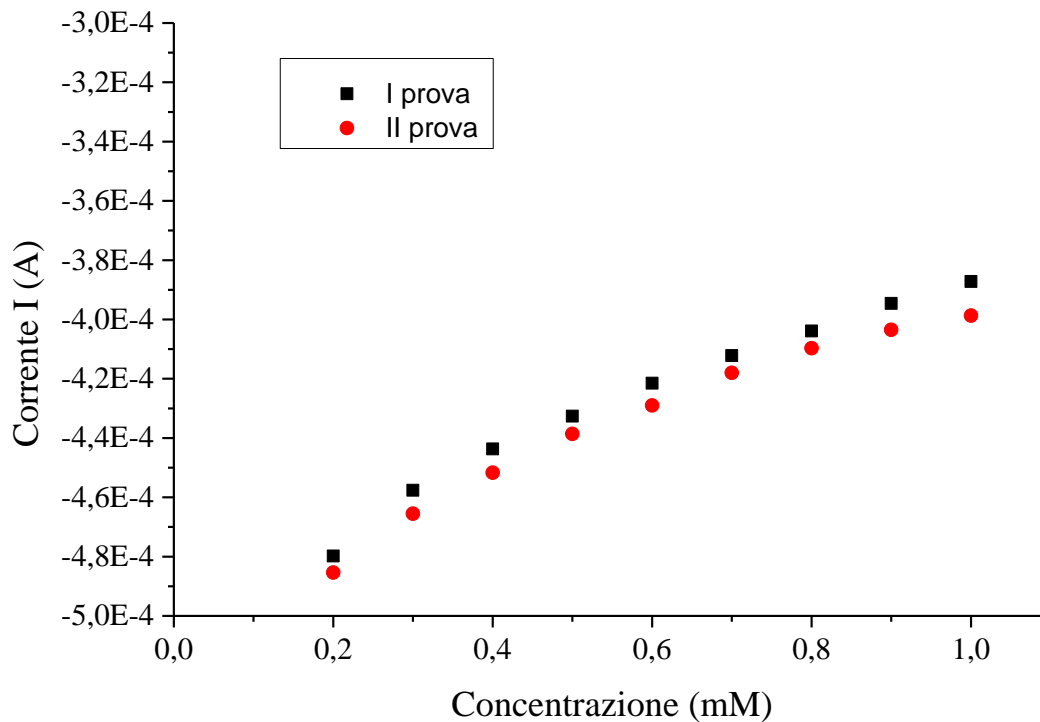


Figura 22 Rette di calibrazione riferite alle misure delle curve I_d-t , registrate a V_g 0.5 V e V_d -0.1, per aggiunte crescenti di acido gallico al PBS 0.1 M per il transistor fatto interamente in PEDOT:PSS e collegato al bipotenziostato.

L'aggiunta di vino (Barbera Oltrepò Pavese) (10 μ L) causa la saturazione del transistor già a volumi aggiunti piccoli (Figura 23), comportando dalla prima prova una deviazione dell'andamento della corrente da lineare a logaritmico (Figura 24). Inoltre, già dalla seconda prova, si osserva una riduzione notevole della sensibilità del transistor, dovuto all'avvelenamento.

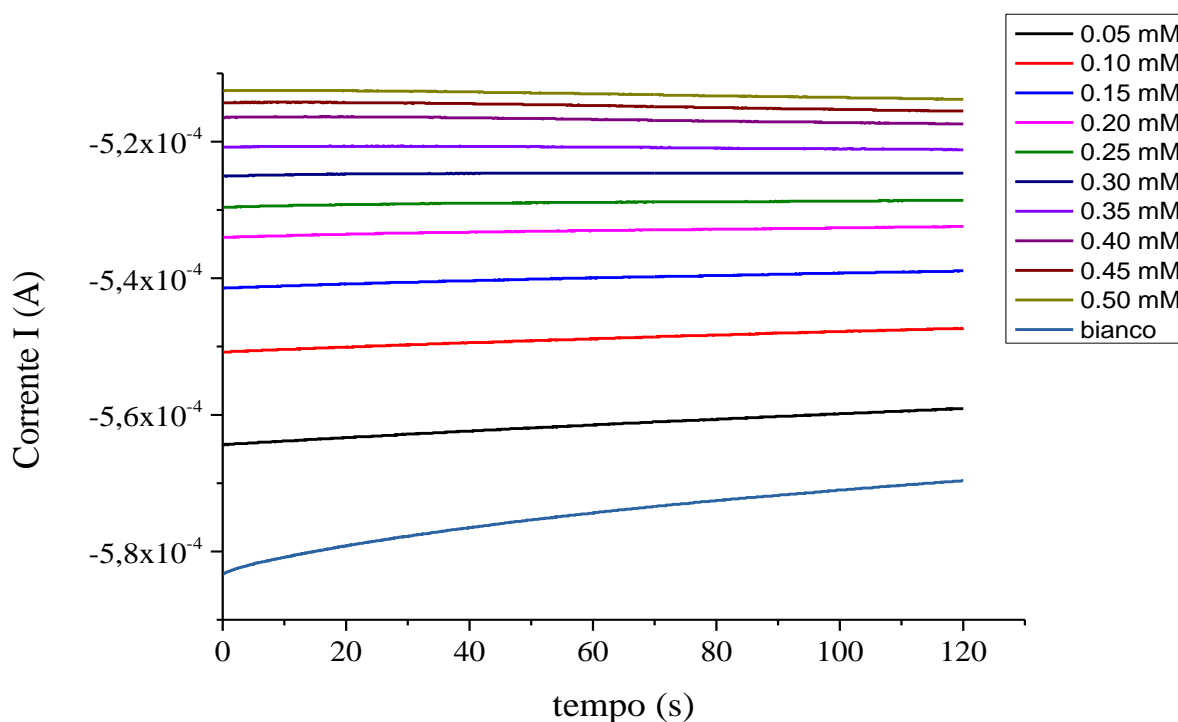


Figura 23 Risposte cronoamperometriche relative alla corrente del canale e alle concentrazioni crescenti di vino Barbera in PBS 0.1M a pH 5.5, ottenute con il metodo della cronoamperometria senza agitazione, operando a $V_g +0.5$ V e $V_d -0.1$ V, con il transistor fatto interamente in PEDOT:PSS (aggiunte da 10 μ L, tempo di agitazione 120 s).

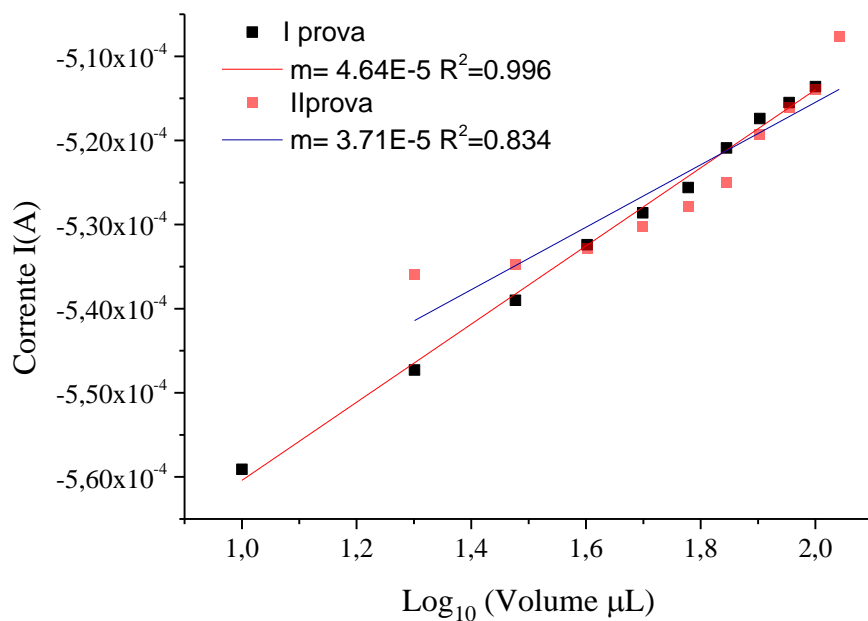


Figura 24 Rette di calibrazione riferita alle misure delle curve I_a-t , registrate a $V_g 0.5$ V e $V_d -0.1$, per aggiunte crescenti di acido gallico al PBS 0.1 M.

Queste prove rivelano dunque che il metodo analitico deve essere ancora ottimizzato, al fine di ridurre l'avvelenamento del transistor.

4.3.1 Curva $I_d - t$ pulsata a potenziali differenti

Si utilizza una tecnica pulsata (Figura 25) variando il potenziale V_g da -0.5 a $+0.7$ V ogni 5 s ed effettuando 3 scansioni per ogni potenziale. Cambiando bruscamente il potenziale le reazioni istantanee di ossidazione e riduzione dovrebbero ridurre l'avvelenamento del transistor. Il metodo mi permette di diminuire il tempo totale di scansione da 120s a 60s.

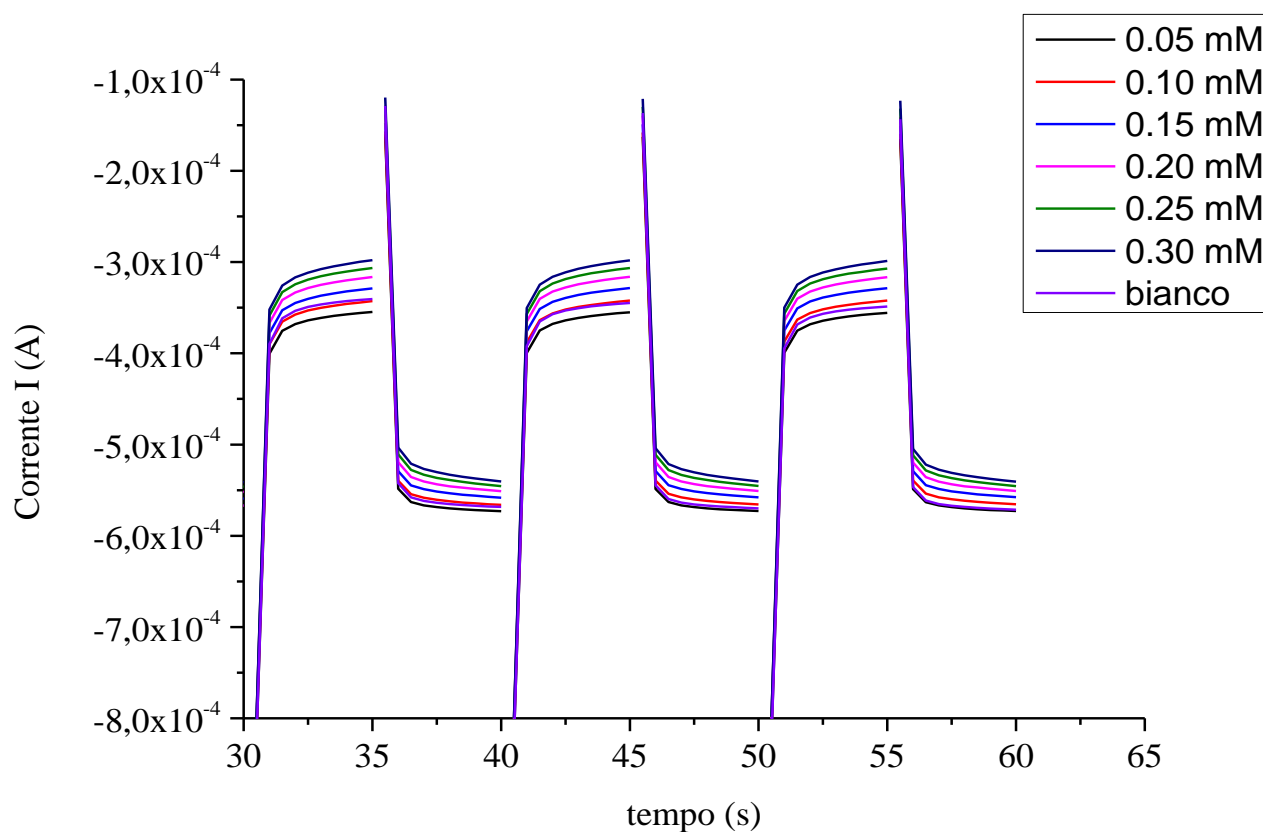


Figura 25 Risposte cronoamperometriche relative alla corrente del canale e alle concentrazioni crescenti di acido gallico in PBS 0.1M a pH 5.5, ottenute con il metodo della cronoamperometria a differenti potenziali senza agitazione, operando a $V_{g1} -0.5$ V $V_{g2} 0.7$ e $V_d -0.1$ V, con il transistor fatto interamente in PEDOT:PSS (aggiunte da $10 \mu\text{L}$, 5s a scansione, tempo 60 s).

Come si osserva dalle rette di calibrazione (Figura 26) questa metodologia non introduce significativi miglioramenti nella risposta all'acido gallico: l'andamento infatti non è perfettamente lineare e si osserva una marcata differenza tra la prima e la seconda prova.

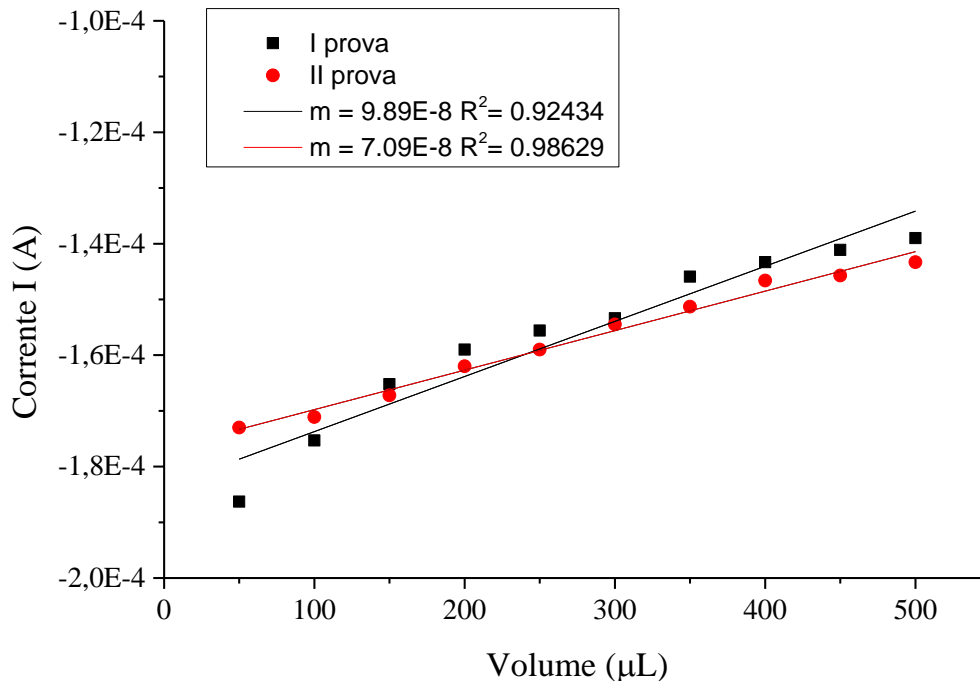


Figura 26 Rette di calibrazione riferite alle misure di curve $I_d - t$ pulsate registrate a $V_{g1} -0.5 V$ $V_{g2} 0.7$ e $V_d - 0.1V$, con il transistor fatto interamente in PEDOT:PSS (aggiunte da $10 \mu L$, $5s$ a scansione, tempo $60 s$), per aggiunte crescenti di acido gallico al PBS $0.1 M$ pH 5.5

4.3.2 Curva trans-caratteristica al bipotenziostato

La tecnica potenziodinamica della curva trans-caratteristica è stata utilizzata maggiormente durante il progetto di tesi e su maggior numero di campioni di vino. Consiste nel ricavare dal picco della derivata prima dell'andamento ciclico della curva relativa al canale del transistor ($V_g - I_d$) il valore di I_d che cambia a seconda della concentrazione dell'acido gallico (Figura 27, 28).

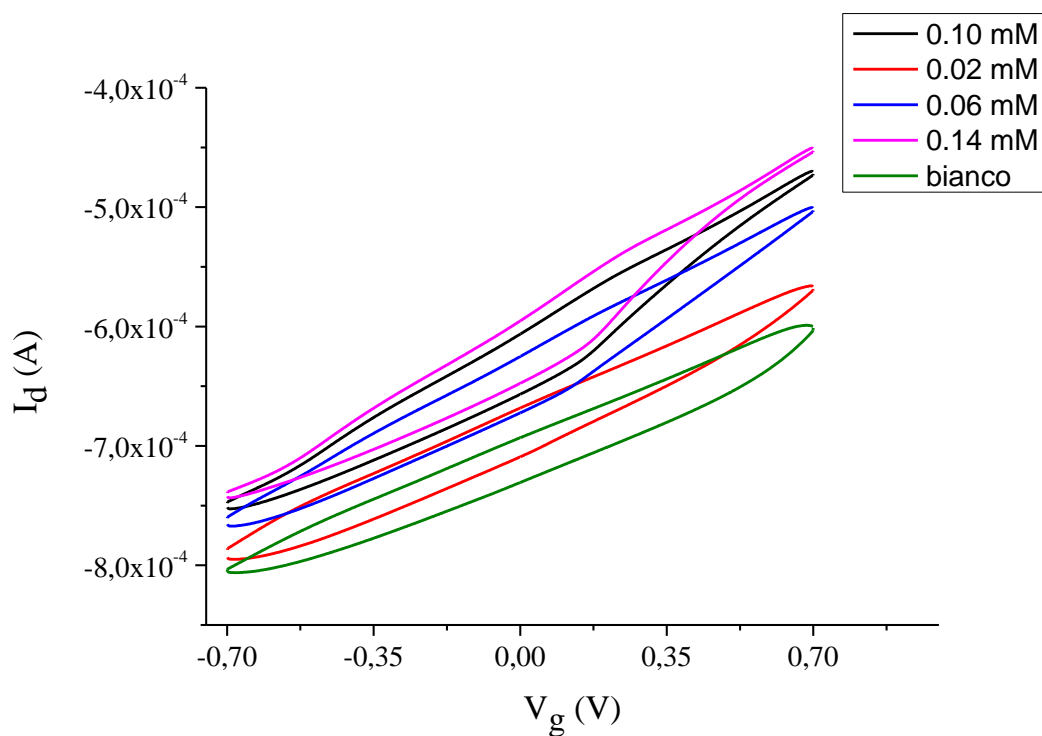


Figura 27 Risposte delle curve trans-caratteristiche relative alla corrente del canale (I_d) e alle concentrazioni crescenti di acido gallico in PBS 0.1M a pH 5.5, registrate a potenziali V_g da -0.7 V a +0.7 V e V_d -0.1 V.

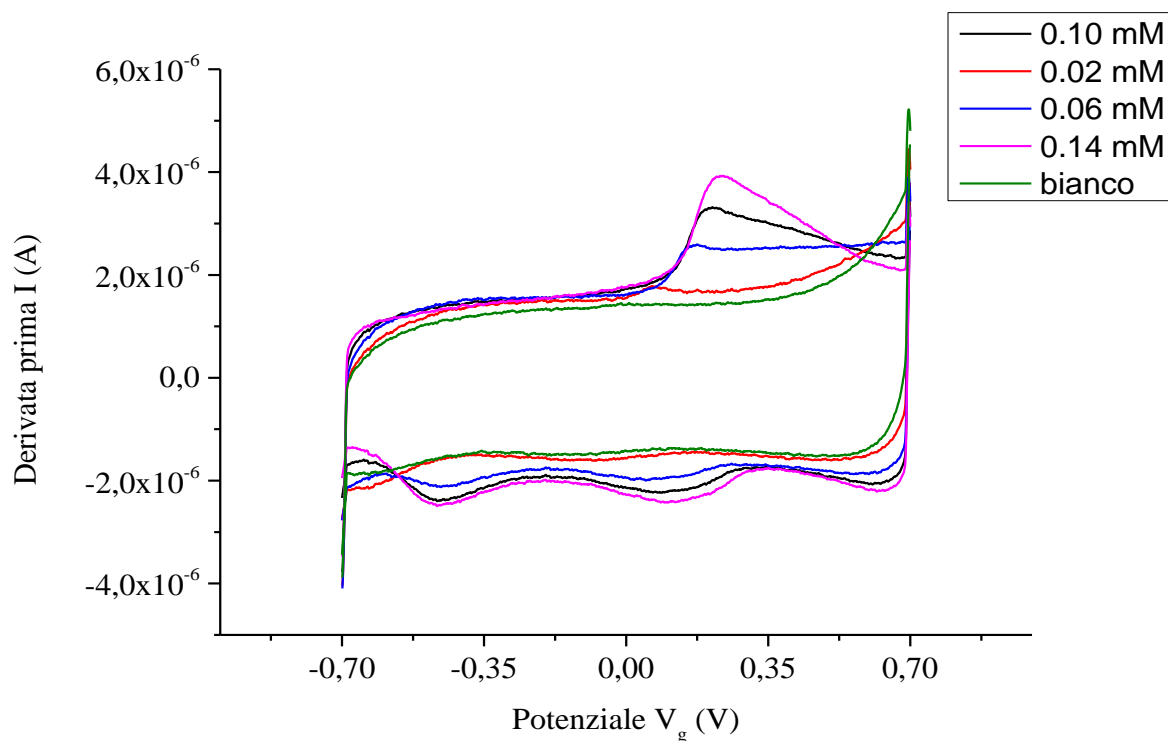


Figura 28 Risposte della derivata prima delle misure delle curve trans-caratteristiche relative alla corrente del canale (I_d) e alle concentrazioni crescenti di acido gallico in PBS 0.1M a pH 5.5, registrate a potenziali V_g da -0.7 V a +0.7V e V_d -0.1.

Come al solito, anche per questa tecnica viene analizzata la riproducibilità del valore della corrente a volumi crescenti di acido gallico nel tampone (PBS 0.1 M pH 5.5). Con 2 prove ripetute (figura 29) i punti delle due rette di calibrazione sono praticamente sovrapponibili. La Figura mostra in questo caso una buona correlazione lineare nell'intervallo 0.1-0.7 mM.

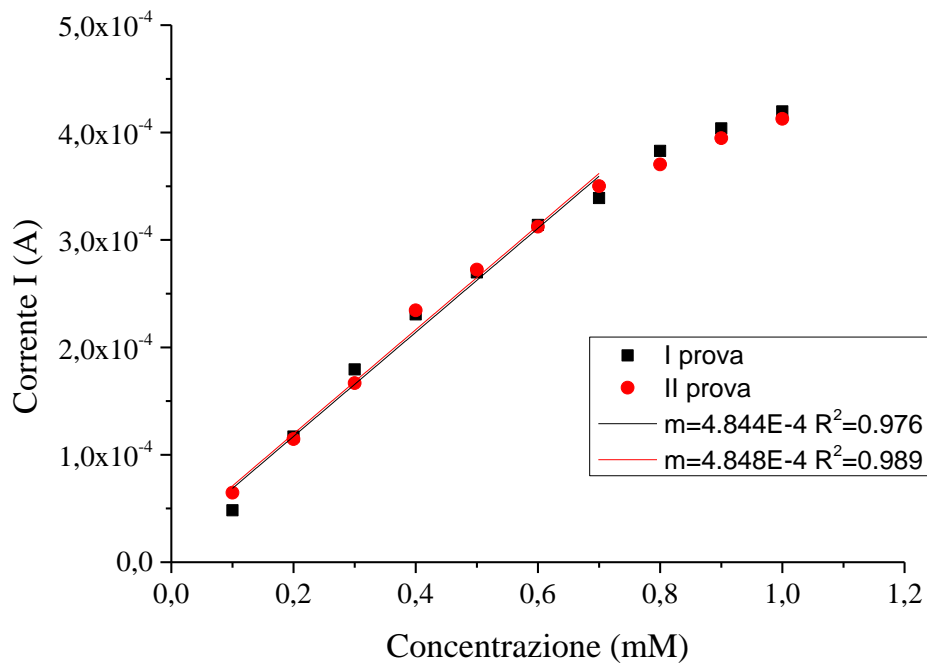


Figura 29 Rette di calibrazione riferite alle misure della derivata prima di della curva trans-caratteristica della corrente del canale, registrate a V_g da -0.5 V a $+0.5$ V e V_d -0.1 , per aggiunte crescenti di acido gallico ($20 \mu\text{L}$) al PBS 0.1 M per il transistor fatto interamente in PEDOT:PSS.

Usando una retta di calibrazione con l'acido gallico (range di concentrazione 0.02 – 0.14 mM) si è cercato di ricavare la concentrazione dei polifenoli nella cella contenente un certo volume (quindi, costante) di vino nel tampone, considerando la soluzione come *campione*. In seguito, vengono analizzati uno dopo l'altro più campioni con diversi vini servendosi di uno standard di acido gallico (0.06 mM) per controllare l'affidabilità delle concentrazioni esatte ricavate dalle misure.

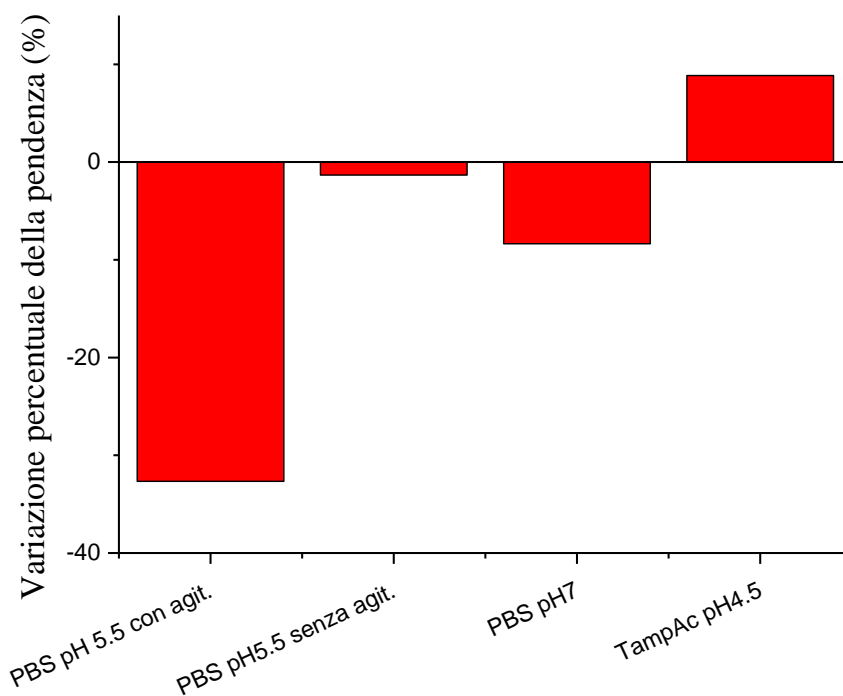
Le quantità utilizzate di vino e di acido gallico sono scelte in modo tale da ridurre al minimo l'avvelenamento del transistor, inoltre dopo ogni misura del campione e dello standard sono state eseguite curve trans-caratteristiche nell'elettrolita puro (PBS 0.1 M pH 5.5), cioè "il bianco", fino a quattro cicli (V_g da -0.7V a +0.7V, scan rate 0.01 V/s) per la "pulizia" del transistor.

Nella cella elettrochimica i vini sono diluiti nel tampone PBS 0.1M pH 5.5 a seconda della quantità di polifenoli presumibile dalla letteratura affinché il valore misurato faccia parte della retta di calibrazione con l'acido gallico (0.02 – 0.14 mM):

- i vini rossi: 1:41 (500 μ L nella cella con 20mL di PBS 0.1M)
- i vini rosati: 1:9 (2.5 mL nella cella con 20mL di PBS 0.1M)
- i vini bianchi: 1:5 (5mL nella cella con 20mL di PBS 0.1M)

4.4 Confronto della riproducibilità delle tecniche elettrochimiche

Un modo per rappresentare un confronto tra le sensibilità ottenute dalle rette di calibrazione riportate nella tesi e dimostrare la scelta delle condizioni di lavoro future per la maggiore riproducibilità del dato è l'utilizzo della variazione percentuale della pendenza della retta quando la prova di analisi viene ripetuta.



Cronoamperometria acido gallico

Figura 30 Istogramma che riporta la variazione percentuale delle sensibilità all'acido gallico dell'elettrodo in PEDOT:PSS alla seconda prova di analisi con la tecnica della cronoamperometria variando i parametri del metodo e dell'elettrolita.

Dalle figure 30 e 31 si può dedurre che il tampone migliore, come elettrolita, sia per l'acido gallico che per il vino è il tampone fosfato salino 0.1 M a pH 5.5, poiché fornisce una minore variazione percentuale nella sensibilità all'acido gallico rispetto agli altri tamponi. Inoltre, come citato anche sopra, l'agitazione durante la registrazione del segnale allo strumento comporta un maggiore avvelenamento del transistor e ciò si riflette in questa variazione, oltre che ad aumentare il rumore strumentale.

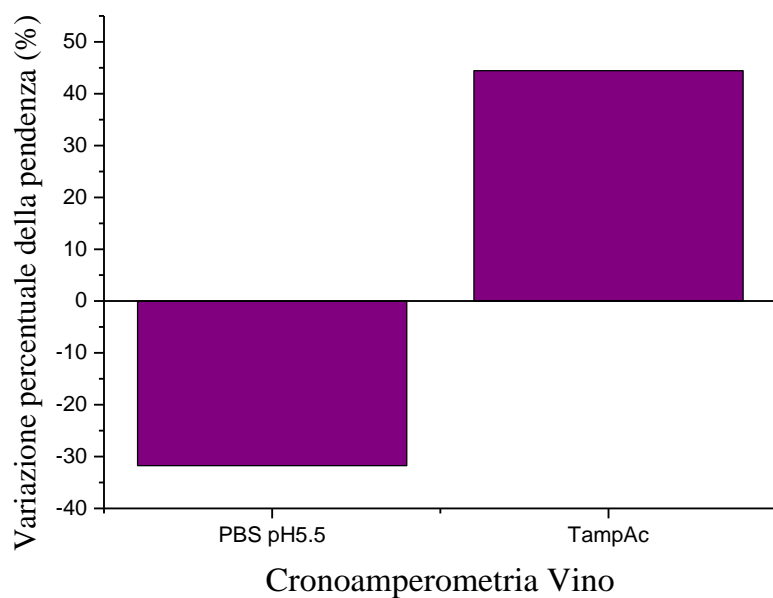


Figura 31 Variazione percentuale delle sensibilità al vino Barbera dell'elettrodo in PEDOT:PSS alla seconda prova di analisi con la tecnica della cronoamperometria variando il tampone usato come elettrolita.

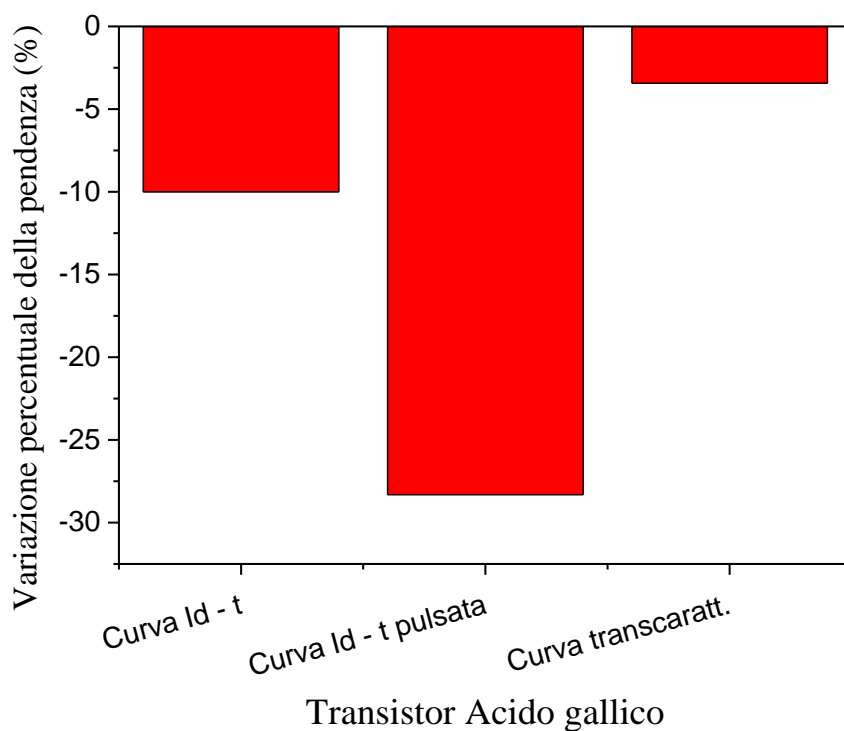


Figura 32 Variazione percentuale delle sensibilità all'acido gallico del transistor a base organica fatto in PEDOT:PSS alla seconda prova di analisi variando le tecniche di registrazione del segnale.

Un OECT fornisce una minore variazione della pendenza della retta di calibrazione ottenuta con le aggiunte di acido gallico e con le aggiunte di vino se si utilizza la tecnica della curva transcaratteristica (Figura 32, 33). Questi grafici rendono evidente che la tecnica migliore, tra quelle testate e che quindi viene scelta per l'analisi dei campioni di vino è appunto quella della curva transcaratteristica.

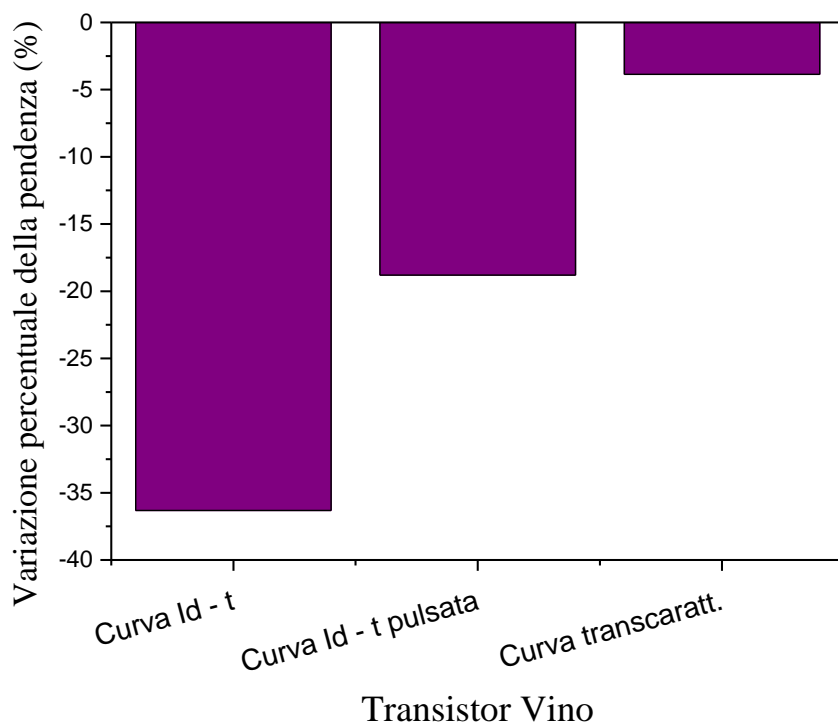
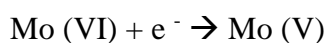


Figura 33 Variazione percentuale delle sensibilità al vino Barbera del transistor a base organica fatto in PEDOT:PSS alla seconda prova di analisi variando le tecniche di registrazione del segnale.

4.5 Tecnica di analisi spettrofotometrica

4.5.1 Metodo di Folin-Ciocalteu

Questo metodo prevede l'uso del reagente Folin-Ciocalteu (FCR). Il FCR è formato da due complessi acidi fosfomolibdeno/fosfotungsteno. La reazione fra il FCR e i fenoli avviene in condizioni basiche a pH ~10 (ottenuto con l'aggiunta di una soluzione di Na₂CO₃). In queste condizioni i fenoli sono dissociati (anione fenolato) e in grado di ridurre il FCR. Si pensa che nel complesso il molibdeno sia facilmente ridotto dal trasferimento di un elettrone dall'anione fenolato al molibdeno:



Il colore blu che si sviluppa è indipendente dalla struttura dei composti fenolici.

La retta di calibrazione con l'acido gallico è stata ottenuta lavorando alle seguenti concentrazioni: 1, 2, 4, 6, 8 e 10 mg/L, ottenute per diluizione di una soluzione madre 1000mg/L, dai valori di assorbanza delle varie concentrazioni si ricava la retta di calibrazione (Figura 34).

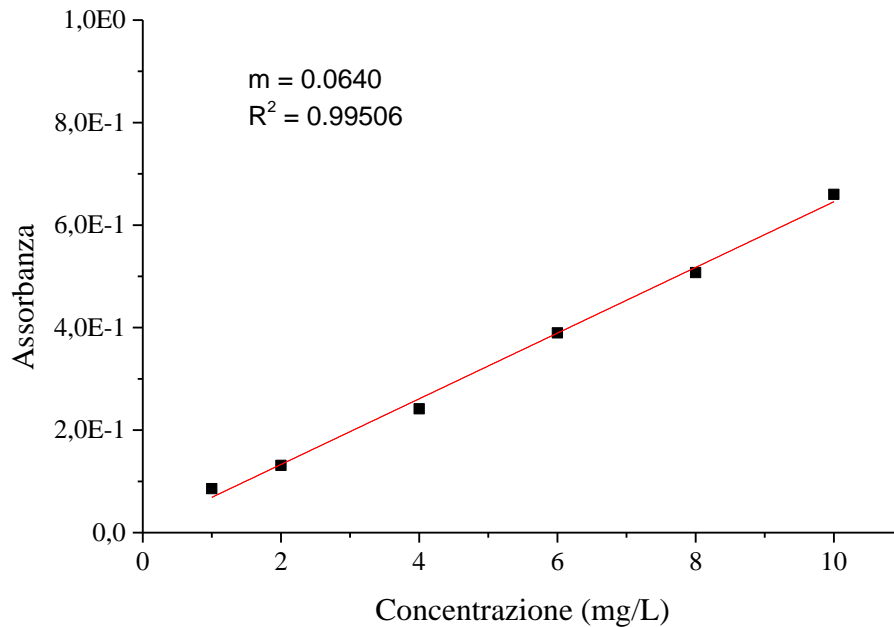


Figura 34 La retta di calibrazione con l'acido gallico ottenuta dai valori di assorbanza delle varie concentrazioni con il metodo Folin- Ciocalteu

Nella cella spettrofotometrica i vini sono diluiti a seconda della quantità di polifenoli presumibile dalla letteratura e dal metodo elettrochimico affinché il valore misurato faccia parte della retta di calibrazione:

- i vini rossi: 1:400, 1:500
- i vini rosati: 1:100
- i vini bianchi: 1:50

4.5.2 Indice di polifenoli totali I_{280}

Il principio del metodo si basa sul fatto che i polifenoli danno degli spettri caratteristici nell'ultravioletto: osservati allo spettrofotometro alle lunghezze d'onda comprese tra 200 e 300nm, forniscono uno spettro d'assorbimento inconfondibile, con due massimi caratteristici rispettivamente a 215 e 278 nm, con un minimo a 245 nm.

Solo il massimo a 278 nm è costante in ogni tipo di vino e per ciascuna classe di sostanze polifenoliche. Ad esso ci si riferisce nella determinazione dei polifenoli totali mediante spettrofotometria nell'ultravioletto.

L'assorbanza a 280 nm non è influenzata dal pH della soluzione.

Il vantaggio di questo metodo è il fatto di essere estremamente semplice e rapido. È adatto per il controllo di vini durante varie fasi di lavorazione (ad esempio fermentazione) e per confrontare vini simili (ad esempio, una singola varietà di uva da diversi vigneti, o vini da un particolare vigneto su diverse annate).

Nella cella spettrofotometrica i vini sono diluiti:

- i vini rossi: 1:100, 1:50
- i vini rosati: 1:10
- i vini bianchi: 1:10

Dopo la misura, il valore dell'assorbanza viene moltiplicato per il fattore di diluizione.

4.6 Estrazione del segnale per il confronto dei metodi spettrofotometrici con quello elettrochimico

La quantità di polifenoli in un campione di vino generico può essere ricavata con le tecniche fino ad ora trattate. Essendo essa calcolata come equivalenti di acido gallico è necessaria la retta di taratura ricavata dalle misure ottenute mediante queste tecniche con l'acido gallico. In seguito, si adopera un volume costante del campione di vino in modo tale che il valore della misura allo strumento rientri approssimativamente nella metà di questa retta.

Le tecniche usate per il confronto sono le Curve $I_d - t$ pulsate, le Curve trans-caratteristiche, il metodo di Folin-Ciocalteu, l'indice di polifenoli totali I_{280} . La concentrazione dei polifenoli considerata come equivalente a quella dell'acido gallico, per il confronto dei metodi elettrochimici e Folin-Ciocalteu, ha come unità di misura grammo su litro (g/L), per I_{280} si impiega un'unità di misura arbitraria, essendo calcolata come valore dell'assorbanza per fattore di diluizione.

In Figura 35 viene mostrata la correlazione tra i risultati del metodo Id-t e quello spettrofotometrico, nell'analisi di 8 diversi vini: si può osservare una scarsa correlazione ($R^2=0.11$) e pertanto questo metodo elettrochimico non risulta idoneo all'analisi dei vini.

Si è quindi utilizzato il metodo della curva trans-caratteristica (4 cicli per il bianco, 2 cicli per il campione e per lo standard). I problemi riscontrati con questo metodo sono:

- a) il picco dei polifenoli del primo ciclo nei vini non corrisponde esattamente (differenza nell'ordine di decimi) a quello del secondo ciclo sia in altezza ($1^\circ < 2^\circ$ in generale) che in valore del potenziale V_g ($1^\circ < 2^\circ$), in seguito ad analisi ripetute si è rivelato il primo ciclo più correlato del secondo.
- b) si nota un picco di minore intensità prima del picco di ossidazione dei polifenoli dovuta alla "sporcizia" depositata sul transistor dopo aver subito più prove. Questo "prepicco" potrebbe interferire con il segnale di interesse. Viene risolto (in parte) facendo più curve trans-caratteristiche nell'elettrolita puro, a svantaggio però, della rapidità della misura.

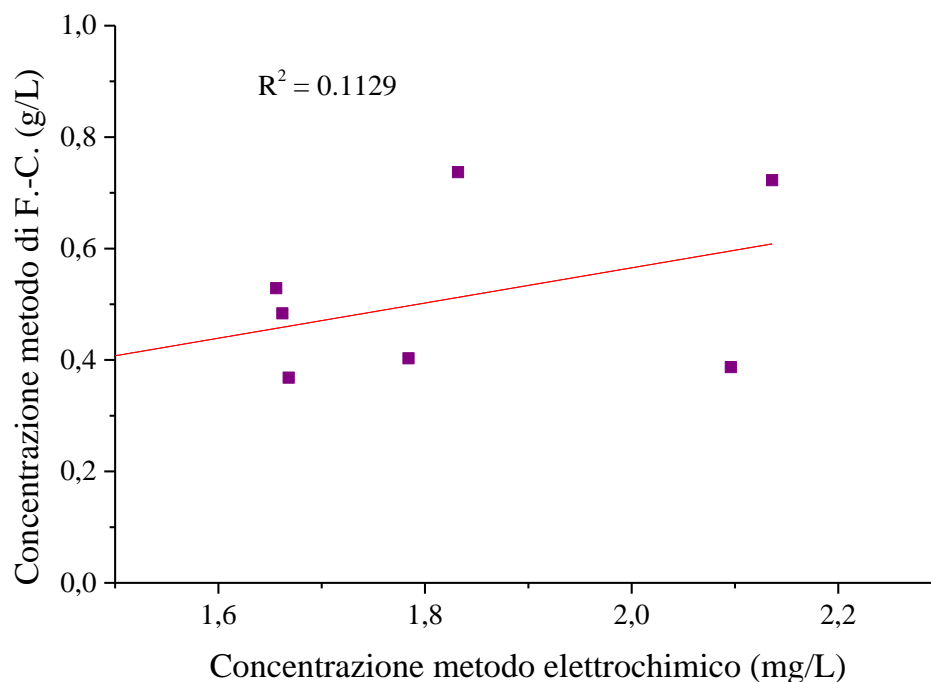


Figura 35 Correlazione curva I_a - tempo pulsata e metodo di Folin-Ciocalteu

Nelle Figure 36 e 37 è mostrata la correlazione rispettivamente tra i due metodi spettrofotometrici e tra quello elettrochimico e quello spettrofotometrico. In entrambe i vari vini analizzati vengono distinti in base al tipo evidenziando i vini bianchi con punti arancioni

e i rosati con punti magenta in basso a sinistra e i vini rossi con punti porpora in mezzo e in alto a destra. Osservando il coefficiente di correlazione di Pearson si può vedere come i metodi convenzionali (spettrofotometrici) tra di loro non mostrano una correlazione molto migliore di quella ottenuta confrontando il nuovo metodo elettrochimico utilizzato nel progetto di tesi con il metodo spettrofotometrico tuttora molto diffuso, ma lento e costoso.

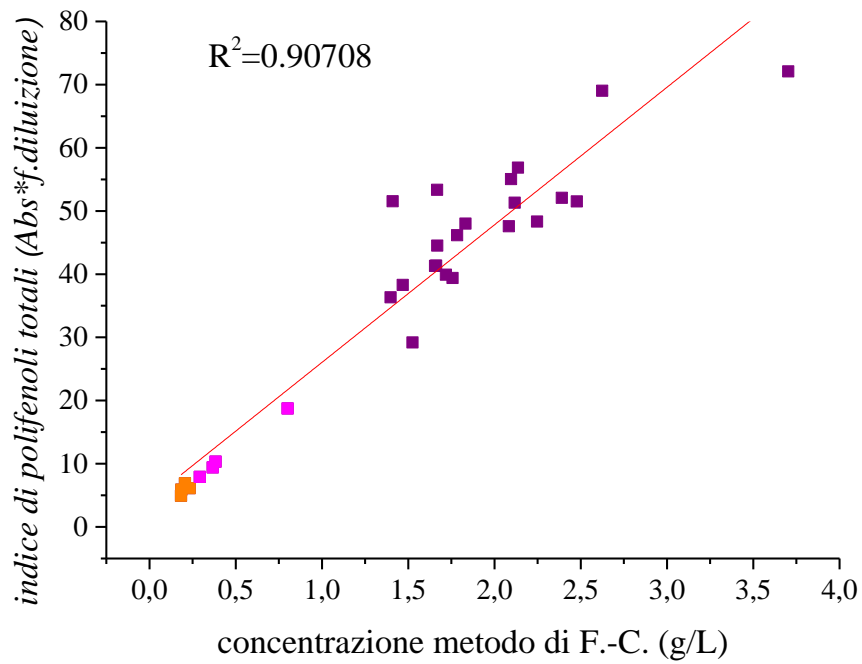


Figura 36 Correlazione metodo di Folin-Ciocalteu e Indice di polifenoli totali I_{280}

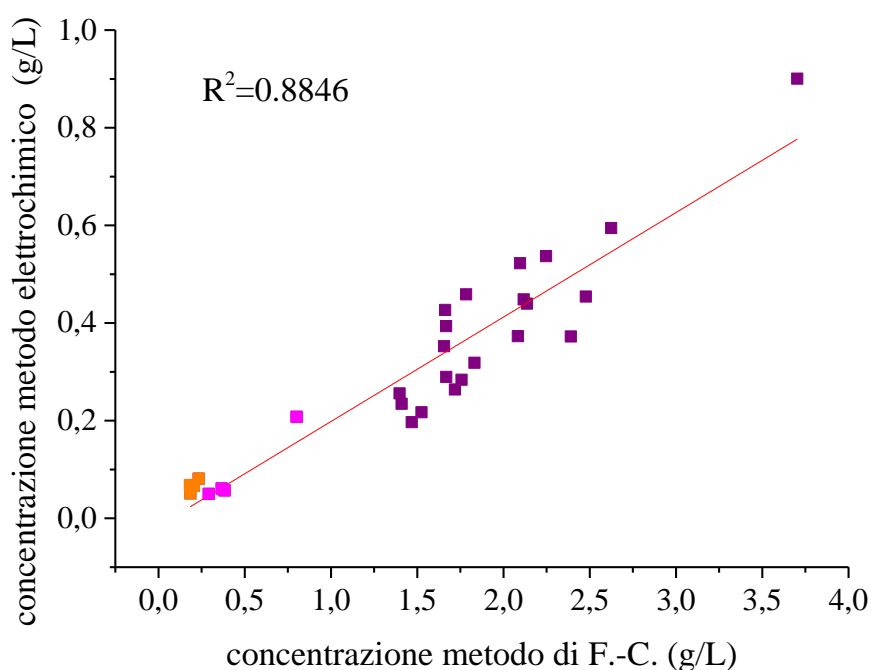


Figura 37 Correlazione metodo Folin-Ciocalteu e metodo della curva trans-caratteristica

Risulta evidente dalla figura 37 che il metodo elettrochimico fornisce, in ogni caso un valore di concentrazione inferiore rispetto a quello determinato con il metodo di Folin. È altresì importante però sottolineare che entrambi i metodi forniscono un indice del contenuto dei polifenoli e dunque costituiscono metodi relativi. Sarà importante, in futuro, approfondire questa differenza che potrebbe essere imputabile al problema della diffusività dei polifenoli all'interno del PEDOT:PSS, che rispetto all'acido gallico sono più ingombranti e meno disponibili sull'area chimicamente attiva del materiale polimerico. Ciononostante, la buona correlazione dimostra che i segnali registrati con entrambi i metodi si riferiscono agli stessi composti sia dal punto di vista qualitativo che dal punto di vista quantitativo.

5. CONCLUSIONI

In questo elaborato è stato sviluppato un metodo elettrochimico per la determinazione dei polifenoli nelle diverse tipologie di vino mediante l'utilizzo dei transistor elettrochimici a base organica, in cui la parte organica è formata dal polimero PEDOT:PSS, particolarmente sensibile a tali composti. Come analita di riferimento è stato utilizzato uno dei fenoli presenti nel vino, l'acido gallico, per cui anche la concentrazione dei polifenoli dei campioni analizzati è determinata come GAE, acido gallico equivalente. Si è cercato di ottimizzare le condizioni di migliore riproducibilità del segnale variando dei parametri come il tipo di tampone usato come elettrolita, il suo pH, la tecnica elettrochimica per lo svolgimento delle prove di analisi ed estrazione del segnale, inoltre metodi di pulizia, concentrazioni e volumi degli analiti per ridurre al minimo l'avvelenamento del transistor. Il transistor rispetto al sensore amperometrico standard ha il vantaggio dell'amplificazione del segnale rilevabile dalla reazione con l'analita di interesse, e in più, non necessita di un elettrodo di riferimento, il che può portare verso una miniaturizzazione del dispositivo di analisi. È stato scelto il metodo potenziodinamico per la maggiore stabilità del segnale nelle analisi di routine.

In seguito, il metodo elettrochimico viene confrontato con quelli convenzionali per la determinazione dei polifenoli, in particolare, quelli spettrofotometrici, come il metodo di Folin-Ciocalteu e l'indice di polifenoli totali I_{280} . Il numero consistente dei campioni di diversi tipi di vino ha permesso di stabilire se i metodi elettrochimici e spettrofotometrici sono correlabili tra loro e di quanto. Anche in questo caso il metodo potenziodinamico si è scoperto migliore di quello potenziostatico comparandolo con il metodo di Folin-Ciocalteu. In base ai dati ricavati per il confronto, si può dedurre che il metodo elettrochimico finale è al livello di quelli spettrofotometrici per quanto riguarda sia la riproducibilità sia la correlazione, infine può essere ancora ottimizzato per renderlo più rapido, semplice ed economico.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] <https://www.wineinmoderation.eu/it/content/Cultura-del-vino.28/>
- [2] Giancarlo Amandola, Virginio Terreni, *Analisi chimica strumentale e tecnica*, 1997
- [3] <https://www.wineinmoderation.eu/it/content/Storia-Tradizione-del-vino.4/>
- [4] P.Ribéreau-Gayon, Y.Glories, A.Maujean, D.Dubourdieu, *Handbook of Enology*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester (UK), 2006, pp. 141.
- [5] F.Shahidi, M.Naczk, *Phenolics in Food and Nutraceuticals: Sources Applications and Health Effects*, CRC, Press, FL, 2003.
- [6] R.G. Peres, G.A. Micke, M.F.M. Tavares, D.B. Rodriguez-Amaya, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3822.
- [7] O. Gurbuz, D. Gocmen, F. Dagdelen, M. Gursoy, S. Aydin, I. Sahin, L. Buyukuysal, M. Usta, *Food Chem.* 100 (2007) 518.
- [8] I. Kolouchova-Hanzlikova, K. Melzoch, V. Filip, J. Smidrkal, *Food Chem.* 87 (2004) 151.
- [9] M.A. Rodriguez-Delgado, G. Gonzalez, J.P. Perez-Trujillo, F.J. Garcia-Montelongo, *Food Chem.* 76 (2002) 371.
- [10] X. Vitrac, A. Bornet, R. Vanderlinde, J. Valls, T. Richard, J.-C. Delaunay, J.-M. Mérillon, P.-L. Teissédre, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5664.
- [11] M.S. Fernandez-Pachòn, D. Villano, A.M. Troncoso, M.C. Garcia- Parrilla, *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 101.
- [12] Shrikhande A.J., “Wine by-products with health benefits”, *Food Research International*, 2000, 33:469-474
- [13] M. Seruga, I. Novak, L. Jakobek, *Food Chem.* 124 (2011) 1208.
- [14] I.G. Casella, C. Colonna, M. Contursi, *Electroanalysis (NY)* 19 (2007) 1503.
- [15] N. Kovachev, A. Canals, A. Escarpa, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2925.
- [16] K. Chira, N. Pacella, M. Jourdes, P.-L. Teissédre, *Food Chem.* 126 (2011) 1971.
- [17] C. Apetrei, I.M. Apetrei, I. Nevaes, M. Del Alamo, V. Parra, M.L. Rodriguez-Mendez, J.A. De Saja, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 2588.
- [18] V. Cheynier, *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (suppl) (2005) 223S.
- [19] M. Monagas, B. Bartolomé, C. Gomez-Cordovés, *Crit. Rev. Food Sci Nut.* 45 (2005) 85.
- [20] R.S. Jackson, *Wine Science. Principles and Applications*, 3rd Edition, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2008, Chapter 6.

- [21] A.M. Granero, H. Fernandez, E. Agostini, M.A. Zon, *Talanta* 83 (2010) 249.
- [22] O. Brenna, S. Buratti, M.S. Cosio, S. Mannino, *Electroanalysis* (NY) 10 (1998) 1204.
- [23] K. Robards, M. Antolovich, *Analyst* 122 (1997) 12R
- [24] Blasco AJ, Gonzalez Crevillen A, Gonzalez MC, Escarpa A. Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems. *Electroanalysis*. 2007;19: 2275–86.
- [25] Turke A, Fischer W-J, Beaumont N, Kilmartin PA. Electrochemistry of sulfur dioxide, polyphenols and ascorbic acid at poly(3,4-ethylenedioxythiophene) modified electrodes. *Electrochim Acta*. 2012;60:184–92.
- [26] Makhotikina O, Kilmartin PA. The use of cyclic voltammetry for wine analysis: determination of polyphenols and free sulfur dioxide. *Anal Chim Acta*. 2010;668:155–65.
- [27] Kilmartin PA, Zou H, Waterhouse AL. Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response. *Am J Enol Vitic*. 2002;53:294–302.
- [28] daSilva LF, Stradiotto NR, Oliveira HP. Determination of caffeic acid in red wine by voltammetric method. *Electroanalysis*. 2008;20:1252–8.
- [29] Jakubec P, Bancirova M, Halouzka V, Lojek A, Ciz M, Denev P, et al. Electrochemical sensing of total antioxidant capacity and polyphenol content in wine samples using amperometry online coupled with microdialysis. *J Agric Food Chem*. 2012;60:7836–43.
- [30] Šeruga M, Novak I, Jakobek L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem*. 2011;124(3):1208–16.
- [31] Ziyatdinova G, Kozlova E, Budnikov H. Electropolymerized eugenol-MWNT-based electrode for voltammetric evaluation of wine antioxidant capacity. *Electroanalysis*. 2015;27:1660–8.
- [32] Curulli A, Di Carlo G, Ingo GM, Ricucci C, Zane D, Bianchini C. Chitosan stabilized gold nanoparticle-modified Au electrodes for the determination of polyphenol index in wines: a preliminary study. *Electroanalysis*. 2012;24:897–904.
- [33] Di Carlo G, Curulli A, Toro RG, Bianchini C, De Caro T, Padeletti G, et al. Green synthesis of gold-chitosan nanocomposites for caffeic acid sensing. *Langmuir*. 2012;28:5471–9.
- [34] Zikos N, Karaliota A, Liouni M. Chronoamperometry as a tool for the evaluation of antioxidant properties of red wines. *J Anal Chem*. 2011;66:859–64.

- [35] Ziyatdinova G, Kozlova E, Budnikov H. Chronocoulometry of wine on multi-walled carbon nanotube modified electrode: antioxidant capacity assay. *Food Chem.* 2016;196:405-10.
- [36] A.J. Blasco, A. Gonzalez Crevillen, M.C. Gonzalez, A. Escarpa, *Electroanalysis (NY)* 19 (2007) 2275.
- [37] Alberto Sanchez Arribas, Marta Martinez-Fernandez, Manuel Chicharro The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 34 (2012); 78-96
- [38] M. Liu, J. Wang, D. Li, M. Wang, Electronic tongue coupled with physicochemical analysis for the recognition of orange beverages, *J. Food Qual.* 35 (6) (2012) 429–441.
- [39] F. Hossein-Babaei, K. Nemati, A concept of microfluidic electronic tongue, microfluid, *Nanofluidics* 13 (2) (2012) 331–344.
- [40] X. Cetó, C. Apetrei, M. Del Valle, M.L. Rodríguez-Méndez, Evaluation of red wines antioxidant capacity by means of a voltammetric e-tongue with an optimized sensor array, *Electrochim. Acta* 120 (2014) 180–186.
- [41] M. Scampicchio, D. Ballabio, A. Arecchi, S.M. Cosio, S. Mannino, Amperometric electronic tongue for food analysis, *Microchim. Acta* 163 (2008) 11–21.
- [42] F. Winqvist, Voltammetric electronic tongues – basic principles and applications, *Microchim. Acta* 163 (1–2) (2008) 3–10.
- [43] V. Martina, K. Ionescu, L. Pigani, F. Terzi, A. Ulrici, C. Zanardi, R. Seeber, Development of an electronic tongue based on a PEDOT-modified voltammetric sensor, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2101–2110.
- [44] L. Pigani, G. Foca, K. Ionescu, V. Martina, A. Ulrici, F. Terzi, M. Vignali, C. Zanardi, R. Seeber, Amperometric sensors based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified electrodes. Discrimination of white wines, *Anal. Chim. Acta* 614 (2008) 213–222.
- [45] L. Pigani, G. Foca, A. Ulrici, K. Ionescu, V. Martina, F. Terzi, M. Vignali, C. Zanardi, R. Seeber, Classification of red wines by chemometric analysis of voltammetric signals from pedot-modified electrodes, *Anal. Chim. Acta* 643 (2009) 67–73.
- [46] L. Pigani, A. Culetu, A. Ulrici, G. Foca, M. Vignali, R. Seeber, Pedot modified electrodes in amperometric sensing for analysis of red wine samples, *Food Chem.* 129 (2011) 226–233.
- [47] <https://www.hannainstruments.co.uk/phenols-test-kit.html>

- [48] <http://www.winequalitysolutions.com/fr/nomasense-polyscan-p200>
- [49] W. R. Salaneck et al. Electronic structure of conjugated polymers: consequence of electron-lattice coupling. *Physics Reports* 319 (1999) 231-251.
- [50] Y. Wang. Research progress on a novel conductive polymer - poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT). *J. Phys.: Conf. Ser.*, 152:012023, 2009.
- [51] Groenendaal, L.; Jonas, F.; Freitag, D.; Pielartzik, H.; Reynolds, J. R. (2000). "Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and Its Derivatives: Past, Present, and Future". *Advanced Materials* 12 (7): 48.
- [52] I. Gualandi, M. Marzocchi, E. Scavetta, M. Calienni, A. Bonfiglio, B. Fraboni, A simple all-PEDOT:PSS electrochemical transistor for ascorbic acid sensing, *J. Mater. Chem. B.* 3 (2015) 6753–6762.
- [53] F.C. Krebs. Fabrication and processing of polymer solar cells: A review of printing and coating techniques. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 2009, 93:394–412.
- [54] Li, G. & Pickup, P. G. Ion transport in poly(3,4-ethylenedioxythiophene)–poly(styrene-4-sulfonate) composites. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 1255–1260 (2000).
- [55] Bobacka, J., Lewenstam, A. & Ivaska, A. Equilibrium potential of potentiometric ion sensors under steady-state current by using current-reversal chronopotentiometry. *J. Electroanal. Chem.* 509, 27–30 (2001).
- [56] Cui, X. & Martin, D. C. Electrochemical Deposition and Characterization of Poly (3,4-Ethylenedioxythiophene) on Neural Microelectrode Arrays. *Sens. Actuat B-Chem.* 89, 92–102 (2003).
- [57] Lisowska-Oleksiak, A. & Kupniewska, A. Transport of alkali metal cations in poly (3,4-ethylenethiophene) films. *Solid State Ionics.* 157, 241–248 (2003).
- [58] Han, D., Yang, G., Song, J. Niu, L. & Ivaska, A. Morphology of electrodeposited poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/poly(4-styrene sulfonate) films. *J. Electroanal. Chem.* 602, 24–28 (2007).
- [59] Basiricò, L., Cosseddu, P., Fraboni, B. & Bonfiglio, A. Inkjet printing of transparent, flexible, organic transistors. *Thin Solid Films* 520, 1291–1294 (2011).
- [60] Basiricò, L. et al. Electrical characteristics of ink-jet printed, all-polymer electrochemical transistors. *Organic Electronics.* 13, 244–248 (2012).

- [61] Demelas, M. & Scavetta, E., Basiricò, L., Rogani, R. & Bonfiglio, A. A deeper insight into the operation regime of all-polymeric electrochemical transistors. *Appl. Phys. Lett.* 102, 193301 (2013).
- [62] D.A. Bernards, G.G. Malliaras. Steady-state and transient behavior of organic electrochemical transistors. *Adv. Funct. Mater.*, 17:3538-3544, 2007.
- [63] M. Ramuz, A. Hama, M. Huerta, J. Rivnay, P. Leluex and R. M. Owens, *Adv. Mater.*, 2014, 26, 7083–7090.
- [64] A. Romeo, G. Tarabella, P. D'Angelo, C. Cafarra, D. Cretella, R. Alfieri, P. G. Petronini and S. Iannotta, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 68, 791–792.
- [65] D. T. Simon, S. Kurup, K. C. Larsson, R. Hori, K. Tybrandt, M. Gojny, E. W. H. Jager, M. Berggren, B. Canlon and A. Richter-Dahlfors, *Nat. Mater.*, 2009, 8, 742–746.
- [66] M. H. Bolin, K. Svennersten, D. Nilsson, A. Sawatdee, E. W. H. Jager, A. Richter-Dahlfors and M. Berggren, *Adv. Mater.*, 2009, 21, 4379–4382.
- [67] J. Isaksson, P. Kjall, D. Nilsson, N. D. Robinson, M. Berggren and A. Richter-Dahlfors, *Nat. Mater.*, 2007, 6, 673–679.
- [68] F. Lin and M. C. Lonergan, *Appl. Phys. Lett.*, 2006, 88, 133507.
- [69] D. A. Bernards, D. J. Macaya, M. Nikolou, J. A. DeFranco, S. Takamatsu, G. G. Malliaras, *J. Mater. Chem.* 2008, 18, 116.
- [70] M. Hamed, R. Forchheimer, O. Inganäs, Towards woven logic from organic electronic fibres, *Nat. Mater.* 6 (2007) 357–362.
- [71] I. Gualandi, M. Marzocchi, A. Achilli, D. Cavedale, A. Bonfiglio, B. Fraboni, Textile Organic Electrochemical Transistors as a Platform for Wearable Biosensors, *Sci. Rep.* 6 (2016) 33637–33637.
- [72] G. Mattana, P. Cosseddu, B. Fraboni, G.G. Malliaras, J.P. Hinstroza, A. Bonfiglio, Organic electronics on natural cotton fibres, *Org. Electron.* 12 (2011) 2033–2039.
- [73] E. Bihar, Y. Deng, T. Miyake, M. Saadaoui, G.G. Malliaras, A Disposable paper breathalyzer with an alcohol sensing organic electrochemical transistor, *Sci. Rep.* 6 (2016) 27582.
- [74] L. Basiric, P. Cosseddu, A. Scidà, B. Fraboni, G.G. Malliaras, A. Bonfiglio, Electrical characteristics of ink-jet printed, all-polymer electrochemical transistors, *Org. Electron. Physics, Mater. Appl.* 13 (2012) 244–248.

- [75] M. Demelas, E. Scavetta, L. Basiricò, R. Rogani, A. Bonfiglio, A deeper insight into the operation regime of all-polymeric electrochemical transistors, *Appl. Phys. Lett.* 102 (2013) 193301.
- [76] R. B. Dabke, G. D. Singh, A. Dhanabalan, R. Lal and A. Q. Contractor, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 724.
- [77] P. Lin, F. Yan and H. L. W. Chan, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2010, 2, 1637–1641.
- [78] H. Tang, P. Lin, H. L. W. Chan and F. Yan, *Biosens. Bioelectron.*, 2001, 26, 4559–4563.
- [79] S. Casalini, F. Leonardi, T. Cramer and F. Biscarini, *Org. Electron.*, 2013, 14, 156–163.
- [80] N. Coppede, G. Tarabella, M. Villani, D. Calestani, S. Iannotta and A. Zappettini, *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2, 5620–5626.
- [81] J. Liao, S. Lin, Y. Yang, K. Liu and W. Du, *Sens. Actuators, B*, 2015, 208, 457–463.
- [82] D. T. Hoa, T. N. S. Kumar, N. S. Punekar, R. S. Srinivasa, R. Lal and A. Q. Contractor, *Anal. Chem.*, 1992, 64, 2645–2646.
- [83] P. N. Bartlett and P. R. Birkin, *Anal. Chem.*, 1993, 65, 1118–1119.
- [84] D. A. Bernardis, D. J. Macaya, M. Nikolou, J. A. DeFranco, S. Takamatsu and G. G. Malliaras, *J. Mater. Chem.*, 2008, 18, 116–120.
- [85] G. Tarabella, C. Santato, S. Y. Yang, S. Iannotta, G. G. Malliaras and F. Cicoira, *Appl. Phys. Lett.*, 2010, 97, 123304.
- [86] P. Lin and F. Yan, *Adv. Mater.*, 2012, 24, 34–51.
- [87] L. Basirico, P. Cosseddu, B. Fraboni and A. Bonfiglio, *Thin Solid Films*, 2011, 520, 1291–1294.
- [88] M. Demelas, E. Scavetta, L. Basirico, R. Rogani and A. Bonfiglio, *Appl. Phys. Lett.*, 2013, 102, 193301.
- [89] P. A. Ersman, D. Nilsson, J. Kawahara, G. Gustafsson and M. Berggren, *Org. Electron.*, 2013, 14, 1276–1280.
- [90] S. K. Kanakamedala, H. T. Alshakhouri, M. Agarwal and M. A. DeCoster, *Sens. Actuators, B*, 2011, 157, 92–97.
- [91] N. Y. Shim, D. A. Bernardis, D. J. Macaya, J. A. DeFranco, M. Nikolou, R. M. Owens and G. George Malliaras, *Sensors*, 2009, 9, 9896–9902.
- [92] Singleton V.L., Rossi J., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, 16, 144-158.

[93] Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.*, 1999, 299, 152-178.

[94] A. Malinauskas, R. Garjonyte, R.Mazeikiene and I. Jureviciute, *Talanta*, 2004, 64, 121–129.