UNIVERSITÀ
DI PAVIA
Dipartimento di Chimica
Direttore Ch.ma Prof. Mauro Freccero
Corso di Laurea Magistrale in Chimica

Sensore screen-printed modificato con polimero a stampo molecolare (e-MIP) per la determinazione elettrochimica dell'acido ascorbico in bevande come i succhi

Relatore:
Prof.ssa Giancarla Alberti

Tesi di Laurea magistrale di
Eleonora Maria Medici

Anno Accademico 2025/2026

Indice

ABSTRACT 2

INTRODUZIONE 9

PARTE TEORICA 12

2.1 L'acido ascorbico nelle bevande 12

2.2 Elettrodi screen-printed 14

2.3 Polimeri a stampo molecolare e-MIP ed e-NIP 16

2.4 Tecniche elettrochimiche 20

2.4.1 Voltammetria ciclica 20

2.4.2 Voltammetria differenziale pulsata 22

2.4.3 Spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) 23

2.5 Caratterizzazione elettrochimica della superficie elettrodica 27

2.6 Rette di calibrazione 28

PARTE SPERIMENTALE 31

3.1 Reattivi e apparecchiature 31

3.2 Procedura per la preparazione dell'elettrodo modificato e-MIP 32

3.3 Procedura per la caratterizzazione della superficie dell'elettrodo 33

3.4. Procedura per la determinazione dell'acido ascorbico con tecnica DPV 34

3.5 Procedura della titolazione iodometrica 35

RISULTATI 36

4.1 Preparazione del sensore modificato con e-MIP 36

4.2 Caratterizzazione della superficie dell'elettrodo 37

4.3 Analisi quantitativa dell'acido ascorbico 41

4.3.*1 L'elettrodo bare* 41

4.3.*2 Elettrodi modificati: e-MIP ed e-NIP* 43

4.3.3 Selettività del metodo 45

4.3.*4 Analisi in matrici fortificate* 49

4.3.*5 Affidabilità del metodo: titolazioni iodometriche* 50

CONCLUSIONI 52

BIBLIOGRAFIA 54

ABSTRACT

Ascorbic acid (AA), commonly known as vitamin C, is a water-soluble vitamin with important antioxidant and reducing properties. It is widely present in fruit juices and beverages, where its concentration represents an important parameter for assessing nutritional quality and product stability. AA can undergo degradation as a consequence of exposure to oxygen, temperature and metal ions. Conventional analytical methods for its determination include titrimetric, spectrophotometric and chromatographic techniques, which may require time-consuming procedures and laboratory instrumentation. Electrochemical methods represent a promising alternative because of their simplicity, rapidity, sensitivity and potential for miniaturization.

The aim of this work was to develop a screen-printed electrochemical sensor modified with an electropolymerized molecularly imprinted polymer (e-MIP) for the determination of AA in fruit juice samples. The molecularly imprinted polymer was obtained by electropolymerization of pyrrole in the presence of AA as the template molecule. After polymerization, the template was removed from the polymeric film, generating recognition sites complementary to AA. The e-MIP-modified electrodes were compared with bare screen-printed electrodes and electrodes modified with a non-imprinted polymer (e-NIP), in order to evaluate the effect of molecular imprinting on the electrochemical response.

The electrochemical characterization of the electrodes was performed by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The electroactive surface area was evaluated from cyclic voltammetric measurements at different scan rates, while EIS measurements were carried out using a ferri/ferrocyanide redox probe.

	Area [mm^2]	Capacitance [µF]
Bare	3.8(2)	0.50(3)
e-MIP	2.4(2)	2.15(5)
e-NIP	1.3(1)	1.52(6)

Table I: Result for the electrochemical characterization of the electrode surface for the bare electrode, e-MIP and e-NIP.

The charge-transfer resistance (R_{ct}) obtained from the Nyquist plots was 5.4 kΩ for the bare electrode, whereas the e-MIP electrode showed an R_{ct} of approximately 50 kΩ before template removal and 20 kΩ after template removal. Following rebinding with 3 mM AA, R_{ct} increased to approximately 22 kΩ, confirming the influence of the recognition process on the charge-transfer properties of the modified interface.

The e-NIP electrode showed an R_{ct} of approximately 45 kΩ.

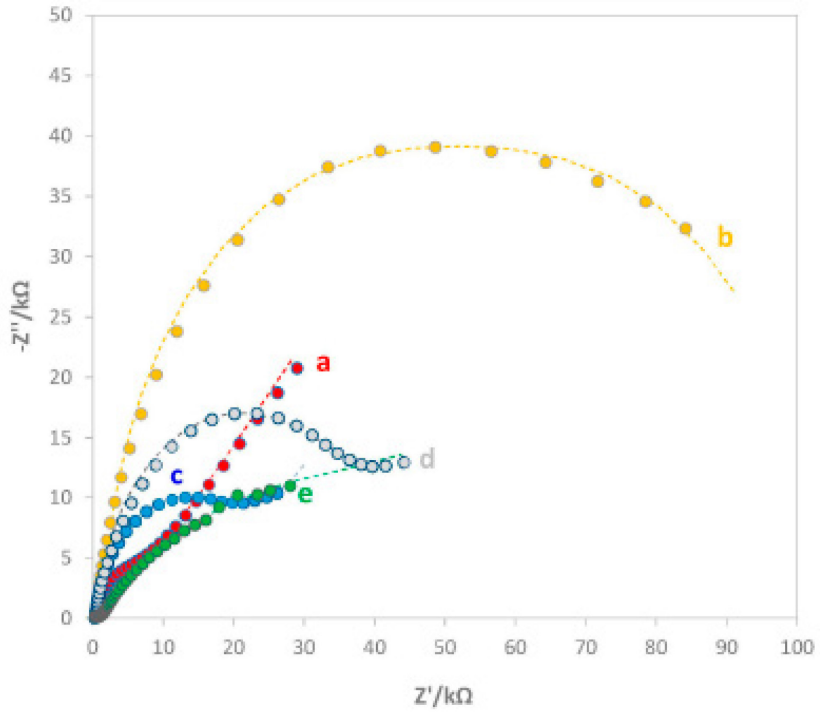


Figure I: Nyquist plot of: (a) unmodified (bare) electrode, (b) e-MIP-modified electrode, (c) e-MIP-modified electrode after template removal, (d) e-MIP-modified electrode after rebinding with 3 mM AA, (e) e-NIP-modified electrode.

Measurements were performed in a 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ / 0.1 M KCl solution. The frequency range used was 100 kHz to 10 mHz, with a sinusoidal potential modulation of 0.05 V superimposed on a direct current (DC) potential of 0.2 V.

AA determination was performed by differential pulse voltammetry (DPV) in PBS 0.05M/KCl 0.1M at pH 7.

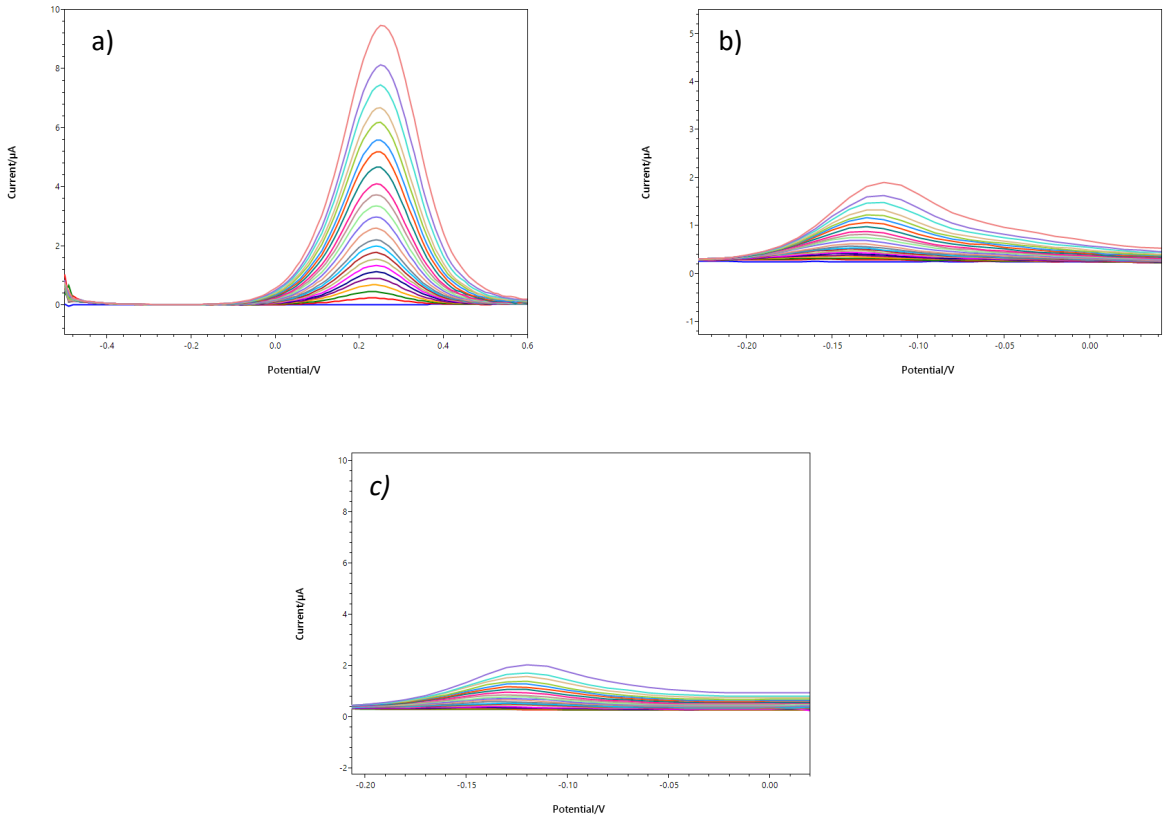


Figure II: DPV voltammograms registered in PBS 0.05 M/KCl 0.1 M solution at pH 7 containing AA at different concentrations ranging from 0 µM *to 5000* µM*. (a) bare electrode; (b) e-MIP-modified electrode; (c) e-NIP-modified electrode.*

	Bare	e-MIP	e-NIP
Sensivity [µA · µM^{-1}]	2.26(1) ·10^{-3}	5.28(4) ·10^{-4}	2.77(5) ·10^{-4}
R^2	0.9997	0.9986	0.9950
Linear range [µM]	100 - 1582	100 - 2546	797 - 5238
LOD [µM]	22	100	340
LOQ [µM]	65	302	1030

Table II: Analytical figures of merit of the AA quantification method using the bare, e-MIP and e-NIP modified electrodes.

The analytical performance of the e-MIP sensor was evaluated through calibration curves, obtaining a linear range from 100 to 2546 µM, with $R^2 = 0.9986$. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 100 µM and 302 µM, respectively. These results indicate that the e-MIP modification does not provide an

increase in sensitivity compared with the bare electrode; therefore, its main analytical advantage is related to the improvement of selectivity rather than sensitivity.

Although the e-MIP electrode did not provide higher sensitivity than the bare electrode, the molecular imprinting strategy improved the selectivity of the electrochemical response towards AA, particularly in the presence of potentially interfering electroactive compounds.

The selectivity of the proposed sensor was investigated in the presence of several compounds commonly found in fruit juices, including glucose, fructose, citric acid, tartaric acid and gallic acid. Glucose, fructose and citric acid did not show significant electrochemical responses in the potential range investigated, whereas tartaric acid and gallic acid exhibited electrochemical signals that could interfere with the determination of AA due to the proximity or overlap of their oxidation peaks. In particular, the use of the e-MIP modified electrode resulted in a shift of the AA oxidation signal from approximately +0.2 V at the bare electrode to about −0.1 V, allowing better discrimination between AA and the electroactive interfering species. These experiments highlighted the main advantage of the molecularly imprinted modification, namely the improvement of the selectivity of the electrochemical response rather than an increase in sensitivity.

The analytical method was evaluated using simulated juice matrices prepared to reproduce the composition of fruit juices and to investigate the performance of the sensor in the presence of potentially interfering components under controlled conditions. Recovery tests were performed in triplicate using three different e-MIP modified electrodes for each matrix. Recovery values ranged from 84% to 105% across the simulated orange, apple, lemon and grape juice samples, showing good agreement between the added and electrochemically determined AA concentrations and satisfactory reproducibility among the different electrodes.

Orange			***Apple***		
AA [mM] add	**AA [mM] e-MIP**	**%**	**AA [mM] add**	**AA [mM] e-MIP**	**%**
8.2	7.9	96	16.1	15.3	95
8.2	7.9	96	16.1	14.8	92
8.2	7.6	93	16.1	15	93

Lemon			*Grape*		
AA [mM] add	**AA [mM] e-MIP**	**%**	**AA [mM] add**	**AA [mM] e-MIP**	**%**
7.3	7.6	105	8.4	7	84
7.3	6.8	94	8.4	8.8	105
7.3	6.5	89	8.4	8.4	100

Table III: Recovery test results obtained from three replicate measurements for each simulated juice sample using three different e-MIP-modified electrodes.

The method was then applied to spiked fruit juice matrices by adding known amounts of AA to diluted orange, apple and lemon juices. This approach was adopted to assess the accuracy and recovery of the method in more complex matrices containing the naturally occurring components of fruit juices. Recovery values ranged from 81% to 114%, indicating satisfactory agreement between the added and measured AA concentrations and demonstrating the applicability of the e-MIP sensor to complex juice matrices.

Orange			*Apple*		
AA [mM] add	**AA [mM] e-MIP**	**%**	**AA [mM] add**	**AA [mM] e-MIP**	**%**
18	20	111	4.7	4	86
18	16	91	4.7	5.3	114
18	15	84	4.7	3.9	84

Lemon		
AA [mM] add	**AA [mM] e-MIP**	**%**
20.2	19	94
20.2	16.6	82
20.2	20	99

Table IV: Recovery test performed in triplicate for each juice sample using three different e-MIP-modified electrodes.

To further assess the reliability and analytical performance of the developed e-MIP sensor, the concentration of ascorbic acid was also determined by iodometric titration and compared with the value obtained using the e-MIP modified electrode. The

comparison was performed on a solution prepared by accurately weighing 206 mg of ascorbic acid and dissolving it in 250 mL volume of water.

The mean concentrations obtained by iodometric titration and by the e-MIP electrode were 4355 and 4303 µM, respectively.

Conc. [mM] titration	Conc. [mM] MIP
3.8	4.4
4.6	4.3
4.7	4.2

Table V: Comparison of the ascorbic acid concentrations obtained by iodometric titration and by the e-MIP electrode, performed on a solution prepared by weighing 206 mg of ascorbic acid and dissolving it in 250 mL of water.

Statistical evaluation of the results was carried out using an F-test to assess the homogeneity of the variances, followed by a two-tailed Student's t-test assuming equal variances for the comparison of the mean values. The F-test did not reveal a statistically significant difference between the variances at the 95% confidence level. Consistently, the t-test showed no statistically significant difference between the mean concentrations obtained by the two analytical methods.

These results indicate a good agreement between the electrochemical method based on the e-MIP electrode and the iodometric titration, supporting the reliability of the proposed approach for the determination of ascorbic acid under the investigated conditions.

Overall, the results obtained in this study demonstrate the potential of the proposed e-MIP based on screen-printed sensor as a simple, disposable and selective platform for the electrochemical determination of ascorbic acid in complex food matrices. Although the molecularly imprinted modification did not result in an improvement in sensitivity compared with the bare electrode, the formation of specific recognition sites contributed to a more selective response towards AA, particularly in the presence of electroactive interfering species. The satisfactory recovery values obtained in simulated and fortified real juice samples, together with the good agreement with the iodometric reference method, support the applicability of the proposed approach.

These results confirm the potential of electropolymerized molecularly imprinted polymers for the development of practical electrochemical sensors for the selective determination of ascorbic acid in beverages.

INTRODUZIONE

L'acido ascorbico (AA), noto anche come vitamina C, è una molecola idrosolubile ampiamente diffusa in natura e caratterizzata da proprietà antiossidanti [1]. Dal punto di vista chimico, la sua capacità di agire come agente riducente, ovvero di donare elettroni, lo rende un efficace scavenger di specie reattive dell'ossigeno e di radicali liberi [1–3]. Questa caratteristica è alla base del suo ruolo fondamentale sia nei sistemi biologici sia nel settore alimentare, dove viene impiegato come additivo per prevenire processi ossidativi indesiderati responsabili del deterioramento di colore, aroma e valore nutrizionale dei prodotti [4].

Nel campo alimentare, l'acido ascorbico rappresenta un importante indicatore di qualità, in particolare per bevande come i succhi di frutta, poiché l'ossigeno, il calore eccessivo, l'uso di metalli leggeri e pesanti possono accelerare l'ossidazione dell'AA. La sua concentrazione può variare significativamente durante i processi di produzione, lavorazione e conservazione, a causa di fattori quali esposizione all'ossigeno, temperatura e presenza di ioni metallici [5]. Il monitoraggio del contenuto di vitamina C nelle bevande riveste quindi un ruolo cruciale sia per il controllo qualità sia per la valutazione del valore nutrizionale dei prodotti destinati al consumo [6].

Per la determinazione dell'acido ascorbico sono disponibili diversi metodi analitici, tra cui la titolazione iodometrica, le tecniche cromatografiche ad alte prestazioni (HPLC) e i metodi spettrofotometrici [1,7]. Sebbene tali approcci garantiscano buona accuratezza e sensibilità, presentano spesso limitazioni legate ai lunghi tempi di analisi, ai costi strumentali e alla necessità di pretrattamenti del campione [7]. In questo contesto, le tecniche elettrochimiche rappresentano un'alternativa particolarmente vantaggiosa, grazie alla loro rapidità, sensibilità, semplicità operativa e possibilità di miniaturizzazione, che consente lo sviluppo di dispositivi portatili per analisi in situ [1,8].

Tra i dispositivi elettrochimici, gli elettrodi screen-printed (SPE) hanno trovato sempre più spazio per applicazioni analitiche in ambito alimentare. Essi consentono la realizzazione di sensori monouso, economici e facilmente producibili su larga scala [9]. Tuttavia, uno dei principali limiti degli SPE non modificati è rappresentato dalla scarsa selettività, soprattutto quando si analizzano matrici complesse come i succhi di frutta, contenenti numerose specie elettroattive potenzialmente interferenti [8].

Per ovviare a tale problematica, è possibile modificare la superficie dell'elettrodo con materiali in grado di migliorare la selettività del sensore. In particolare, i polimeri a stampo molecolare (Molecularly Imprinted Polymers, MIP) rappresentano una strategia efficace per ottenere sistemi di riconoscimento selettivo [10].

I MIP sono materiali sintetici ottenuti tramite polimerizzazione in presenza di una molecola stampo (template), che viene poi rimossa, lasciando nel polimero cavità complementari per forma, dimensione e funzionalità chimica alla molecola bersaglio [10,11]. Questo conferisce al materiale proprietà di riconoscimento specifico analoghe a quelle dei sistemi biologici, ma con maggiore stabilità chimica e meccanica [11].

Nel caso di sensori elettrochimici, i MIP possono essere depositati direttamente sulla superficie dell'elettrodo mediante elettropolimerizzazione, ottenendo i cosiddetti e-MIP (electrosynthesized Molecularly Imprinted Polymers). Questa tecnica consente un controllo fine dello spessore e delle proprietà del film polimerico, migliorando le prestazioni del sensore in termini di sensibilità e selettività [12].

La seguente tesi propone lo sviluppo e l'applicazione di una cella screen-printed con elettrodo di lavoro a base di inchiostro di grafite, la cui superficie è stata modificata con un film di polimero a stampo molecolare elettropolimerizzato (e-MIP), per la determinazione voltammetrica di acido ascorbico (AA) in matrici reali. In particolare, l'analisi è stata condotta su diverse tipologie di succhi di frutta, al fine di valutare l'efficacia del sensore in condizioni realistiche e in presenza di possibili interferenti.

Come monomero per la preparazione dell'e-MIP è stato utilizzato il pirrolo, creando siti di riconoscimento complementari all'acido ascorbico.

Prima di sviluppare il sensore è stata svolta una caratterizzazione del processo elettrochimico sulla superficie dell'elettrodo di lavoro della cella screen-printed prima e dopo la copertura dell'elettrodo con e-MIP.

Il metodo per l'analisi quantitativa si basa sulla misura diretta dell'analita utilizzando la voltammetria differenziale pulsata (DPV), sfruttando il picco di ossidazione che si trova intorno ai + 0.2 V.

Le misure sono state condotte in una soluzione tampone fosfato 0.05 M/KCl 0.1 M a pH 7, i migliori risultati sono stati ottenuti dopo l'overossidazione del pirrolo. Un confronto tra gli elettrodi non modificati e quelli modificati con polipirrolo non stampato ha mostrato che il sensore basato su e-MIP presentava maggiore selettività.

Si è poi proseguito con lo studio in differenti matrici acquose con diverse quantità di glucosio, fruttosio, acido citrico, acido tartarico e acido gallico per simulare i succhi e valutare l'effetto degli interferenti e della matrice stessa sul potenziale di picco e sull'intensità di corrente.

Sono state costruite delle curve di calibrazione per valutare le cifre di merito del metodo analitico (LOD, LOQ, range lineare), mentre per il dosaggio dell'acido ascorbico nei campioni reali è stato utilizzato il metodo delle aggiunte standard.

Il metodo sviluppato è stato inoltre validato mediante confronto con una tecnica analitica tradizionale, quale la titolazione iodometrica.

Il contenuto di acido ascorbico ottenuto per le varie bevande è stato confrontato con valori medi di bevande analoghe riportato in letteratura.

PARTE TEORICA

2.1 L'acido ascorbico nelle bevande

L'enantiomero L dell'acido ascorbico (AA; Fig. 1), conosciuto anche come vitamina C, è una vitamina idrosolubile con proprietà antiossidanti [1].

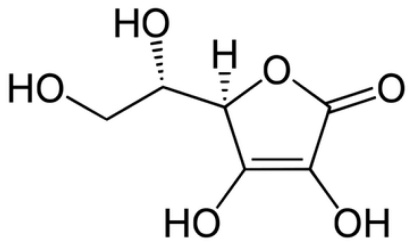


Fig. 1: struttura acido ascorbico

L'acido ascorbico si trova in molti sistemi biologici e alimenti, come verdura fresca, frutta e legumi. In determinate circostanze, quantità eccessive di vitamina C possono inibire i processi naturali che avvengono negli alimenti, contribuendo al deterioramento dell'aroma e del sapore [1].

L'acido ascorbico è una molecola fortemente elettroattiva e il suo comportamento redox rappresenta il principio alla base della determinazione elettrochimica della vitamina C. Dal punto di vista chimico, l'AA possiede una struttura enediolica in grado di cedere facilmente elettroni e protoni, conferendogli marcate proprietà riducenti e antiossidanti [1,4].

Il processo di ossidazione dell'acido ascorbico avviene generalmente mediante trasferimento di due elettroni e due protoni, con formazione di acido deidroascorbico (DHA), secondo il seguente meccanismo:

$$C_6H_8O_6 \rightarrow C_6H_6O_6 + 2H^+ + 2e^-$$

L'ossidazione procede attraverso la formazione di un intermedio radicalico semideidroascorbato relativamente stabile grazie alla delocalizzazione elettronica favorita dal sistema enediolico della molecola [13]. In ambiente acquoso, il processo redox dell'acido ascorbico risulta fortemente dipendente dal pH della soluzione, poiché il trasferimento elettronico è accompagnato dal trasferimento protonico [1].

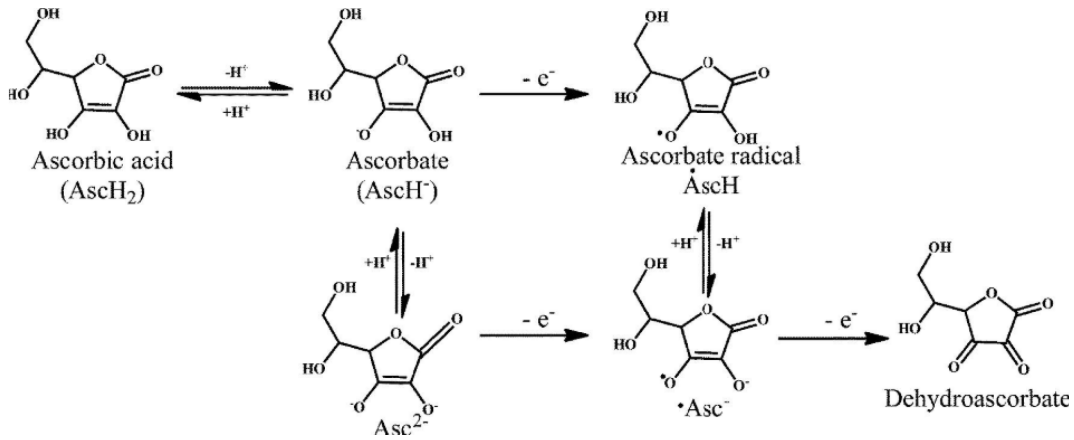


Fig. 2: Meccanismo di ossidazione AA [14]

Dal punto di vista elettrochimico, l'AA presenta generalmente un processo di ossidazione irreversibile o quasi reversibile, influenzato dalla natura della superficie elettrodica, dalla velocità di scansione e dalle condizioni sperimentali adottate [15]. Inoltre, i prodotti di ossidazione possono adsorbirsi sulla superficie dell'elettrodo causando fenomeni di fouling e progressiva diminuzione del segnale analitico [11].

Per tale motivo, nello sviluppo di sensori elettrochimici per la determinazione dell'acido ascorbico, risulta fondamentale modificare la superficie elettrodica mediante materiali funzionali in grado di migliorare il trasferimento elettronico, aumentare la selettività e limitare i fenomeni di passivazione superficiale [18]. Nel presente lavoro tali problematiche sono state affrontate mediante modifica dell'elettrodo screen-printed con polimero a stampo molecolare elettrosintetizzato (e-MIP).

Viene comunemente utilizzato come antiossidante nell'industria alimentare per inibire cambiamenti indesiderati nel sapore o nel colore. Le sue proprietà antiossidanti lo rendono un importante indicatore di qualità per alimenti e bevande [5,7].

L'AA negli alimenti e nelle bevande costituisce un indicatore rilevante della qualità poiché l'ossigeno, il calore eccessivo, l'uso di metalli leggeri e pesanti possono accelerare l'ossidazione dell'AA. Pertanto, la sua concentrazione va costantemente monitorata per quanto riguarda la sua variazione durante la produzione e lo stoccaggio [7].

Per la determinazione dell'acido ascorbico sono stati sviluppati numerosi metodi analitici, tra cui le titolazioni iodometriche, tecniche spettrofotometriche e cromatografiche [1]. Tuttavia, le metodologie elettrochimiche risultano particolarmente vantaggiose grazie alla rapidità di analisi, alla sensibilità, ai bassi costi strumentali e alla

possibilità di miniaturizzazione dei dispositivi analitici [8].

2.2 Elettrodi screen-printed

I sensori elettrochimici rappresentano una delle categorie più diffuse di dispositivi analitici grazie alla loro elevata sensibilità, rapidità di risposta, semplicità strumentale e possibilità di miniaturizzazione [9,10]. Un sensore elettrochimico è costituito generalmente da due componenti principali: un elemento di riconoscimento, responsabile dell'interazione selettiva con l'analita, e un trasduttore, che converte l'evento chimico in un segnale elettrico misurabile [27]. In funzione del parametro elettrico monitorato, i sensori elettrochimici possono essere classificati in amperometrici, potenziometrici, conduttimetrici e voltammetrici [23].

Negli ultimi anni tali dispositivi hanno trovato crescente applicazione in numerosi settori, tra cui analisi ambientale, controllo qualità alimentare, diagnostica clinica e monitoraggio farmaceutico [28]. In particolare, nel settore alimentare i sensori elettrochimici risultano particolarmente vantaggiosi per la determinazione rapida di composti antiossidanti, additivi e contaminanti direttamente in matrici complesse [8].

Gli elettrodi screen-printed (SPE) rappresentano una delle piattaforme più diffuse per lo sviluppo di sensori elettrochimici miniaturizzati [9].

La tecnologia screen-printing consente la produzione di dispositivi monouso mediante deposizione sequenziale di inchiostri conduttivi su un substrato isolante, generalmente plastico o ceramico [9,10].

Il principale vantaggio che deriva dalla miniaturizzazione dei sensori elettrochimici è la riduzione del volume del campione necessario, fino a pochi microlitri, consentendo di limitare consumi e rifiuti oltre ad un'analisi di campioni biologici reali con un'elevata sensibilità senza obbligo di pretrattamento. Le dimensioni ridotte unite alla possibilità di collegarli a un'adeguata apparecchiatura di misura, rende gli SPE ideali per analisi in situ e portatili. Questi elettrodi sono sensibili alle interferenze provenienti da analiti diversi a causa del basso tasso di selettività di trasferimento. Pertanto, sostanze elettroattive presenti nel campione possono facilmente interferire con i biosensori basati su SPE [16].

La tecnologia degli elettrodi serigrafati prevede la deposizione sequenziale strato per strato degli inchiostri su un substrato solido, questa tecnica di produzione è

relativamente semplice, economica e consente la produzione di massa utilizzando la tecnologia a film spesso.

La tecnologia a film spesso viene utilizzata per la costruzione di sensori solidi, planari, robusti, supportati su una base isolante costituita solitamente da materiale plastico (policarbonato, poliestere, ecc.) oppure ceramico (allumina, magnesia, ecc.). Questa tecnologia offre vantaggi in termini di flessibilità progettuale, precisione, rapidità, riproducibilità e ampia scelta di materiali [8-17].

Gli SPE solitamente includono un elettrodo di lavoro (Working electrode) con risposta sensibile alla concentrazione di analita, un elettrodo di riferimento (Reference electrode) con applicazione di un potenziale noto e costante e un contro-elettrodo (Counter electrode) che chiude il circuito a 3 elettrodi [Fig. 3].

Gli elettrodi possono essere stampati su diversi tipi di substrati (plastica, ceramica o carta) e possono essere realizzati con una grande varietà di inchiostri [17].

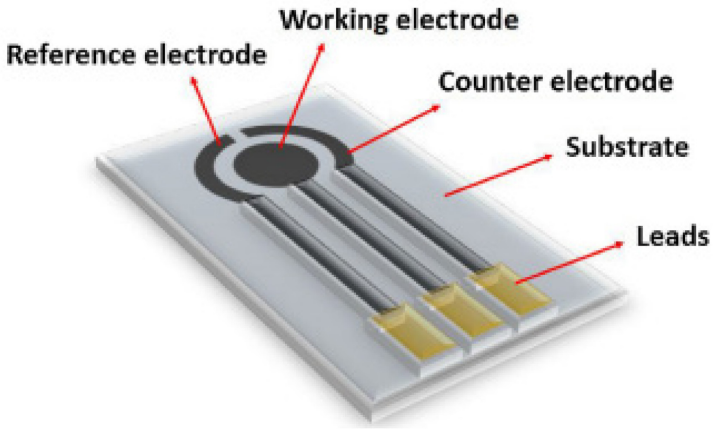


Fig. 3 Rappresentazione schematica di un elettrodo screen-printed [15]

I materiali più comunemente utilizzati per la realizzazione degli SPE comprendono grafite, carbonio vetroso, oro, platino e argento/cloruro d'argento [10]. La scelta del materiale dipende principalmente dal tipo di analisi da effettuare e dalle caratteristiche richieste al sensore, quali conducibilità, stabilità chimica e finestra di potenziale utilizzabile [29].

L'interesse verso gli SPE deriva dai numerosi vantaggi associati a questa tecnologia, tra cui:

- basso costo di produzione;
- possibilità di produzione su larga scala;

- ridotto consumo di campione;
- buona riproducibilità;
- portabilità;
- possibilità di utilizzo come dispositivi monouso [9,30].

Tali caratteristiche rendono gli SPE particolarmente adatti allo sviluppo di dispositivi point-of-care e sistemi per analisi in situ [30].

Nonostante i numerosi vantaggi, gli SPE non modificati possono presentare alcune limitazioni, quali ridotta selettività, fenomeni di fouling superficiale e interferenze dovute alla presenza di specie elettroattive nelle matrici reali [11]. Per migliorare le prestazioni analitiche del sensore è quindi possibile modificare la superficie dell'elettrodo mediante differenti materiali funzionali, tra cui nanoparticelle metalliche, nanomateriali carboniosi, enzimi o film polimerici [12,31].

Nel presente lavoro gli SPE sono stati utilizzati come piattaforma elettrochimica per la costruzione di un sensore modificato con polimero a stampo molecolare elettrosintetizzato (e-MIP), sfruttando i vantaggi di miniaturizzazione, basso costo e possibilità di analisi diretta in matrici alimentari complesse.

2.3 Polimeri a stampo molecolare e-MIP ed e-NIP

I polimeri a stampo molecolare (Molecularly Imprinted Polymers, MIP) sono materiali sintetici caratterizzati dalla presenza di siti di riconoscimento selettivi nei confronti di una specifica molecola bersaglio [16]. Questo è uno dei metodi più recenti e riconosciuti per la caratterizzazione di nuovi tipi di materiali. I MIPs sono altamente specifici rispetto ai metodi convenzionali di separazione o ai saggi biologici basati sulla selettività rispetto a specifiche interazioni molecolari. I MIPs sono materiali sintetici che si legano selettivamente a una molecola bersaglio o ad altre molecole strettamente correlate tramite il riconoscimento [16].

La sintesi di un MIP avviene generalmente mediante polimerizzazione di monomeri funzionali in presenza della molecola stampo (template), che interagisce con i monomeri attraverso legami covalenti, non covalenti o semicovalenti [17,32]. Al termine della polimerizzazione, la molecola stampo viene rimossa, lasciando nel materiale polimerico cavità specifiche in grado di riconoscere selettivamente la specie target [18].

Per la preparazione dei MIPs vengono utilizzati monomeri funzionali e reticolanti mediante polimerizzazione attorno a una molecola stampo, ottenendo così una rete polimerica tridimensionale con elevata densità di reticolazione. In questo processo, viene sfruttata la capacità di interazione del monomero con i gruppi funzionali della molecola stampo.

A seconda della tipologia di interazione template–monomero, è possibile distinguere differenti strategie di imprinting. Nell'approccio covalente la molecola stampo è legata ai monomeri mediante legami covalenti reversibili; questo metodo consente la formazione di siti di riconoscimento più omogenei ma richiede procedure sintetiche più complesse [15]. L'approccio non covalente rappresenta invece la strategia maggiormente utilizzata grazie alla semplicità operativa e alla versatilità applicativa. In questo caso le interazioni template–monomero sono di tipo debole, come legami idrogeno, interazioni elettrostatiche e forze di Van Der Waals [32].

I MIP presentano numerosi vantaggi rispetto ai sistemi di riconoscimento biologico, quali enzimi e anticorpi. Essi mostrano infatti maggiore stabilità termica e chimica, elevata resistenza meccanica, costi di produzione inferiori e migliore conservabilità [17,33]. Grazie a tali caratteristiche, i MIP trovano ampio impiego nello sviluppo di sensori chimici ed elettrochimici, separazioni cromatografiche e tecniche di estrazione selettiva [16].

Nonostante i vantaggi offerti, i MIP tradizionali ottenuti mediante polimerizzazione bulk possono presentare alcune limitazioni, tra cui:

- difficoltà nella completa rimozione della molecola stampo;
- distribuzione eterogenea dei siti di riconoscimento;
- lenta diffusione dell'analita all'interno del polimero [34].

Per superare tali problematiche sono stati sviluppati i polimeri a stampo molecolare elettrosintetizzati (electrosynthesized Molecularly Imprinted Polymers, e-MIP), ottenuti mediante deposizione elettrochimica del film polimerico direttamente sulla superficie dell'elettrodo [19].

Il meccanismo prevede che la molecola stampo venga rimossa dopo la polimerizzazione e, successivamente, siti di legame con forma, dimensioni e funzionalità simili alla molecola bersaglio vengono generati. In questo modo si ottiene un polimero stampato con siti di legame stabili, robusti e resistenti a un'ampia gamma di valori di pH, solventi e

temperature. I MIPs si comportano quindi in modo simile alle interazioni naturali tra recettori, dove una molecola bersaglio viene selettivamente trattenuta, ma senza le limitazioni associate alla stabilità [16].

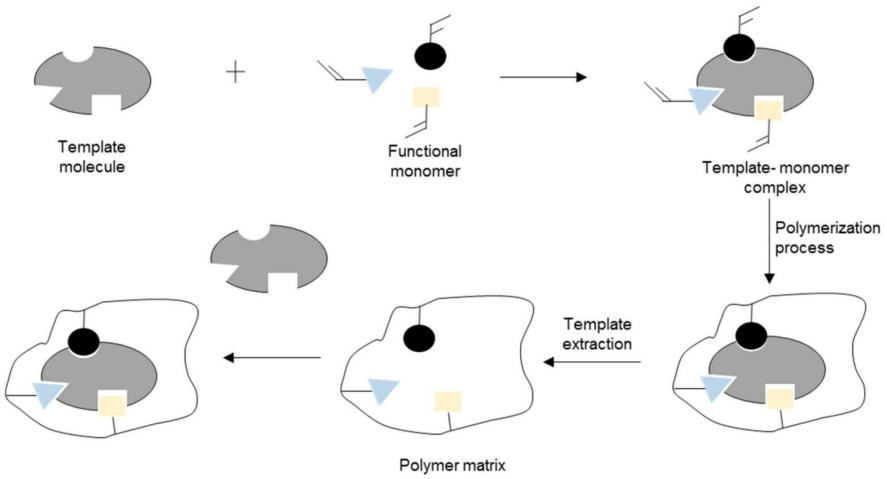


Fig. 4 Rappresentazione della sintesi di un MIP [15]

Per preparare i MIPs viene utilizzata la molecola d'indagine (template), che agirà da stampo per la costruzione di un sito di riconoscimento specifico. La polimerizzazione del monomero funzionale e del reticolante attorno alla molecola target permettono, una volta tolta la molecola d'indagine, la formazione di una cavità idonea ad ospitare la molecola target stessa. In seguito, la molecola target, presente in un campione posto a contatto con il polimero, sarà trattenuta all'interno della cavità generalmente tramite interazioni deboli con i gruppi funzionali del monomero. Sono molti e diversi i monomeri che possono essere utilizzati nella sintesi dei MIP: i più frequentemente impiegati sono acrilati o acrilamidi [17].

I MIP vengono preparati principalmente attraverso polimerizzazioni radicaliche, che possono essere innescate termicamente o per via fotochimica. Tra gli iniziatori più utilizzati si ha l'azo-bis-isobutirronitrile (AIBN) e il 2,2-azo-bis-(2,4-dimetilvaleronitrile) (ABDV) che sono composti decomponibili sia per via fotochimica sia per degradazione termica (AIBN: 60°C e ABDV: 40°C). La degradazione libera N_2 e si formano due radicali metastabili che danno inizio alla reazione di polimerizzazione.

L'elettropolimerizzazione rappresenta una strategia particolarmente vantaggiosa poiché

consente:

- controllo dello spessore del film;
- elevata adesione del polimero alla superficie elettrodica;
- rapida preparazione del sensore;
- maggiore riproducibilità [19,20].

Anche l'agente reticolante (cross-linker) è un monomero con più gruppi polimerizzabili; ciò garantisce il suo inserimento mettendosi a ponte tra le catene polimeriche garantendo un maggior grado di reticolazione al polimero e di conseguenza maggiore rigidità. In genere si utilizzano quantità di reticolante variabili tra il 40% e l'80% in peso della miscela di polimerizzazione, questo per mantenere una quantità di cross-linker tale da permettere la formazione di un polimero sufficientemente poroso per garantire l'ingresso e l'uscita della molecola target, ma allo stesso tempo tale da preservare una rigidità intrinseca per non perdere i siti di riconoscimento [17].

Tra i monomeri maggiormente utilizzati per la preparazione di e-MIP vi è il pirrolo, grazie alla sua elevata conducibilità elettrica, stabilità chimica e facilità di elettropolimerizzazione [19]. Durante il processo elettrochimico il pirrolo viene ossidato formando un film di polipirrolo sulla superficie dell'elettrodo [21].

In presenza della molecola stampo, il film polimerico acquisisce proprietà di riconoscimento selettivo nei confronti dell'analita target [22]. Dopo la formazione del polimero, la molecola stampo viene rimossa mediante estrazione chimica o trattamenti elettrochimici, lasciando cavità di riconoscimento accessibili alla specie analizzata [19].

Nel caso del polipirrolo, un ruolo particolarmente importante è svolto dal processo di over-ossidazione. Tale trattamento comporta l'introduzione di gruppi funzionali ossigenati all'interno del film polimerico, modificandone le proprietà superficiali e migliorando la capacità di riconoscimento selettivo [35]. Inoltre, l'over-ossidazione favorisce la rimozione della molecola stampo e aumenta l'accessibilità dei siti di riconoscimento [36]. Altri monomeri utilizzati per lo stesso scopo sono l'anilina e i derivati del tiofene [22].

Grazie alle loro caratteristiche, gli e-MIP rappresentano una strategia estremamente promettente per lo sviluppo di sensori elettrochimici altamente selettivi e sensibili, applicabili anche all'analisi di matrici complesse [18,19].

2.4 Tecniche elettrochimiche

Le tecniche elettrochimiche rappresentano strumenti analitici ampiamente utilizzati per lo studio dei processi redox e per la determinazione quantitativa di specie elettroattive [23,37]. Tali metodologie si basano sulla misura di grandezze elettriche, quali corrente, potenziale o carica, generate in seguito all'interazione tra l'analita e la superficie di un elettrodo [38].

Negli ultimi anni le tecniche elettrochimiche hanno assunto un ruolo sempre più importante in ambito analitico grazie ai numerosi vantaggi offerti, tra cui elevata sensibilità, rapidità di analisi, semplicità strumentale, costi relativamente contenuti e possibilità di miniaturizzazione dei dispositivi [8,23]. Inoltre, tali tecniche risultano particolarmente adatte all'analisi di matrici complesse, poiché richiedono spesso limitati trattamenti preliminari del campione [37].

Nel presente lavoro sono state impiegate la voltammetria ciclica (CV) e la voltammetria differenziale pulsata (DPV), utilizzate rispettivamente per la preparazione e caratterizzazione degli elettrodi modificati e per la determinazione quantitativa dell'acido ascorbico.

2.4.1 Voltammetria ciclica

La voltammetria ciclica (CV) è diventata una tecnica elettroanalitica importante e ampiamente utilizzata in molti ambiti della chimica. Raramente viene impiegata per determinazioni quantitative, ma è molto usata per lo studio dei processi redox, per comprendere gli intermedi di reazione e per ottenere informazioni sulla stabilità dei prodotti di reazione [38,39].

La voltammetria ciclica è spesso il primo esperimento eseguito in uno studio elettrochimico di un composto, di un materiale biologico o di un elettrodo. È utilizzata efficacemente in campi quali la chimica ambientale ed elettrochimica, la chimica organica e biochimica. L'efficacia dei risultati CV deriva proprio dalla sua capacità di osservare rapidamente il comportamento redox su un'ampia finestra di potenziale. Risulta molto utile anche come tecnica analitica convenzionale, in quanto fornisce informazioni in funzione dell'energia di scansione [39].

La voltammetria ciclica (CV) è una tecnica basata sulla variazione lineare del potenziale

applicato all'elettrodo di lavoro nel tempo, registrando la corrente risultante [23]. Durante la misura, il potenziale viene fatto variare tra due valori prefissati secondo una scansione diretta e inversa (anodica e catodica ad una certa velocità) consentendo lo studio dei processi di ossidazione e riduzione delle specie elettroattive [24].

I risultati ottenuti dalla CV vengono visualizzati tramite un voltammogramma [Fig. 5] in cui si riporta l'intensità di corrente misurata rispetto al potenziale applicato.

Se il processo elettrochimico è di natura reversibile, il voltammogramma mostrerà due picchi associati, uno di andata, e uno in ritorno. Tale picco in ritorno è dovuto alla presenza, vicino alla superficie elettrodica, della specie generata elettrochimicamente nel processo di andata, è quindi suscettibile a sua volta della reazione redox inversa [23].

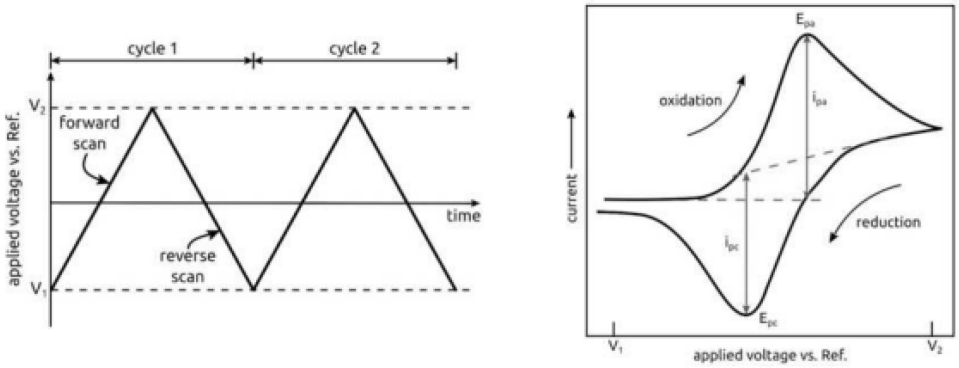


Fig 5. Sinistra: scansione del potenziale in voltammetria ciclica. Destra: voltammogramma CV per una specie redox reversibile [25].

Durante la scansione anodica le specie elettroattive possono subire ossidazione, generando un picco anodico; nella scansione inversa possono invece verificarsi processi di riduzione associati alla comparsa di un picco catodico [39]. La posizione e l'intensità dei picchi dipendono da diversi fattori, tra cui:

- natura dell'analita;
- velocità di trasferimento elettronico;
- velocità di scansione;
- fenomeni diffusionali;
- caratteristiche della superficie elettrodica [38].

L'analisi dei voltammogrammi ciclici consente di ottenere informazioni riguardanti: reversibilità del processo elettrochimico; cinetica di trasferimento elettronico; area elettroattiva dell'elettrodo; fenomeni di adsorbimento o diffusione [39].

Nel presente lavoro la voltammetria ciclica è stata utilizzata:

- per la deposizione del film e-MIP;
- per la caratterizzazione elettrochimica della superficie elettrodica;
- per lo studio del processo di ossidazione dell'acido ascorbico.

2.4.2 Voltammetria differenziale pulsata

Nella tecnica classica (LSV) la scansione del potenziale è lineare nel tempo. Le specie elettroattive in soluzione si muoveranno verso l'elettrodo di lavoro dove avverrà la semi-reazione redox di interesse mentre al contro-elettrodo, grazie alla differenza di potenziale impostata dallo strumento, avverrà l'altra semi-reazione complementare in modo da chiudere il circuito [38].

Il potenziale applicato è gradualmente variato in una direzione (o positiva o negativa) con una velocità di scansione ben definita e, quando, raggiunge un valore sufficiente, all'elettrodo di lavoro si osserva un incremento brusco della corrente (corrente faradica) determinata dalla semi-reazione (ossidazione o riduzione) di interesse.

L'intensità della corrente che si misura è proporzionale alla concentrazione della specie elettroattiva coinvolta nel processo redox all'elettrodo di lavoro.

Le tecniche pulsate sono state sviluppate a partire da differenti modulazioni del potenziale allo scopo di migliorare la velocità e la sensibilità della voltammetria a scansione lineare (LSV), la quale, come detto precedentemente, si basa su una scansione di potenziale lineare nel tempo.

Principalmente, esse differiscono tra di loro per la forma dell'impulso e per il metodo di campionamento della corrente. Le tecniche voltammetriche pulsate hanno inoltre la caratteristica di poter abbassare il LOD (Limit Of Detection) di un'analisi attraverso l'aumento del rapporto tra corrente faradica e corrente non faradica: si applicano degli impulsi di potenziale della durata di pochi millisecondi invece di applicare una scansione di potenziale lineare nel tempo al WE; così facendo la corrente di carica decresce rapidamente mentre quella faradica decade più lentamente.

Si ottiene quindi che, campionando la corrente negli ultimi istanti dell'impulso, si è in grado di discriminare meglio la corrente di carica dalla corrente faradica [40].

La voltammetria differenziale pulsata (DPV) è quindi una tecnica voltammetrica pulsata caratterizzata da elevata sensibilità e bassi limiti di rivelabilità [38].

Grazie all'elevata sensibilità e alla possibilità di discriminare efficacemente le correnti di fondo, la DPV risulta particolarmente adatta per applicazioni quantitative e per l'analisi di matrici complesse [40].

In questa tecnica, impulsi di potenziale vengono sovrapposti a una rampa lineare di potenziale e la corrente viene misurata immediatamente prima e al termine di ciascun impulso, quando la corrente di carica è trascurabile.

Il valore di corrente campionato all' inizio viene sottratto dal valore campionato alla fine dell'impulso; la differenza tra i due valori di corrente consente di ridurre il contributo della corrente capacitiva, migliorando il rapporto tra corrente faradica e rumore di fondo [40]: la differenza di corrente viene riportata in grafico in funzione del potenziale applicato.

Il grafico che si ottiene presenta picchi di altezza proporzionale alla concentrazione degli analiti [Fig. 6].

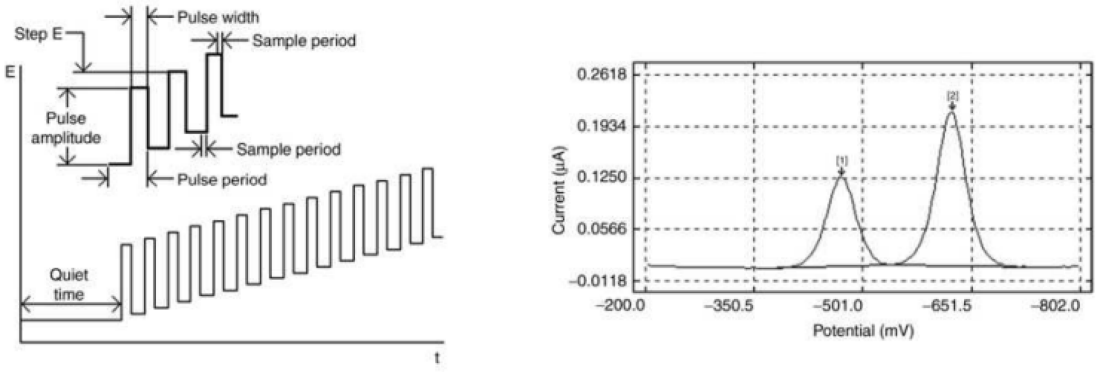


Fig 6. Sinistra: onda di potenziale della DPV. Destra: voltammogramma DPV [25].

Nel presente lavoro la DPV è stata utilizzata per la determinazione quantitativa dell'acido ascorbico nelle differenti matrici analizzate.

2.4.3 Spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS)

La spettroscopia di impedenza è una tecnica elettrochimica utilizzata per caratterizzare le proprietà elettriche e interfacciali di un sistema elettrodo/soluzione. La tecnica consiste nell'applicazione al sistema elettrochimico di una piccola perturbazione

sinusoidale di potenziale o di corrente, generalmente attorno a una condizione di equilibrio o di stato stazionario, e nella misura della risposta del sistema al variare della frequenza [41,42]. A differenza delle tecniche voltammetriche, nelle quali il potenziale viene modificato secondo una scansione continua o pulsata, l'EIS permette quindi di separare e studiare i differenti processi che contribuiscono alla risposta elettrochimica in funzione della loro diversa dipendenza dalla frequenza.

Nella misura di impedenza, al sistema viene applicato un potenziale sinusoidale descritto dall'equazione:

$$E(t) = E_0 \cdot sen(\omega t) \tag{1}$$

dove E_0 rappresenta l'ampiezza della perturbazione e ω la frequenza angolare.

La perturbazione genera una corrente sinusoidale che, in generale, presenta la stessa frequenza del segnale applicato ma risulta sfasata rispetto ad esso. L'impedenza elettrochimica (Z) è definita come il rapporto tra il potenziale applicato e la corrente risultante:

$$Z(\omega) = \frac{E(\omega)}{I(\omega)} \tag{2}$$

e, trattandosi di una grandezza complessa, può essere espressa mediante una componente reale (Z') e una componente immaginaria (Z''):

$$Z(\omega) = Z_{Re}(\omega) + jZ_{Im}(\omega) \tag{3}$$

dove j rappresenta l'unità immaginaria. Il modulo dell'impedenza e l'angolo di fase possono essere ricavati rispettivamente dalle relazioni:

$$|Z| = \sqrt{(Z_{Re})^2 + (Z_{Im})^2} \tag{4}$$

$$\varphi = artan(\frac{Z_{Im}}{Z_{Re}}) \tag{5}$$

L'analisi della risposta su un ampio intervallo di frequenze permette di ottenere informazioni relative a diversi fenomeni che avvengono all'interfaccia elettrodo/soluzione, quali il trasporto di massa, il trasferimento di carica e la formazione e il comportamento del doppio strato elettrico [41,42]. L'utilizzo di una perturbazione di

piccola ampiezza è particolarmente importante affinché il sistema possa essere considerato, in prima approssimazione, lineare e la risposta misurata possa essere interpretata attraverso modelli di circuiti equivalenti.

I dati ottenuti mediante EIS possono essere rappresentati principalmente attraverso i diagrammi di Bode e di Nyquist. Nel diagramma di Bode vengono riportati il modulo dell'impedenza e l'angolo di fase in funzione del logaritmo della frequenza. Questa rappresentazione consente di osservare l'evoluzione della risposta del sistema nell'intero intervallo di frequenze analizzato. Nel diagramma di Nyquist, invece, viene riportata la componente immaginaria dell'impedenza in funzione della componente reale. Quest'ultima rappresentazione è particolarmente utile per valutare qualitativamente e quantitativamente i processi di trasferimento di carica che avvengono all'interfaccia elettrodo/soluzione [41,42].

Per interpretare i dati sperimentali, la risposta di impedenza viene generalmente descritta attraverso un circuito elettrico equivalente, costituito da elementi circuitali quali resistenze, condensatori e impedenze di Warburg. La scelta del circuito deve essere effettuata sulla base dei processi fisici e chimici che contribuiscono alla risposta del sistema, evitando di attribuire un significato fisico a parametri che non siano adeguatamente supportati dal modello adottato [41]. In particolare, per sistemi elettrochimici relativamente semplici, il modello più comunemente utilizzato è il circuito equivalente di Randles.

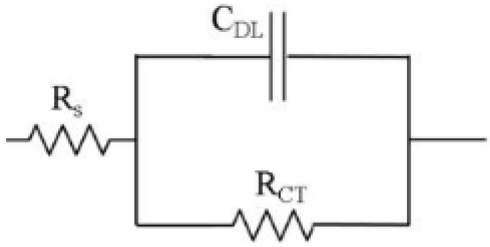


Fig. 7: Schema della cella di Randles [46].

Il circuito di Randles comprende generalmente la resistenza della soluzione (R_s), associata alla resistenza ohmica dell'elettrolita e dei collegamenti elettrici, la capacità del doppio strato (C_{dl}), la resistenza al trasferimento di carica (R_{ct}) e, nei sistemi in cui i fenomeni diffusivi assumono un ruolo significativo, l'elemento di Warburg (Z_W). La capacità del doppio strato descrive l'accumulo di carica all'interfaccia tra elettrodo ed

elettrolita, mentre (R_{ct}) rappresenta l'opposizione cinetica al trasferimento di elettroni tra l'elettrodo e la specie elettroattiva presente nella soluzione. L'elemento di Warburg è invece associato ai fenomeni di trasporto di massa e, in particolare, alla diffusione delle specie elettroattive verso la superficie elettrodica [41,42].

Nel caso di un sistema descritto da un circuito di Randles ideale, il diagramma di Nyquist presenta generalmente un semicerchio seguito, alle basse frequenze, da una componente lineare associata alla diffusione. L'intercetta del semicerchio con l'asse reale alle alte frequenze è correlata alla resistenza della soluzione (R_s), mentre l'intercetta alle basse frequenze è data, in prima approssimazione, dalla somma di (R_s) e (R_{ct}). Di conseguenza, il diametro del semicerchio è direttamente correlato alla resistenza al trasferimento di carica [41,42].

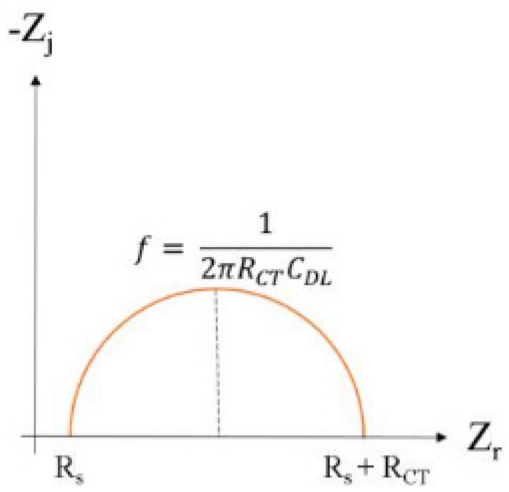


Fig. 8: Grafico di Nyquist per una cella di Randles semplificata [46].

La misura di (R_{ct}) risulta particolarmente interessante nel caso di elettrodi modificati, poiché la deposizione di un film sulla superficie dell'elettrodo può modificare significativamente il trasferimento elettronico all'interfaccia. Un aumento di (R_{ct}) indica generalmente una maggiore difficoltà nel trasferimento di carica tra la sonda redox e la superficie elettrodica, mentre valori inferiori sono associati a un trasferimento elettronico più agevole [41]. Nei sistemi di sensing basati su materiali di riconoscimento immobilizzati sulla superficie dell'elettrodo, le variazioni di (R_{ct}) possono quindi essere sfruttate per valutare l'effetto della modifica superficiale e, in determinate configurazioni, per monitorare l'interazione tra analita e recettore.

Nel caso specifico dei polimeri a stampo molecolare, la risposta impedimetrica può

essere influenzata dalla presenza del film polimerico, dalla sua natura, dallo spessore del rivestimento e dall'accessibilità della superficie elettrodica alla sonda redox [43,45]. La formazione del film di e-MIP può infatti ostacolare il trasferimento di carica, determinando un aumento della resistenza al trasferimento elettronico R_{ct}. Successivamente, la rimozione della molecola stampo determina la formazione di cavità di riconoscimento che possono rendere maggiormente accessibile la superficie dell'elettrodo alla soluzione. Al contrario, il successivo reinserimento dell'analita all'interno delle cavità può nuovamente ostacolare l'accesso della sonda redox alla superficie elettrodica, provocando una variazione di R_{ct}. Questo comportamento può essere sfruttato per monitorare indirettamente l'interazione tra l'analita e le cavità di riconoscimento del MIP e costituisce uno dei principi alla base dell'impiego dell'EIS nella caratterizzazione di sensori basati su polimeri a stampo molecolare.

Nel presente lavoro, le misure di spettroscopia di impedenza elettrochimica sono state quindi effettuate allo scopo di caratterizzare le proprietà interfacciali degli elettrodi prima e dopo la deposizione del film polimerico. Il confronto dei diagrammi di Nyquist e dei parametri ottenuti mediante il fitting con un circuito equivalente permette di valutare l'effetto della modifica superficiale sul trasferimento di carica e, più in generale, sulle proprietà elettrochimiche del sensore. Tale caratterizzazione risulta complementare alla voltammetria ciclica e alla voltammetria differenziale pulsata, fornendo informazioni specifiche sull'interfaccia elettrodo/soluzione che non sono direttamente ricavabili dalle sole misure voltammetriche.

2.5 Caratterizzazione elettrochimica della superficie elettrodica

La caratterizzazione elettrochimica della superficie elettrodica rappresenta un passaggio fondamentale nello sviluppo di sensori elettrochimici, poiché consente di valutare le proprietà di trasferimento elettronico e l'area elettroattiva dell'elettrodo [23].

Tra le tecniche maggiormente utilizzate vi è la voltammetria ciclica in presenza di sonde redox reversibili, come il sistema ferricianuro/ferrocianuro $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ [26]. Per un processo reversibile, la corrente di picco viene descritta tramite l'equazione di Randles–Ševčík:

$$i_p = 2.69 \cdot 10^5 z^{3/2} A D^{1/2} [C] \nu^{1/2} \quad (6)$$

dove:

- i_p è la corrente di picco (A),
- n è il numero di elettroni trasferiti,
- A è l'area elettroattiva dell'elettrodo (cm^2),
- D è il coefficiente di diffusione ($cm^2 \cdot s^{-1}$),
- C è la concentrazione della specie elettroattiva ($mol \cdot cm^{-3}$),
- v è la velocità di scansione ($V \cdot s^{-1}$)

La relazione lineare tra corrente di picco e radice quadrata della velocità di scansione rappresenta un indicatore di controllo diffusivo del processo elettrochimico [23].
Nel presente lavoro tale approccio è stato utilizzato per confrontare il comportamento elettrochimico degli elettrodi non modificati e degli elettrodi modificati con e-MIP, valutando le variazioni di area superficiale attiva.

2.6 Rette di calibrazione

La curva di calibrazione detta *"retta di taratura"* è alla base della chimica analitica per la determinazione della concentrazione di un analita in un campione incognito tramite interpolazione. Una relazione lineare tra la concentrazione e la risposta del segnale permette un'immediata interpretazione dei dati; in mancanza di questa relazione, spesso si sfruttano metodi di linearizzazione considerando il reciproco o il logaritmo di una delle grandezze. La costruzione di una curva di calibrazione implica l'adozione di un metodo di regressione. Quello più utilizzato è il metodo di regressione lineare ordinaria dei minimi quadrati (OLLSR, ordinary linear lower squares regression) che presenta però delle condizioni necessarie:

- la relazione funzionale segnale/concentrazione deve essere tale per cui gli errori sperimentali associati alla variabile indipendente devono essere trascurabili rispetto a quelli associati alla variabile dipendente;
- gli errori associati alla variabile dipendente devono essere normalmente distribuiti;
- il sistema analitico deve essere omoschedastico, il che significa che la precisione non deve cambiare significativamente al variare della concentrazione;
- il segnale deve variare linearmente con la concentrazione.

Nel caso in cui queste condizioni non siano verificate, è necessario ricorrere ad un altro metodo di regressione.

Da una curva di calibrazione si possono ricavare diversi parametri:

Il limite di rivelabilità è la minima quantità rivelabile, indicato comunemente con le sigle DL e LOD ("detection limit" o "limit of detection"). Il LOD rappresenta la concentrazione di analita che produce un segnale vicino a quello del bianco, ma significativamente diverso da quello del bianco; rappresenta quindi alla concentrazione corrispondente al minimo segnale significativo (S_s).

Per decidere la presenza/assenza dell'analita si definisce il segnale minimo significativo:

$$S_s = \mu_b + k \cdot \sigma_b \quad (7)$$

Dove: μ_bè il segnale medio del bianco, ovvero la media dei segnali misurati in campioni a concentrazione zero di analita, σ_b è la deviazione standard associata a queste misurazioni.

Per valutare il LOD è quindi necessario eseguire un numero adeguato di misurazioni replicate del bianco, in modo da stimare la distribuzione del segnale ad esso relativo, individuando così il minimo segnale significativo, S_s.

Una definizione sufficientemente accurata è quella con un valore di *k* =3.3, per cui:

$$S_s = \mu_B + 3.3 \cdot \sigma_B \quad (8)$$

Considerando la relazione tra il segnale *S* la concentrazione *c*

$$S_s = a + b \cdot c \quad (9)$$

Dove: *a* è l'intercetta della retta di calibrazione, *b* la pendenza, note con sufficiente accuratezza, il LOD corrisponderà al valore di *c* quando *S* viene sostituito dal minimo segnale significativo:

$$S_s = \mu_B + 3.3 \cdot \sigma_B = a + b \cdot LOD \quad (10)$$

Considerando che l'intercetta *a*, (che corrisponde in una retta di taratura al segnale del campione a concentrazione zero di analita), può non essere significativamente diversa dal segnale medio del bianco si ottiene:

$$LOD = \frac{3.3 \cdot \sigma_B}{b} \quad (11)$$

Nel caso in cui non si abbia a disposizione un numero adeguato di repliche del bianco, si può applicare la seguente equazione:

$$LOD = \frac{3.3 \cdot S_{y/z}}{b} \quad (12)$$

In questo caso Sy/x è la deviazione standard dei residui; quindi, corrisponde all'errore sulle ordinate ottenuto dalla regressione lineare dei dati sperimentali; questo valore si può considerare non significativamente diverso dalla deviazione standard di misure replicate del bianco.

Il limite di quantificazione LOQ (*limit of quantification*), è il limite di concentrazione dal quale è possibile effettuare un'analisi quantitativa.

Un'analisi si può definire quantitativa solo se il segnale è 10 (o 20) volte maggiore della deviazione standard del bianco.

Da ciò deriva che il LOQ è definito dalla relazione:

$$LOQ = \frac{10 \cdot LOD}{3.3} \tag{13}$$

Dalla retta di calibrazione si possono poi ricavare DR e LR: l'intervallo dinamico (DR), è l'intervallo di concentrazione nel quale il segnale varia con la concentrazione: i limiti inferiore e superiore del range dinamico corrispondono rispettivamente al limite di rivelabilità ed alla più alta concentrazione alla quale un incremento di concentrazione produce ancora un incremento di segnale. L'intervallo di linearità (LR), è l'intervallo di concentrazione nel quale il segnale varia linearmente con la concentrazione.

Per verificare l'omoschedasticità del sistema si effettua un test F in cui si confronta un valore di F critico a una coda con F sperimentale che si ottiene dal rapporto tra la varianza della concentrazione più alta e quella più bassa, tramite la seguente relazione:

$$F_{exp} = \frac{S^2_{max}}{S^2_{min}} \tag{14}$$

Se $F_{critico} > F_{exp}$, la precisione non varia significativamente al variare della concentrazione, quindi il sistema sarà omoschedastico. Se invece $F_{critico} < F_{exp}$, la precisione varia significativamente al variare della concentrazione, quindi il sistema sarà eteroschedastico. A questo può seguire un test t di Student.

Il test t di Student è un test statistico utilizzato per confrontare le medie di due popolazioni e valutare se la differenza osservata tra esse sia statisticamente significativa. Nel confronto tra due metodi analitici, il test consente di verificare l'ipotesi nulla H_0, secondo cui le due medie non differiscono significativamente, rispetto all'ipotesi alternativa H_1. La scelta della procedura dipende dalle caratteristiche dei dati e, in particolare, dall'uguaglianza o meno delle varianze, precedentemente valutata mediante il test F. Nel presente lavoro, il confronto tra i risultati ottenuti mediante il sensore e-

MIP e mediante titolazione iodometrica è stato effettuato mediante un test t per due campioni assumendo varianze uguali. Il risultato viene valutato confrontando il valore della statistica t con il corrispondente valore critico, al livello di significatività prefissato. Se $|t| < t_{\mathrm{crit}}$, non si rifiuta l'ipotesi nulla e non si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra le due medie.

Infine, è possibile verificare la non linearità tramite il test di Mandel, per definire fino a quale concentrazione è mantenuto l'andamento lineare sfruttando la seguente equazione:

$$TV = \frac{(N-2)s_{1,y/x}^2 - (N-3)s_{2,y/x}^2}{s_{2,y/x}^2} \quad (15)$$

N è il numero di repliche, $s_{1,y/x}$ è la deviazione standard residua della regressione lineare, $s_{2,y/x}$ è la deviazione standard residua della regressione quadratica. Il valore TV si confronta con F critico: se TV risulta essere inferiore o uguale a F critico, allora si può assumere che il fitting con equazione di secondo grado non porta a risultati qualitativamente migliori rispetto a quello lineare [26].

PARTE SPERIMENTALE

3.1 Reattivi e apparecchiature

Tutti i reagenti sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni, se non diversamente specificato, e provengono da Merck Life Science S.r.l. (Milano, Italia).

Sono stati impiegati: acido L-ascorbico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA; CAS: 50-81-7), sodio diidrogeno fosfato (NaH_2PO_4, ≥99.0%), sodio fosfato bibasico (Na_2HPO_4, ≥99.0%), sodio solfato (Na_2SO_4, ≥99.0%), perclorato di litio ($LiClO_4$, ≥98.0%), cloruro di potassio (KCl, ≥99.0%), tiosolfato di sodio ($Na_2S_2O_3$), iodato di potassio (KIO_3), ioduro di potassio (KI) e amido solubile.

Tutte le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua distillata.

Il pirrolo (Py, 98%) è stato distillato prima di ogni utilizzo con un distillatore Hickman fino ad ottenere un liquido incolore ed è stato conservato al buio a 4 °C.

Il tampone fosfato 0.05 M/KCl 0.1 M a pH 7 è stato preparato sciogliendo le opportune quantità di NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4 in acqua distillata e aggiungendo KCl; il pH è stato regolato mediante aggiunta di $HClO_4$ utilizzando un pH-metro SevenMulti con elettrodo combinato InLab Pro (Mettler Toledo S.p.A., Milano, Italia).

Le celle screen printed con elettrodo e controelettrodo di inchiostro di grafite e pseudo-riferimento ad inchiostro Ag/AgCl, sono state fornite dalla ditta Topflight Italia S.P.A. (Vidigulfo, Pavia - Italia).

Le analisi voltammetriche sono state eseguite con lo strumento EmStat4s (PalmSens BV, Houten, Paesi Bassi).

Per la caratterizzazione della superficie degli elettrodi sono state utilizzate soluzioni di cloruro di potassio, esacianoferrato di potassio(III) ($K_3[Fe(CN)_6]$) e cloruro di sodio.

Sono state preparate soluzioni acquose per simulare i succhi come test preliminare per vedere il comportamento dell'elettrodo prima di utilizzarlo nelle diverse matrici reali (succo d'arancia, di mela, di limone e d'uva).

Per la realizzazione delle bevande simulate sono stati utilizzati: Acido Gallico (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA – CAS: 149-91-7), Acido L-Tartarico (99%, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA – CAS: 87-69-4) Glucosio (≥ 99.5%, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA – CAS: 50-99-7), Fruttosio (≥ 99%, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA – CAS: 57-48-7), Acido Citrico (≥ 99.5%, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA – CAS: 77-92-9), Acido L-ascorbico (99%, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA – CAS:50-81-7). Le soluzioni sono state preparate aggiungendo gli interferenti in diverse quantità in base a quanto riscontrato in letteratura.

Come matrici reali per l'analisi di campioni fortificati sono stati analizzati succo d'arancia: "Sterilgarda" – succo di mela: "Skipper Zuegg" e succo di limone "ReaLemon - Polenghi".

Infine, sono state svolte delle titolazioni iodometriche come metodo di confronto; nella seguente analisi sono stati utilizzati: tiosolfato di sodio ($Na_2S_2O_3$), iodato di potassio (KIO_3), ioduro di potassio (KI) e amido solubile.

3.2 Procedura per la preparazione dell'elettrodo modificato e-MIP

Per tutto il processo, le celle screen-printed che verranno descritte sono monouso.

Per la preparazione dell'elettrodo modificato con e-MIP è stata utilizzata la voltammetria ciclica.

Precisamente, sono stati preparati 10 mL una soluzione contenente $LiClO_4$ 0.1 M, pirrolo 15 mM e acido ascorbico 10 mM. La miscela prepolimerica è stata mantenuta sotto agitazione per circa 10 minuti al fine di favorire l'interazione tra monomero e molecola

stampo.

La miscela prepolimerica per il NIP è stata preparata seguendo la procedura appena descritta, senza però l'introduzione dell'analita, ovvero l'acido ascorbico.

La cella screen-printed è stata immersa nella soluzione e sottoposta a 5 cicli di voltammetria ciclica nel range di potenziale compreso tra −0.6 V e +0.8 V, con velocità di scansione pari a 0.1 V s^{-1}.

Al termine della polimerizzazione, gli elettrodi sono stati rimossi dalla soluzione e lasciati asciugare all'aria sotto cappa per una notte (circa 12 ore).

Il giorno successivo, gli elettrodi sono stati sottoposti a lavaggio in 10 mL di tampone fosfato (0.05 M)/KCl (0.1 M) sotto agitazione per 20 minuti.

Successivamente, è stata effettuata l'over-ossidazione del polipirrolo mediante cronoamperometria applicando un potenziale costante di +1.2 V per 120 s in soluzione tampone.

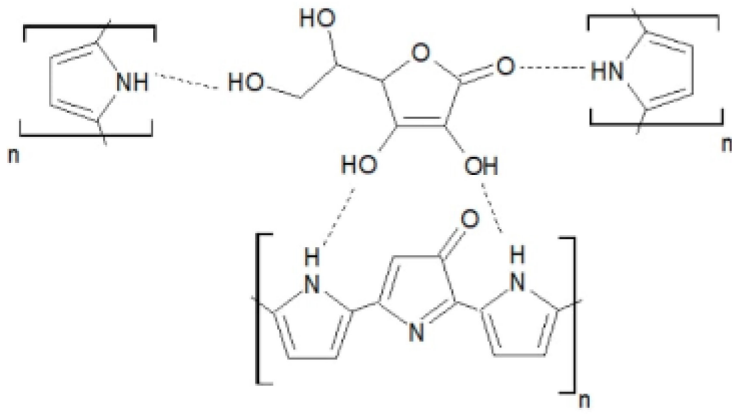


Fig. 9: Rappresentazione del meccanismo di reazione tra l'Acido Ascorbico e il polipirrolo over-ossidato [48].

Per quanto riguarda la rimozione della molecola stampo, questa è stata eseguita mediante 15 cicli di voltammetria ciclica nel range di potenziale tra −1.0 V e +1.0 V, con velocità di scansione pari a 0.1 V s^{-1}.

Gli elettrodi non imprintati (e-NIP) sono stati preparati seguendo la medesima procedura, in assenza di acido ascorbico nella soluzione di polimerizzazione.

3.3 Procedura per la caratterizzazione della superficie dell'elettrodo

Per questa misura, l'elettrodo screen-printed è stato collegato allo strumento PalmSens effettuando misure di voltammetria ciclica per valutare l'area superficiale di un

elettrodo.

Il risultato ottenuto dalle misure sperimentali potrebbe differire da quello fornito dal produttore (che viene calcolato da parametri geometrici), poiché non tutti i punti dell'elettrodo potrebbero essere uniformemente accessibili, oppure l'elettrodo potrebbe presentare dei difetti sulla superficie, i quali comportano un'area attiva diversa rispetto al teorico.

Per poter condurre queste misure è necessario utilizzare una sonda elettrochimica, ovvero una sostanza della quale siano noti il coefficiente di diffusione D e i potenziali redox. La sonda deve presentare un comportamento redox reversibile.

In questo lavoro la caratterizzazione elettrochimica degli elettrodi è stata eseguita mediante voltammetria ciclica utilizzando come sonda redox una soluzione di $K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM in KCl 0.1 M.

Per effettuare questa determinazione, si eseguono 3 scansioni in CV da -1 V a +1 V a velocità di scansione crescente da 0.02 V/s a 0.5 V/s immergendo gli elettrodi in 10 mL di soluzione contenente oltre al probe elettrochimico anche l'elettrolita di supporto.

Per ciascun elettrodo sono stati registrati i valori di corrente di picco anodica e catodica, che sono stati successivamente riportati in funzione della radice quadrata della velocità di scansione.

Come già anticipato, l'area viene ricavata attraverso l'equazione 6 di Randles-Ševčík nella sezione teorica 2.5.

3.4. Procedura per la determinazione dell'acido ascorbico con tecnica DPV

Per quantificare l'acido ascorbico le misure analitiche sono state effettuate mediante voltammetria differenziale pulsata (DPV).

L'analisi è stata condotta in 10 mL di tampone fosfato (0.05 M)/KCl (0.1 M), aggiungendo aliquote note di soluzione standard di acido ascorbico, agitando la soluzione per 20 s prima di ogni misura.

I parametri strumentali utilizzati sono stati:

- intervallo di potenziale: −0.5 V / +0.6 V
- step di potenziale: 0.01 V
- ampiezza impulso: 0.025 V

- durata impulso: 0.25 s
- velocità di scansione: 0.02 V s^{-1}

La quantificazione è stata effettuata utilizzando il picco di ossidazione dell'acido ascorbico, osservato intorno a +0.2 V.

Le misure sono state effettuate sia con la cella screen-printed, quindi con l'elettrodo di lavoro non modificato (elettrodo bare), sia con quello modificato con e-MIP e infine con e-NIP.

3.5 Procedura della titolazione iodometrica

Nel seguente lavoro, per valutare l'affidabilità e l'esattezza dei risultati ottenuti con gli elettrodi, è stata determinata la quantità di acido ascorbico anche tramite titolazione iodometrica: la procedura è stata effettuata su una quantità nota di acido ascorbico disciolto in 250 mL di acqua.

Lo standard è lo iodato che in ambiente acido, in presenza di ioduro, produce quantitativamente iodio (con I^- in eccesso, I_2 è presente in forma I_3^-, triioduro). Avviene una retro-titolazione aggiungendo un eccesso di I_3^-. Con tiosolfato si titola l'eccesso e, per differenza, si risale alla quantità che ha reagito con l'acido ascorbico [Fig. 10].

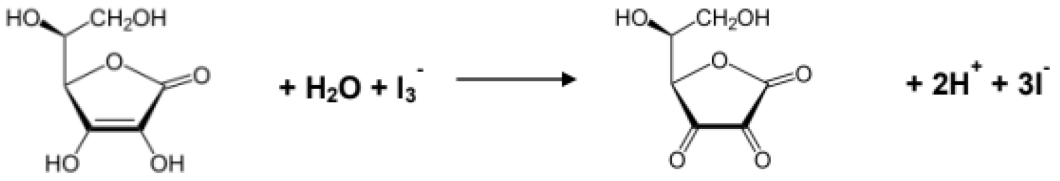


Fig. 10: schema della retro-titolazione con eccesso di I_3^-

Per cominciare, si procede con la standardizzazione del tiosolfato (standard primario), uno standard ossidante che libera iodio dallo ioduro. Le soluzioni di tiosolfato non sono particolarmente stabili, il sale $Na_2S_2O_3$ è molto igroscopico e non può essere scaldato in stufa perché altrimenti si decomporrebbe.

Come già detto sopra, lo iodato che in ambiente acido, in presenza di ioduro, produce quantitativamente iodio; l'aggiunta dello ioduro riduce la perdita di I_2 determinata dalla parziale volatilità di questo reattivo oltre al fatto che lo iodio si discioglie più velocemente nella soluzione di ioduro.

La reazione è la seguente:

$$IO_3^- + 8I^- + 6H^+ \leftrightarrow 3I_3^- + 3H_2O$$

Il tiosolfato è ossidato dal triioduro secondo la reazione:

$$2S_2O_3^{2-} + I_3^- \leftrightarrow S_4O_6^{2-} + 3I^-$$

Operativamente si procede nel seguente modo: si prelevano 20 mL della soluzione di KIO_3 0.01 M, si aggiunge una spatolata di KI, si acidifica con 5 mL di H_2SO_4 1M e si procede alla titolazione con tiosolfato, senza aggiungere l'indicatore ovvero, la salda d'amido, fino a colore giallo chiaro della soluzione.

A questo punto viene aggiunto l'indicatore e si prosegue con la titolazione fino a scomparsa della colorazione blu: la colorazione blu è data da un complesso d'adsorbimento dello iodio con la struttura a catena del β-amilosio, questi complessi possono essere non reversibili in presenza di grandi quantità di iodio, questo è il motivo per cui l'aggiunta della salda avviene verso la fine della titolazione.

Una volta standardizzato il tiosolfato si procede con la determinazione dell'acido ascorbico: si parte da circa 30 mL di H_2O distillata e abbiamo acidificato con 5 mL di H_2SO_4 1 M. in seguito si aggiunge circa 1 g di KI e si mescola fino a completa dissoluzione. Si aggiungono poi accuratamente 25 mL della soluzione campione e successivamente 25 mL della soluzione di KIO_3.

Per concludere si titola con tiosolfato, senza aggiungere l'indicatore fino a colore giallo chiaro della soluzione, solo in seguito si aggiunge la salda d'amido e si prosegue la titolazione fino a scomparsa della colorazione blu.

RISULTATI

4.1 Preparazione del sensore modificato con e-MIP

La superficie dell'elettrodo di lavoro della cella screen-printed è stata funzionalizzata con un e-MIP ottenuto per elettropolimerizzazione del pirrolo in presenza di Acido Ascorbico come molecola stampo. La polimerizzazione è stata condotta utilizzando la voltammetria ciclica.

Dal momento che il polipirrolo è un polimero conduttore si potrebbero presentare correnti di fondo alte e misure poco riproducibili. Per ovviare al problema, è stata condotta l'over-ossidazione del polipirrolo. L'over-ossidazione porta alla formazione di

gruppi chetonici nella catena del polipirrolo, quindi alla perdita della coniugazione e conseguentemente delle proprietà conduttive del polimero, ma senza una significativa perdita di materiale dalla superficie dell'elettrodo [47]; inoltre, si verifica un maggiore controllo dello spessore del film e le correnti di fondo sono decisamente stabili [48]. Dopo aver depositato l'e-MIP, l'analita viene rimosso dal polimero con tampone fosfato PBS 0.05 M/KCl 0.1 M a pH 7.

La stessa procedura di polimerizzazione e overossidazione è stata anche utilizzata per la preparazione di celle screen-printed modificate con e-NIP ovvero con un film polimerico ottenuto da soluzione di pirrolo senza l'aggiunta della molecola stampo, ottenendo così un polimero che non contiene cavità di riconoscimento per l'analita.

4.2 Caratterizzazione della superficie dell'elettrodo

La superficie attiva dell'elettrodo di lavoro è stata determinata utilizzando come probe elettrochimico $K_4Fe(CN)_6$. L'area viene calcolata sia per l'elettrodo bare che dopo la sua funzionalizzazione con il film polimerico di e-MIP e e-NIP.

È stata inoltre determinata la capacitanza del doppio strato del sensore, anche in questo caso sia sull'elettrodo bare che e-MIP ed e-NIP.

La prima misura effettuata è stata la determinazione della superficie elettroattiva; il valore ottenuto è stato poi confrontato con l'area geometrica. Per ottenere i valori della superficie elettroattiva, si riportano in grafico le intensità di corrente del picco anodico e catodico, ottenute dalle misure in voltammetria ciclica, in funzione della radice quadrata della velocità di scansione del potenziale. Dalla pendenza della retta, applicando l'equazione di Randles-Sevick adattata si ottiene l'area elettroattiva [Tab. 1].

Area attiva [mm^2]	
Bare	3.8(2)
e-MIP	2.4(2)
e-NIP	1.3(1)

Tab 1: valori di area attiva calcolata con l'equazione di Randles- Ševčík. Probe elettrochimico: 5mM $K_4Fe(CN)_6$/ 0.1 M KCl con un potenziale di scansione da -0.4 V a +0.6 V con velocità di scansione da 0.02 V/s a 0.5 V/s

I risultati ottenuti mostrano come, la presenza del film polimerico riduce la superficie attiva. Tale riduzione è meno spiccata per l'elettrodo ricoperto con e-MIP, il quale presenta cavità di riconoscimento per permettere all'analita di raggiungere la superficie dell'elettrodo. È invece più marcata nel caso dell'e-NIP, dal momento che sono assenti le cavità di riconoscimento e quindi risulta ridotta la capacità di trasferimento elettronico [48].

Per quanto riguarda la capacitanza del doppio strato, è stato ottenuto un valore di 0,50(3) µF per l'elettrodo non modificato, un valore relativamente basso rispetto a quello riportato per gli elettrodi in carbonio vetroso. Come precedentemente riportato, ciò può essere attribuito alla diversa struttura dell'inchiostro di grafite utilizzato per gli elettrodi screen-printed, caratterizzato da una composizione di base differente rispetto agli elettrodi in grafite pirolitica planare, che presentano una cinetica elettrochimica più rapida [49,50].

La capacità del doppio strato aumenta passando dall'elettrodo non modificato agli elettrodi funzionalizzati con e-NIP (1.52(6) µF) ed e-MIP (2.15(5) µF). Ciò indica che la presenza del polimero sulla superficie dell'elettrodo aumenta la possibilità di accumulo di cariche elettriche [48].

La caratterizzazione degli elettrodi non modificati e modificati è stata inoltre effettuata mediante misure di spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS). La Figura 11 mostra i diagrammi di Nyquist, in cui viene riportata l'impedenza immaginaria ($-Z_{im}$) in funzione dell'impedenza reale (Z_{re}) degli elettrodi non modificati e modificati.

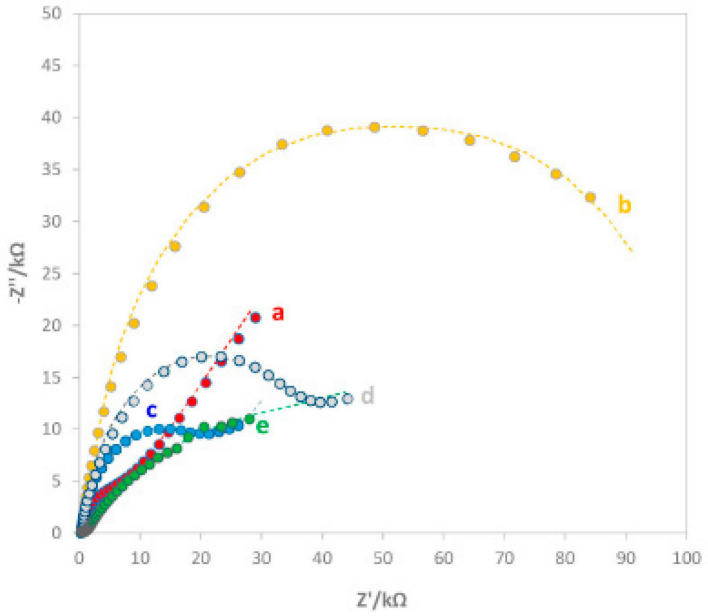


Fig. 11: Diagramma di Nyquist di: (a) elettrodo non modificato (bare), (b) elettrodo modificato con e-MIP, (c) elettrodo modificato con e-MIP dopo la rimozione del template, (d) elettrodo modificato con e-MIP dopo il rebinding con AA 3 mM, (e) elettrodo modificato con e-NIP. Le misure sono state effettuate in una soluzione di $K_4[Fe(CN)_6]$ 5 mM/KCl 0,1 M. L'intervallo di frequenza utilizzato è compreso tra 100 kHz e 10 mHz, con una modulazione sinusoidale del potenziale di 0,05 V sovrapposta a un potenziale continuo (DC) di 0,2 V [48].

Si può osservare che la presenza dei film polimerici ha influenzato il comportamento dell'impedenza della superficie dell'elettrodo sia nella regione delle alte frequenze sia in quella delle basse frequenze [Fig. 11]. L'elettrodo non modificato ha mostrato il valore più basso di R_{ct} (a), mentre gli altri elettrodi modificati con il film di polipirrolo overossidato hanno mostrato una maggiore resistenza al trasferimento di carica, indicando che, in seguito all'overossidazione, il polipirrolo ha perso le proprie proprietà conduttive.

Le curve (b) ed (e), corrispondenti rispettivamente all'e-MIP prima della rimozione del template e agli elettrodi modificati con e-NIP, hanno mostrato un comportamento simile. In questo caso, infatti, non si osserva un processo di diffusione di massa a causa dell'elevato valore di R_{ct} associato alla presenza dei film polimerici uniformi sulla superficie dell'elettrodo di lavoro.

Al contrario, le curve (c), (d) e (a), corrispondenti rispettivamente all'elettrodo modificato con e-MIP dopo la rimozione del template, allo stesso elettrodo dopo il

rebinding con una soluzione di AA 3 mM e all'elettrodo non modificato, presentano superfici dell'elettrodo di lavoro maggiormente esposte alla soluzione; per questo motivo, i processi di diffusione associati al trasferimento di massa risultano significativi.

I circuiti di Randles riportati nella Figura 12 schematizzano i due diversi comportamenti. In entrambi i circuiti, l'elemento R corrisponde alla resistenza della soluzione, R_{ct} rappresenta la resistenza al trasferimento elettronico, ovvero il diametro del semicerchio osservato nel diagramma di Nyquist, mentre C rappresenta la capacità del doppio strato. Il circuito di Randles riportato nella Figura 12(ii) comprende inoltre un elemento di Warburg, che rappresenta il contributo del processo limitato dalla diffusione di massa.

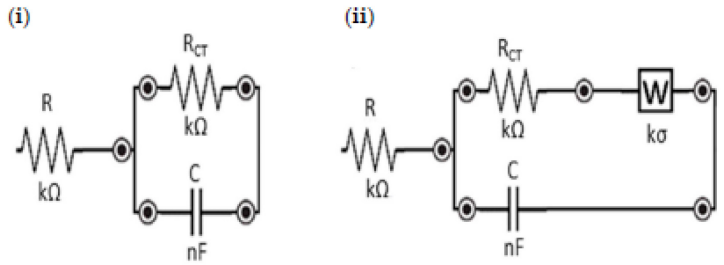


Fig. 12: Circuiti equivalenti di Randles utilizzati per il fitting dei diagrammi di Nyquist riportati in Figura 11: (i) elettrodo non modificato e elettrodo modificato con e-NIP; (ii) elettrodo modificato con e-MIP prima della rimozione del template, dopo la rimozione del template e dopo il rebinding con AA 3 mM [48].

Il parametro più significativo è R_{ct}: quanto maggiore è il suo valore, tanto più difficoltoso risulta il trasferimento di carica.

Il valore di R_{ct} dell'elettrodo modificato con e-MIP prima della rimozione del template è di circa 50 kΩ, quindi superiore a quello dell'elettrodo modificato con e-NIP (45 kΩ). Questo comportamento è probabilmente dovuto alla struttura più porosa dell'e-NIP, che consente alla sonda elettrochimica di raggiungere più facilmente la superficie dell'elettrodo [48].

I valori di R_{ct} aumentano quando l'analita occupa le cavità di riconoscimento dell'e-MIP, poiché le molecole rendono più difficile il raggiungimento della superficie dell'elettrodo da parte degli ioni.

I dati sperimentali confermano questa ipotesi [48]:

- elettrodo non modificato (bare) → curva (a): R_{ct} = 5,4 kΩ
- e-MIP dopo la rimozione del template → curva (c): R_{ct} = 20 kΩ
- e-MIP dopo il rebinding con AA 3 mM → curva (d): R_{ct} = 22 kΩ

4.3 Analisi quantitativa dell'acido ascorbico

Per l'analisi quantitativa dell'acido ascorbico sono state realizzate delle curve di calibrazione sia con elettrodo bare, che modificato con e-MIP ed e-NIP, in 10 mL di soluzione di tampone fosfato PBS 0.05 M/KCl 0.1 M a pH 7 aggiungendo concentrazioni crescenti di una soluzione standard di acido ascorbico a concentrazione nota.

Per valutare la riproducibilità del metodo, sono state realizzate più rette di calibrazione, in giorni differenti, utilizzando ogni volta un elettrodo diverso, prima con l'elettrodo bare e successivamente con quello modificato con e-MIP ed e-NIP.

4.3.*1 L'elettrodo bare*

Le rette di calibrazione sono state costruite variando le concentrazioni in un range compreso tra 0 µM e 5000 µM. La misura è stata ripetuta tre volte, per ogni concentrazione, così da poter valutare anche la ripetibilità.

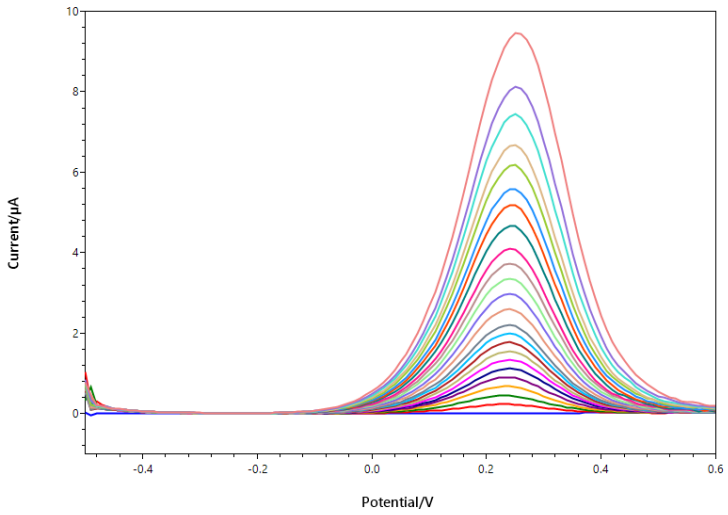


Fig 13: Voltammogramma dell'elettrodo bare in DPV registrato in una soluzione tampone di PBS 0.05 M/KCl 0.1 M a pH 7 ottenuto con concentrazioni crescenti di Acido Ascorbico nell'intervallo 0 – 5000 µM

Viene in seguito riportata un'unica retta comprendente tutti gli esperimenti eseguiti in giorni diversi con tutti gli elettrodi bare, i punti sono il risultato della media dei valori di corrente registrati dalle tre ripetizioni e le bande di errore derivano dalla deviazione standard associata ad ogni valore di concentrazione [Fig. 14].

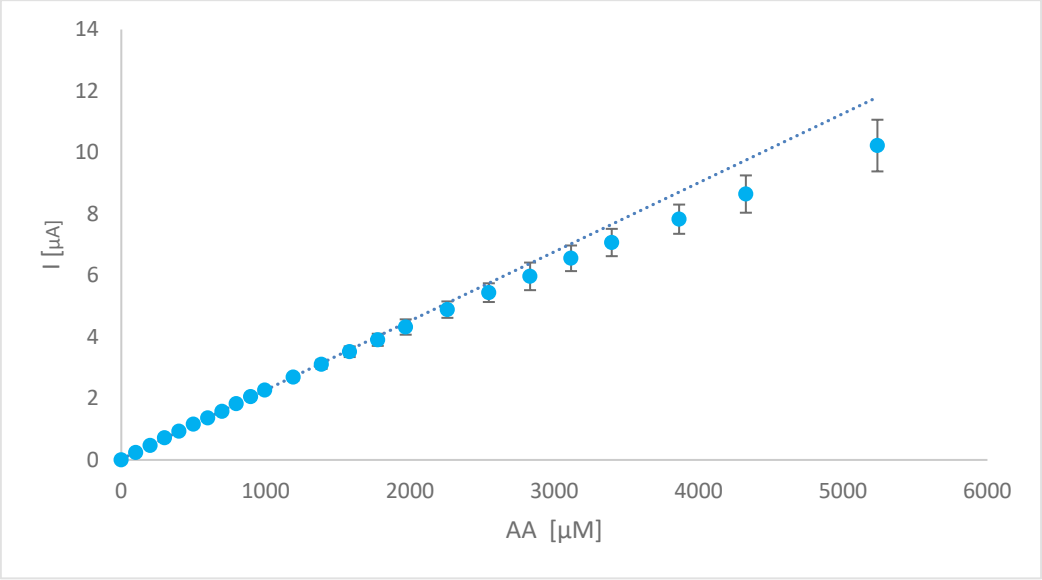


Fig. 14: Retta di calibrazione media contenente tutte le misure effettuate con gli elettrodi bare.

Confrontando le curve di calibrazione tra di loro non è emersa una grande variabilità del segnale per basse concentrazioni, mentre per quanto riguarda gli ultimi punti della retta si osserva una deviazione standard maggiore e quindi una minore riproducibilità.

Nella seguente tabella si riportano i valori delle cifre di merito per la quantificazione dell'acido ascorbico tramite elettrodo bare, calcolati come mostrato precedentemente nel paragrafo 2.5

	Elettrodo bare
Pendenza [µA · µM^{-1}]	2.26(1) ·10^{-3}
R^2	0.9997
Range lineare [µM]	100 - 1582
LOD [µM]	22
LOQ [µM]	65

Tab. 2: Cifre di merito del metodo.

4.3.*2 Elettrodi modificati: e-MIP ed e-NIP*

Concluso il trattamento dei dati riguardanti gli elettrodi bare, si è proseguito con gli e-MIP ed e-NIP: anche in questo caso sono state realizzate delle curve di calibrazione eseguendo delle misurazioni in DPV.

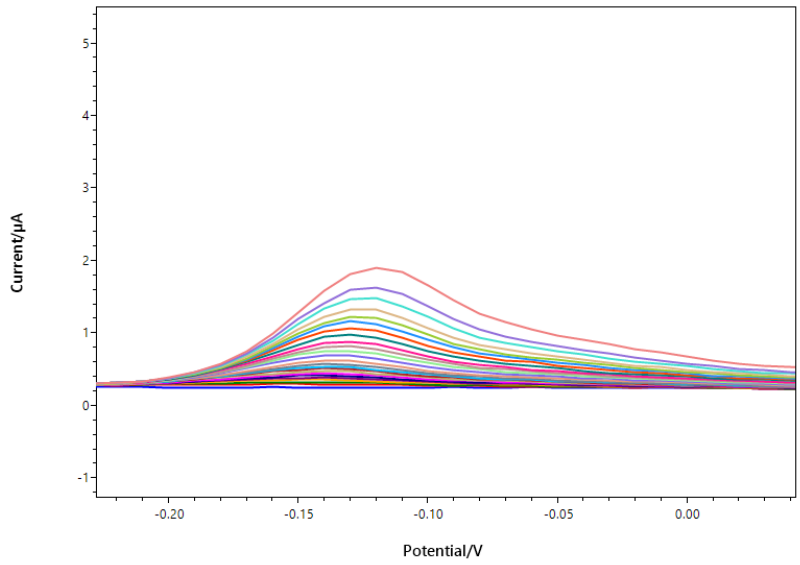


Fig 15: Voltammogrammi in DPV registrati in una soluzione tampone di PBS 0.05 M/KCl 0.1 M a pH 7 ottenuto con concentrazioni crescenti di Acido Ascorbico nell'intervallo 0 – 5000 µM Tramite analisi con elettrodo modificato con e-MIP

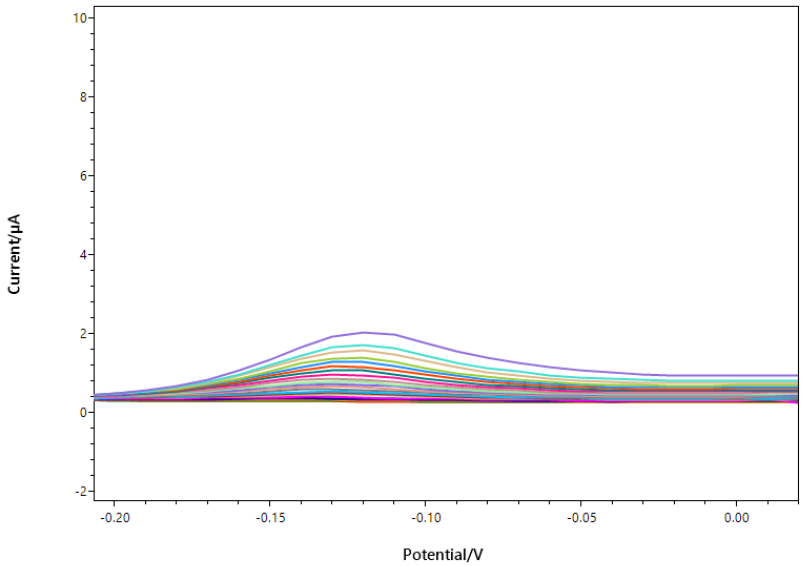


Fig 16: Voltammogrammi in DPV registrati in una soluzione tampone di PBS 0.05 M/KCl 0.1 M a pH 7 ottenuto con concentrazioni crescenti di Acido Ascorbico nell'intervallo 0 – 5000 µM tramite analisi con elettrodo modificato con e-NIP

Nelle figure 15 e 16 sono mostrati i voltammogrammi ottenuti con una cella screen-printed con elettrodo di lavoro modificato con e-MIP ed e-NIP variando la concentrazione di acido ascorbico nuovamente da 0 µM a 5000 µM.

La prima differenza che possiamo osservare è uno shift di potenziale del picco dell'analita che da 0.2 V del bare passa a -0.1 V con e-MIP: questo tornerà utile per l'analisi in presenza di interferenti.

Non si osserva un incremento della sensibilità, concentrazioni ben visibili con elettrodo bare diminuiscono l'intensità di corrente misurata, visibile confrontando le pendenze delle tre rette di calibrazione (bare, e-MIP, e-NIP).

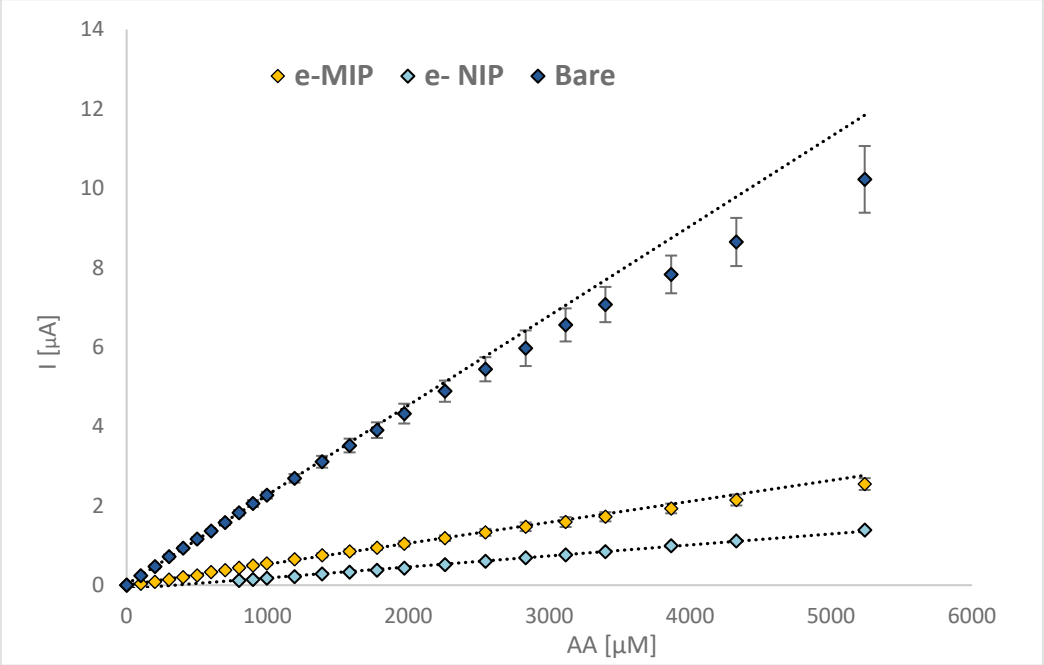


Fig. 17: Confronto tra le curve di calibrazione ottenute con l'elettrodo bare, l'elettrodo modificato con film di e-MIP e di e-NIP.

Sono state realizzate delle curve di calibrazione anche utilizzando l'elettrodo modificato con e-MIP ed e-NIP: possiamo osservare come le barre di errore diminuiscano utilizzando un elettrodo modificato e-MIP, migliorando quindi la riproducibilità.

È poi possibile osservare come la pendenza della curva di calibrazione ottenuta con e-NIP è molto più bassa rispetto a quella ottenuta tramite e-MIP e bare, a dimostrazione

che l'elettrodo è ricoperto da un film polimerico poco poroso che, in assenza delle cavità di riconoscimento, ostacola l'arrivo dell'analita alla superficie dell'elettrodo.

Infine, nella seguente tabella, si riportano i valori delle cifre di merito per la quantificazione dell'acido ascorbico tramite elettrodo funzionalizzato con film di e-MIP ed e-NIP.

	e-MIP	e-NIP
Pendenza [$\mu A \cdot \mu M^{-1}$]	$5.28(4) \cdot 10^{-4}$	$2.77(5) \cdot 10^{-4}$
R^2	0.9986	0.9950
Range lineare [µM]	100 - 2546	797 - 5238
LOD [µM]	100	340
LOQ [µM]	302	1030

Tab. 3: Cifre di merito del metodo

4.3.3 Selettività del metodo

Per valutare la selettività del metodo, sono stati effettuati dei test considerando alcuni potenziali interferenti: due zuccheri, glucosio e fruttosio; l'acido citrico presente nei succhi come conservante e correttore di acidità; l'acido gallico sfruttato per le sue capacità antiossidanti, spesso presente naturalmente più che aggiunto ai succhi; l'acido tartarico presente principalmente nel succo d'uva come conservante.

L'acido citrico non è elettroattivo nell'intervallo di scansione di potenziale in esame, poiché non presenta picchi di ossidazione o riduzione netti prima di 0.65V dove comincia a decomporsi. Come l'acido citrico, anche glucosio e fruttosio non sono elettroattivi nell'intervallo di potenziale interessato.

L'acido gallico e l'acido tartarico invece presentano picchi a valori di potenziali che si sovrappongono al picco di ossidazione dell'acido ascorbico.

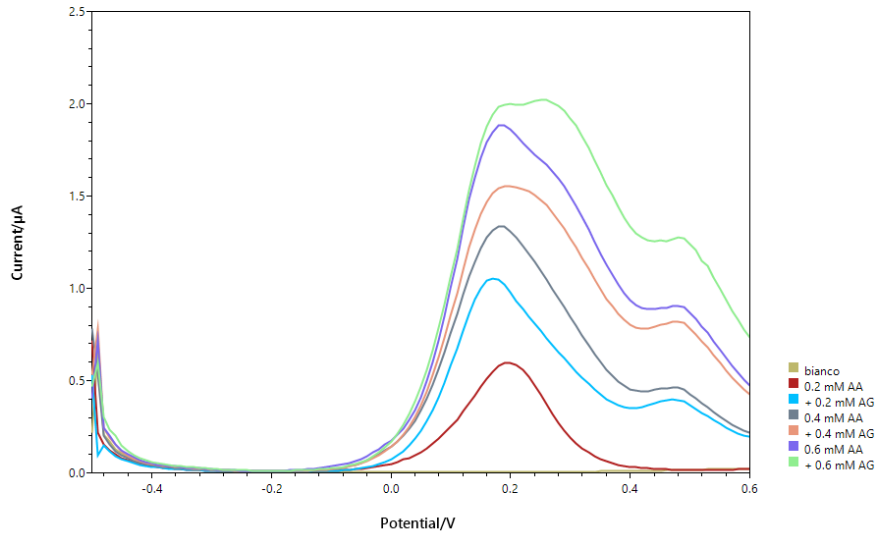


Fig 18: Voltammogramma dell'elettrodo bare in DPV registrato in una soluzione tampone di PBS 0.05 M/KCl 0.1 M a pH 7 ottenuto con concentrazioni crescenti di Acido Ascorbico e Acido Gallico nell'intervallo 0 – 600 µM di entrambe le sostanze per valutarne l'interferenza

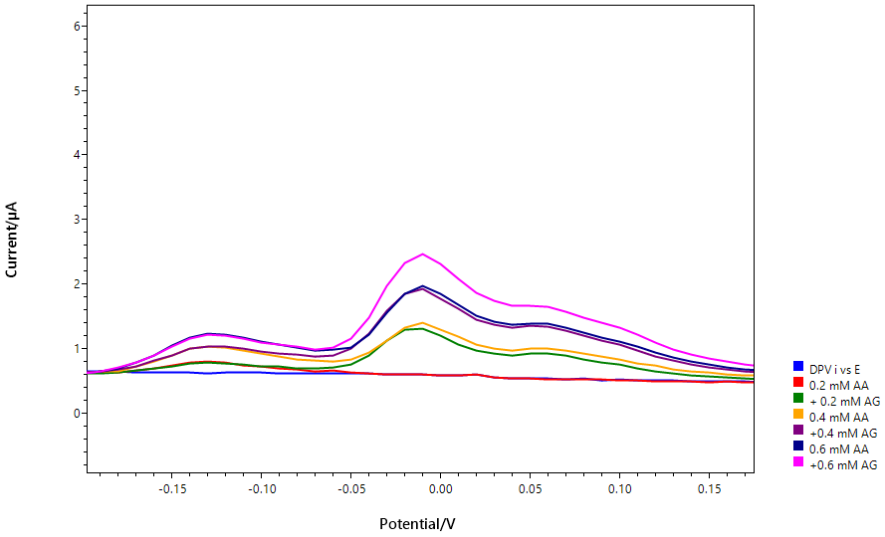


Fig 19: Voltammogramma dell'elettrodo modificato con e-MIP in DPV registrato in una soluzione tampone di PBS 0.05 M/KCl 0.1 M a pH 7 ottenuto con concentrazioni crescenti di Acido Ascorbico e Acido Gallico nell'intervallo 0 – 600 µM di entrambe le sostanze per valutarne l'interferenza

Come anticipato precedentemente, nel grafico appena riportato, è possibile osservare come lo shift di potenziale presente con elettrodo modificato e-MIP risolve il problema della sovrapposizione con l'interferente presente con elettrodo bare.

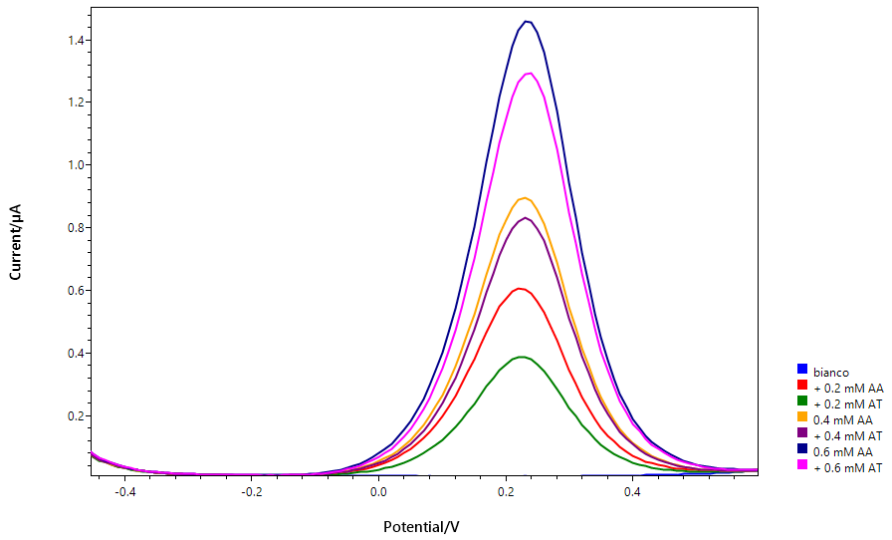


Fig 20: Voltammogramma dell'elettrodo bare in DPV registrato in una soluzione tampone di PBS 0.05 M/KCl 0.1 M a pH 7 ottenuto con concentrazioni crescenti di Acido Ascorbico e Acido Tartarico nell'intervallo 0 – 600 µM di entrambe le sostanze per valutarne l'interferenza

In questo caso si può osservare come l'acido tartarico causi un leggero assorbimento dell'acido ascorbico, visibile con una diminuzione del picco subito successivo all'aggiunta dell'acido tartarico [Fig. 20]. Il problema si risolve con l'elettrodo modificato dove il picco dell'acido tartarico sparisce completamente.

Possiamo quindi confermare che l'affinità delle cavità di riconoscimento per l'analita risulta decisamente maggiore, abbastanza da poterlo quantificare in presenza degli interferenti scelti, anche quando la concentrazione degli stessi è elevata.

Sono state in seguito effettuate delle prove di recupero con dei campioni simulati aggiungendo una quantità nota di analita e di interferenti a 10 mL di soluzione tampone di PBS 0.1M/KCl 0.1 M a pH 7.

Sono state preparate soluzioni acquose con concentrazioni differenti di interferenti e acido ascorbico in base alle concentrazioni note in letteratura [tab. 4]. Per svolgere l'analisi queste soluzioni sono state diluite di un fattore 10, di seguito in tabella 4 sono riportate le concentrazioni di interferenti aggiunte per ogni esperimento:

Arancia			*Limone*		
	conc iniziale [mM]	*conc diluita [mM]*		*conc iniziale [mM]*	*conc diluita [mM]*
Acido Ascorbico	8.2	0.8	***Acido Ascorbico***	7.3	0.7
Acido Citrico	20	2	***Acido Citrico***	105	11
Fruttosio	50	5	***Fruttosio***	26	2.6
Glucosio	25	2.5	***Glucosio***	24	2.4

Mela			*Uva*		
	conc iniziale [mM]	*conc diluita [mM]*		*conc iniziale [mM]*	*conc diluita [mM]*
Acido Ascorbico	16	1611	***Acido Ascorbico***	8.4	0.8
Acido Citrico	52	5205	***Acido Tartarico***	13	1.3
Fruttosio	2775	277531	***Fruttosio***	156	16
Glucosio	487	48662	***Glucosio***	145	14
Acido Gallico	$3 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-5}$	***Acido Gallico***	0.3	0.03

Tab 4: composizione delle matrici simulate

Arancia			*Mela*		
AA [mM] agg.	**AA [mM] e-MIP**	**%**	**AA [mM] agg.**	**AA [mM] e-MIP**	**%**
8.2	7.9	96	16.1	15.3	95
8.2	7.9	96	16.1	14.8	92
8.2	7.6	93	16.1	15	93

Limone			*Uva*		
AA [mM] agg.	**AA [mM] e-MIP**	**%**	**AA [mM] agg.**	**AA [mM] e-MIP**	**%**
7.3	7.6	105	8.4	7	84
7.3	6.8	94	8.4	8.8	105
7.3	6.5	89	8.4	8.4	100

Tab 5: Test di recupero eseguendo tre repliche per ogni campione simulato di succo con tre elettrodi modificati con e-MIP diversi.

I risultati riportati in tabella 5 mostrano i valori di recupero ottenuti dall'analisi delle matrici simulate: i recuperi ottenuti nel complesso sono compresi tra l'84% e il 105% mostrando una variabilità contenuta tra le diverse repliche. Tutti i risultati rientrano nell'intervallo 80 - 120% considerato accettabile per le analisi quantitative. I dati ottenuti sulle matrici simulate mostrano quindi una buona corrispondenza tra la concentrazione

di acido ascorbico aggiunta e quella determinata mediante l'elettrodo modificato e-MIP, anche in presenza degli interferenti introdotti nella matrice.

4.3.*4 Analisi in matrici fortificate*

Sono state effettuate delle prove di recupero aggiungendo una quantità nota di acido ascorbico questa volta direttamente nei succhi opportunamente diluiti in 10 mL di soluzione tampone: questo è stato fatto per verificare la funzionalità del metodo anche in matrici complesse.

Sono state utilizzate matrici fortificate e non tali e quali in quanto il trattamento termico dei succhi di frutta può influenzare significativamente il contenuto di acido ascorbico della matrice. L'acido ascorbico è infatti una vitamina termolabile e la sua degradazione aumenta all'aumentare della temperatura e del tempo di trattamento. Studi condotti su succhi d'arancia hanno evidenziato una progressiva diminuzione della concentrazione di acido ascorbico durante trattamenti termici compresi tra 70 e 90 °C, con una maggiore degradazione alle temperature più elevate [51,52]. Pertanto, i trattamenti di pastorizzazione, pur essendo necessari per garantire la sicurezza microbiologica e la stabilità del prodotto, possono determinare una parziale perdita di vitamina C [51,52].

Per svolgere le seguenti analisi i succhi d'arancia e limone sono stati diluiti 100 volte, per il succo di mela è stato utilizzato un fattore di diluzione pari a 20.

Arancia			***Mela***		
AA [mM] agg.	**AA [mM] e-MIP**	**%**	**AA [mM] agg.**	**AA [mM] e-MIP**	**%**
18	20	111	4.7	4	86
18	16	91	4.7	5.3	114
18	15	84	4.7	3.9	84

Limone		
AA [mM] agg.	**AA [mM] e-MIP**	**%**
20.2	19	94
20.2	16.6	82
20.2	20	99

Tab 6: Test di recupero eseguendo tre repliche per ogni succo utilizzando tre elettrodi modificati con e-MIP diversi.

I risultati ottenuti con le matrici fortificate sono riportati in tabella 6. Complessivamente, i valori di recupero risultano compresi tra l'81% e il 114% e rientrano quindi nell'intervallo 80 - 120% considerato accettabile per le analisi quantitative.

Nel complesso, i risultati mostrano che l'elettrodo modificato con e-MIP mantiene una risposta analitica adeguata anche nell'analisi di succhi di frutta fortificati, nonostante la presenza di componenti della matrice differenti rispetto alle soluzioni acquose simulate.

4.3.*5 Affidabilità del metodo: titolazioni iodometriche*

Per verificare anche l'affidabilità del metodo sono state eseguite delle misure effettuando titolazioni iodometriche: sia sui campioni simulati sia sulle matrici complesse fortificate.

Conc. [mM] titolazione	Conc. [mM] MIP
3.8	4.4
4.6	4.3
4.7	4.2

Tab 7: confronto delle concentrazioni ottenute tramite titolazione iodometrica ed elettrodo e-MIP, svolto su una soluzione preparata per pesata di 206 mg di Acido Ascorbico sciolto in 250 mL d'acqua

Per pima cosa è stato applicato un test F a due campioni per verificare l'uguaglianza delle varianze:

Test F a due campioni per varianze

	Conc. [mM] titolazione	*Conc. [mM] MIP*
Media	4.4	4.3
Varianza	0.2	0.01
Osservazioni	3	3
gdl	2	2
F	24.3	
P(F<=f) una coda	0.039	
F crtitico una coda	39	

Tab. 8: test F a due campioni per varianze

F_{sper} è minore di $F_{critico}$, per cui si può concludere che al livello di fiducia del 95% le precisioni non presentano una differenza statisticamente significativa.

La precisione, quindi, non varia significativamente al variare della concentrazione, permettendo di definire il sistema come omoschedastico.

Viene assunta l'uguaglianza tra varianze per il successivo confronto delle medie tramite test T.

Test t: due campioni assumendo uguale varianza

	Conc [mM] tit.	***Conc [mM] MIP***
Media	4.4	4.30
Varianza	0.2	0.01
Osservazioni	3	3
Varianza complessiva	0.13	
Differenza ipotizzata per le medie	0	
gdl	4	
Stat t	0.229	
P(T<=t) una coda	0.415	
t critico una coda	2.131	
P(T<=t) due code	0.830	
t critico due code	2.776	

Tab. 9: test T per il confronto tra medie assumendo uguale varianza

Dal momento che il $t_{cal} < t_{critico}$, al livello di fiducia del 95%, non è stata rilevata una differenza statisticamente significativa tra le concentrazioni medie ottenute con i due metodi; i risultati ottenuti indicano pertanto una buona concordanza tra il metodo elettrochimico basato sulla misurazione con e-MIP e la titolazione iodometrica nelle condizioni analizzate.

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stato sviluppato e valutato un sensore elettrochimico basato su un elettrodo screen-printed modificato con un polimero a stampo molecolare elettropolimerizzato (e-MIP) per la determinazione dell'acido ascorbico in succhi di frutta. La modifica della superficie dell'elettrodo mediante elettropolimerizzazione del pirrolo in presenza dell'acido ascorbico come molecola stampo ha permesso di ottenere un film polimerico dotato di siti di riconoscimento specifici per l'analita. Il successivo processo di over-ossidazione del polipirrolo ha consentito di ottenere una superficie con corrente di fondo stabile e adatta alle successive misure elettrochimiche.

La caratterizzazione elettrochimica ha permesso di valutare le modifiche della superficie dell'elettrodo in seguito alla formazione del film polimerico. In particolare, le misure di voltammetria ciclica hanno evidenziato una riduzione dell'area elettroattiva dell'elettrodo modificato rispetto al bare, coerente con la presenza del film polimerico sulla superficie. Le misure di spettroscopia di impedenza elettrochimica hanno inoltre mostrato un aumento della resistenza al trasferimento di carica dopo la formazione del film, mentre la rimozione della molecola stampo ha determinato una diminuzione di tale resistenza. Dopo il rebinding dell'acido ascorbico, la resistenza al trasferimento di carica è nuovamente aumentata, fornendo un'evidenza sperimentale della variazione delle proprietà di trasferimento elettronico associata all'occupazione dei siti di riconoscimento.

Per la determinazione quantitativa dell'acido ascorbico è stata utilizzata la voltammetria differenziale pulsata (DPV), sfruttando il processo di ossidazione dell'analita e il rispettivo picco a +0.2 V. Il confronto tra elettrodo bare, e-MIP ed e-NIP ha permesso di valutare l'effetto della modifica della superficie e del processo di imprinting sulla risposta analitica. I risultati hanno mostrato che l'impiego del e-MIP non è finalizzato principalmente all'aumento della sensibilità rispetto all'elettrodo non modificato, ma al miglioramento della selettività nei confronti dell'acido ascorbico. I test condotti in presenza di potenziali interferenti hanno infatti evidenziato una risposta associata all'analita, mentre i segnali attribuibili alle specie interferenti sono risultati assenti o sufficientemente separati dal segnale dell'acido ascorbico.

La valutazione delle prestazioni analitiche dell'e-MIP ha fornito un intervallo lineare compreso tra 100 e 2546 µM, con un limite di rilevabilità (LOD) di 100 µM e un limite di quantificazione (LOQ) di 302 µM. Il metodo è stato successivamente applicato a matrici simulate e a succhi di frutta fortificati con quantità note di acido ascorbico. Nelle matrici simulate sono stati ottenuti valori di recupero compresi tra 84% e 105%, mentre nei campioni di succo rinforzati i recuperi sono risultati compresi tra 81% e 114%. Tali risultati mostrano una buona corrispondenza tra le concentrazioni aggiunte e quelle determinate mediante l'e-MIP e indicano che il metodo mantiene una risposta analitica adeguata anche in matrici di composizione più complessa.

Un'ulteriore valutazione dell'affidabilità del metodo è stata effettuata mediante il confronto con la titolazione iodometrica. Le concentrazioni medie ottenute con i due approcci sono risultate pari a 4.4 mM mediante titolazione e 4.3 mM mediante e-MIP. Il test F non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra le varianze, mentre il successivo test t a due code, eseguito assumendo varianze uguali, non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra le due medie. Il confronto con la titolazione fornisce quindi un'ulteriore verifica della concordanza dei risultati ottenuti mediante il sensore e-MIP nelle condizioni investigate.

Nel complesso, i risultati ottenuti mostrano che l'approccio basato sull'elettrodo screen-printed modificato con e-MIP consente la determinazione elettrochimica dell'acido ascorbico con una procedura relativamente semplice e adatta all'analisi di matrici alimentari. La combinazione tra la portabilità degli elettrodi screen-printed, la rapidità della tecnica DPV e la presenza di siti di riconoscimento molecolare rende questo approccio interessante per lo sviluppo di sistemi elettrochimici destinati alla determinazione selettiva dell'acido ascorbico in matrici complesse. I risultati ottenuti costituiscono quindi una base per ulteriori studi volti all'ottimizzazione delle prestazioni analitiche e all'applicazione del sensore a un numero più ampio di campioni reali.

BIBLIOGRAFIA

1. *Pisoschi, A.M.; Pop, A.; Serban, A.I.; Fafaneata, C.H. Electrochemical methods for ascorbic acid determination. Electrochimica Acta 2014, 121, 443–460.*
2. *Cathcart, R.F. A unique function for ascorbate. Medical Hypotheses 1991, 35, 32–37.*
3. *Sies, H.; Stahl, W.; Sundquist, A.R. Antioxidant functions of vitamins: Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. Annals of the New York Academy of Sciences 1992, 669, 7–20.*
4. *Padayatty, S.J.; Katz, A.; Wang, Y.; Eck, P.; Kwon, O.; Lee, J.-H.; Chen, S.; Corpe, C.; Dutta, A.; Dutta, S.K.; Levine, M. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. Journal of the American College of Nutrition 2003, 22, 18–35.*
5. *Bradshaw, M.P.; Barril, C.; Clark, A.C.; Prenzler, P.D.; Scollary, G.R. Ascorbic acid: A review of its chemistry and reactivity in relation to a wine environment. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2011, 51, 479–498.*
6. *Pisoschi, A.M.; Cheregi, M.C.; Danet, A.F. Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: Electrochemical and spectrophotometrical approaches. Molecules 2009, 14, 480–493.*
7. *Pisoschi, A.M.; Danet, A.F.; Kalinowski, S. Ascorbic acid determination in commercial fruit juice samples by cyclic voltammetry. Journal of Automated Methods and Management in Chemistry 2008, 2008, 937651.*
8. *Saha, K. Electrochemical sensors for ascorbic acid detection. Biosensors 2023.*
9. *Taleat, Z.; Khoshroo, A.; Mazloum-Ardakani, M. Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008–2013). Microchimica Acta 2014, 181, 865–891.*
10. *González Diéguez, N.; Heras Vidaurre, A.; Colina Santamaría, Á. Espectroelectroquímica UV-Vis con electrodos serigrafiados. Estudio y determinación de neurotransmisores. Tesi di dottorato, Universidad de Burgos, 2017.*
11. *Ensafi, A.A.; Ahmadi, N.; Rezaei, B. Review on nanomaterials-enabled electrochemical sensors for ascorbic acid detection. Analytica Chimica Acta 2019, 113*
12. *Nesakumar, C.N.; Berchmans, S.; Alwarappan, S. Chemically modified carbon-based electrodes for the detection of reduced glutathione. Sensors and Actuators B: Chemical 2018, 264, 448–466. https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.224.*

13. *Tu, Y.-J.; Njus, D.; Schlegel, H.B. A theoretical study of ascorbic acid oxidation and HOO•/O_2•⁻ scavenging. Organic & Biomolecular Chemistry 2017, 15, 4417–4431.*

14. *Nimse, S.B.; Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Advances 2015, 5, 27986–28006.*

15. *Hu, I.-F.; Kuwana, T. Oxidative mechanism of ascorbic acid at glassy carbon electrodes. Journal of Electroanalytical Chemistry 1986, 58, 3235-3239*

16. *Kamaruzaman, S.; Nasir, N.M.; Mohd Faudzi, S.M.; Yahaya, N.; Mohamad Hanapi, N.S.; Wan Ibrahim, W.N. Solid-phase extraction of active compounds from natural products by molecularly imprinted polymers: Synthesis and extraction parameters. Polymers 2021, 13, 3780.*

17. *Vasapollo, G.; del Sole, R.; Mergola, L.; Lazzoi, M.R.; Scardino, A.; Scorrano, G.; Mele, G. Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective. International Journal of Molecular Sciences 2011, 12, 5908–5945.*

18. *Crapnell, R.D.; Hudson, A.; Foster, C.W.; Eersels, K.; van Grinsven, B.; Cleij, T.J.; Banks, C.E.; Peeters, M. Recent advances in electrosynthesized molecularly imprinted polymer sensing platforms for bioanalyte detection. Sensors 2019, 19, 1204.*

19. *Gonçalves, L.M. Electropolymerized molecularly imprinted polymers: Perceptions based on recent literature for soon-to-be world-class scientists. Current Opinion in Electrochemistry 2021, 25, 100640.*

20. *Unger, C.; Lieberzeit, P.A. Molecularly imprinted thin film surfaces in sensing: Chances and challenges. Reactive and Functional Polymers 2021, 161, 104855.*

21. *Sadki, S.; Schottland, P.; Brodie, N.; Sabouraud, G. The mechanisms of pyrrole electropolymerization. Chemical Society Reviews 2000, 29, 283–293.*

22. *Ramanavičius, S.; Morkvėnaitė-Vilkončienė, I.; Samukaitė-Bubnienė, U.; Ratautaitė, V.; Plikusienė, I.; Viter, R.; Ramanavičius, A. Electrochemically deposited molecularly imprinted polymer-based sensors. Sensors 2022, 22, 1282.*

23. *Kounaves, S.P. Voltammetric techniques. In: Settle, F.A., ed. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, NJ, 1997, pp. 709–726.*

24. *Gupta, V.K.; Jain, R.; Radhapyari, K.; Jadon, N.; Agarwal, S. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals. Analytical Biochemistry 2011, 408, 179–196.*

25. *Kurbanoglu, S.; Uslu, B.; Ozkan, S.A. Carbon-based nanostructures for electrochemical analysis of oral medicines. In: Nanostructures for Oral Medicine. Elsevier, 2017, pp. 885–938.*

26. *Biesuz, R.; Magnaghi, L.R. Trattamento dati e chemiometria. Appunti del corso, A.A. 2024–2025.*

27. *Florinel-Gabriel, B.; Marty, J.-L. Chemical Sensors and Biosensors. Wiley, 2008.*

28. *Eissa, S.; Zourob, M. Development of a low-cost cotton-tipped electrochemical immunosensor for the detection of E. coli O157:H7. Current Opinion in Food Science 2016.*

29. *Metters, J.P.; Kadara, R.O.; Banks, C.E. New directions in screen printed electroanalytical sensors: An overview of recent developments. Analyst 2011, 136, 1067–1076.*

30. *Dungchai, W.; Chailapakul, O.; Henry, C.S. Electrochemical detection for paper-based microfluidics. Chemical Society Reviews 2013, 42, 8478–8496.*

31. *Pingarrón, J.M.; Yáñez-Sedeño, P.; González-Cortés, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. Microchimica Acta 2010, 171, 1–19.*

32. *Sellergren, B. Molecularly imprinted polymers: Shaping enzyme inhibitors. Bioseparation 2001, 10, 353–364.*

33. *Haupt, K. Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. Analyst 2001, 126, 747–756.*

34. *Alexander, C.; Andersson, H.S.; Andersson, L.I.; Ansell, R.J.; Kirsch, N.; Nicholls, I.A.; O'Mahony, J.; Whitcombe, M.J. Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years 2004–2005. Analytica Chimica Acta 2006, 564, 2–13.*

35. *Malitesta, C.; Losito, I.; Zambonin, P.G. Molecularly imprinted electrosynthesized polymers: New materials for biomimetic sensors. Synthetic Metals 2003, 135–136, 785–786.*

36. *Li, Y.; Tan, C. Study on overoxidation of polypyrrole and its properties. Electrochimica Acta 1998, 43, 703–708.*

37. *Bard, A.J.; Faulkner, L.R. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, 2nd ed.; Wiley: New York, 2001.*

38. *Wang, J. Analytical Electrochemistry, 3rd ed.; Wiley-VCH: Hoboken, 2006.*

39. *Kissinger, P.T.; Heineman, W.R. Cyclic voltammetry. Journal of Chemical Education 1983, 60, 702–706.*

40. *Osteryoung, J.; Osteryoung, R. Square wave voltammetry. Analytical Chemistry 1985, 57, 101A–110A.*

41. *Barsoukov, E.; Macdonald, J.R. Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications, 2nd ed.; Wiley-Interscience: Hoboken, 2005.*

42. *Orazem, M.E.; Tribollet, B. Electrochemical Impedance Spectroscopy, 2nd ed.; Wiley, 2017.*

43. *Randviir, E.P.; Banks, C.E. Electrochemical impedance spectroscopy: An overview of bioanalytical, environmental and sensor applications. Analytical Methods 2013, 5, 1098–1115.*

44. *Lasia, A. Electrochemical Impedance Spectroscopy and Its Applications. Springer, 2014.*

45. *Ramanavicius, S.; Samukaite-Bubniene, U.; Ratautaite, V.; Bechelany, M.; Ramanavicius, A. Electrochemical molecularly imprinted polymer-based sensors for pharmaceutical and biomedical applications. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2022, 213, 114739.*

46. *Lazanas, A.C.; Prodromidis, M.I. Electrochemical impedance spectroscopy—A tutorial. ACS Measurement Science Au 2023, 3, 162–193.*

47. *Christensen, P.A.; Hamnett, A. In situ spectroscopic investigations of the growth, electrochemical cycling and overoxidation of polypyrrole in aqueous solution. Electrochimica Acta 1991, 36, 1263–1286.*

48. *Alberti, G.; Zanoni, C.; Magnaghi, L.R.; Biesuz, R. Ascorbic acid sensing by molecularly imprinted electrosynthesized polymer (e-MIP) on screen-printed electrodes. Chemosensors 2023, 11, 348.*

49. *Hsueh, C.; Brajter-Toth, A. Electrochemical preparation and analytical applications of ultrathin overoxidized polypyrrole films. Analytical Chemistry 1994, 66, 2458–2464.*

50. *Banks, C.E.; Compton, R.G. New electrodes for old: From carbon nanotubes to edge plane pyrolytic graphite. Analyst 2006, 131, 15–21.*

51. *Ağçam, E.; Şimşek Mertoğlu, T.; Ağaçdam, E. Kinetic study for ascorbic acid degradation, hydroxymethylfurfural and furfural formations in orange juice. Journal of Food Composition and Analysis 2021, 102, 103996.*

52. *Vikram, V.B.; Ramesh, M.N.; Prapulla, S.G. Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. Journal of Food Engineering 2005, 69, 31–40.*

53. *Petruzzi, L.; Campaniello, D.; Speranza, B.; Corbo, M.R.; Sinigaglia, M.; Bevilacqua, A. Thermal treatments for fruit and vegetable juices and beverages: A literature overview. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2017, 16, 668–691.*