



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

**SENSORISTICA APPLICATA IN
ENOLOGIA
APPLIED SENSORISTIC IN OENOLOGY**

TIPO TESI: compilativa

Studente:

Antonio Damiani

Relatore:

PROF.SSA ESTER FOPPA PEDRETTI

Correlatore:

PROF.SSA DEBORAH PACETTI

DOTT.SSA ANCUTA NARTEA

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

Questa tesi è dedicata a mia nonna Flavia.

SOMMARIO

SOMMARIO	3
ELENCO DELLE TABELLE.....	6
ELENCO DELLE FIGURE	7
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	8
RIASSUNTO DELLA TESI	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	11
MATERIALI E METODI	13
CAPITOLO 1 TIPI DI SENSORI UTILIZZABILI IN ENOLOGIA: GENERALITÀ SUI SENSORI E PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO	14
1.1 Generalità sui sensori.....	14
1.1.1 Sensori e trasduttori	14
1.2 Vantaggi derivati dall'uso della sensoristica in campo enologico	15
1.3 Configurazione base di un sistema sensoriale.....	15
1.4 Classificazione dei sensori.....	16
1.4.1 Sensori chimici	16
1.4.2 Sensori fisici	17
1.4.3 Sensori biologici	17
1.4.4 Sistemi multisensoriali.....	19
1.5 Principi di funzionamento dei sensori.....	23
1.5.1 Amperometria	23
1.5.2 Potenzimetria	24
1.5.3 Conduttometria	24
CAPITOLO 2 ACIDI ORGANICI NEI VINI: ANALISI DEI PRINCIPALI ACIDI ORGANICI DEL VINO E DEI MOSTI	25
2.1 Generalità sugli acidi organici nel vino	25
2.2 Metodi tradizionali di determinazione degli acidi organici e dell'acidità di un vino..	27

2.2.1 Acidità totale.....	27
2.2.2 Acidità volatile.....	27
2.2.3 Acidità fissa	28
2.2.4 Determinazione degli acidi organici	28
2.3 Sensori per la determinazione degli acidi organici nei mosti e nei vini.....	28
2.3.1 Sensori per la determinazione dell'acido acetico.....	28
2.3.2 Sensori per la determinazione dell'acido malico	31
2.3.3 Sensori per la determinazione dell'acido lattico	34
2.3.4 Sensori per il rilevamento dell'acido citrico	36
2.3.5 Sensori per la determinazione dell'acido tartarico.....	37
2.3.6 Sensori per la determinazione dell'acidità titolabile.....	37
CAPITOLO 3 ALCOLI E ALTRE SOSTANZE VOLATILI: ANALISI DELL'ETANOLO, METANOLO E DELLE PRINCIPALI SOSTANZE VOLATILI DEL VINO E DEI MOSTI.....	39
3.1 Etanolo	39
3.1.1 Generalità sull'etanolo: provenienza e composizione chimica.....	39
3.1.2 Norme per l'indicazione del titolo alcolometrico	40
3.1.3 Importanza della determinazione dell'alcol	40
3.1.4 Metodi tradizionali di determinazione dell'alcol	41
3.1.5 Sensoristica per la determinazione dell'etanolo.....	42
3.1.6 Biosensori enzimatici per la determinazione dell'alcol	42
3.1.7 Biosensori microbici per la determinazione dell'etanolo	43
3.1.8 Sensori fisico chimici per la determinazione dell'etanolo	44
3.1.9 Sensori fisici per la determinazione dell'alcol etilico	46
3.2 Metanolo	47
3.2.1 Generalità sull'etanolo: provenienza e composizione chimica.....	47
3.2.2 Importanza della determinazione del metanolo.	47
3.2.3 Sensore per la determinazione del metanolo.....	48
3.3 Alcoli superiori.	49
3.3.1 Generalità sugli alcoli superiori e metodi tradizionali di determinazione.	49
3.3.2 Sensore amperometrico per la determinazione dell'alcol isoamilico	50
3.4 Glicerolo	51
3.4.1 Generalità sul glicerolo e sua determinazione con metodi tradizionali	51
3.4.2 Sensori per la determinazione del glicerolo.....	52
3.96 µM.....	54
CAPITOLO 4 COMPOSTI FENOLICI: ANALISI DEI POLIFENOLI	55

4.1 Generalità sui composti fenolici	55
4.2 Metodi tradizionali di determinazione dei polifenoli.....	56
4.3 Biosensori per la determinazione dei polifenoli nel vino.....	57
4.3.1 Sensori chimici ad ossidazione diretta dei composti fenolici sull'elettrodo	57
4.3.2 Biosensori enzimatici per la determinazione dei composti fenolici.....	59
4.3.3 Determinazione dei polifenoli per azione biomimetica dei nanomateriali	60
CAPITOLO 5 DIFETTI DEL VINO E SOSTANZE PERICOLOSE.....	62
5.1 Difetti del vino dovuti alle interazioni microbiche	62
5.1.1 Lingua elettronica per il simultaneo rilevamento di difetti del vino rosso	62
5.1.2 Difetti dovuti a Brettanomyces	63
5.1.3 Difetti dovuti a batteri lattici e Acetobacter.....	64
5.1.4 Rilevamento di Botritis cinerea	64
5.2 Sostanze tossiche nel vino provenienti dal metabolismo dei microrganismi.....	65
5.2.1 Generalità sull'ocratossina A e metodi tradizionali di rilevamento.....	65
5.2.2 Generalità sulle ammine biogene e metodi tradizionali di rilevamento.....	66
5.2.3 Sensori per la quantificazione delle ammine biogene nel vino.....	67
CAPITOLO 6 ANIDRIDE SOLFOROSA	69
6.1 Generalità sull'anidride solforosa e metodi tradizionali di quantificazione.	69
6.1.1 Metodi tradizionali di determinazione della SO ₂	69
6.2 Sensori per la determinazione della solforosa.....	70
6.2.1 Sensori elettrochimici per la determinazione dell'anidride solforosa libera e totale	70
6.2.2 Sensori ottici per la determinazione della solforosa nei vini	72
CAPITOLO 7 APPLICAZIONE DEI SENSORI NEL PROCESSO DI VINIFICAZIONE	74
7.1 Processo di vinificazione: vantaggi e applicazioni dei sensori durante la fase produttiva.....	74
7.1.1 Monitoraggio della fermentazione alcolica	76
7.1.2 Monitoraggio della fermentazione malolattica.	76
7.1.3 Monitoraggio della macerazione.....	77
7.1.4 Monitoraggio dei principali difetti del vino e delle sostanze tossiche.	78
7.1.5 Monitoraggio della solfitazione.	79
CONCLUSIONI	81
SITOGRAFIA	83
BIBLIOGRAFIA	84

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1-Proprietà dei biosensori per la determinazione del malato	32
Tabella 2-Sensori per la determinazione dell'acido malico che usano la malato deidrogenasi come trappola enzimatica.....	33
Tabella 3-Sensori per la determinazione degli alcoli.....	54

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1- Schematizzazione del metodo di misurazione utilizzando lingue e nasi elettronici [7].....	21
Figura 2-Naso elettronico proposto da Gamboa et al. sulla sinistra si vede il sistema relazionato alle dimensioni, a destra invece abbiamo la scheda principale con i sensori 6 sensori MOS.....	31
Figura 3- Spaccato del sensore ultrasonico: 1) trasduttore, 2) zona cuscinetto, 3) anello in acciaio inox, 4) corpo cilindrico, 5) riflettore d'onda, 6) trasduttore di temperatura [40].....	35
Figura 4-Principio di funzionamento del sensore ultrasonico [40].....	36
Figura 5- diagramma del sensore; a) elettrodo di lavoro; b) elettrodo di riferimento; c) elettrodo ausiliario; d) cella elettrochimica; e) monitor; f) bottone per la misurazione; g) bottone per aggiustamento dello zero; h) coperchio in acciaio inossidabile [42]	38
Figura 6-Formula chimica dell'etanolo.....	39
Figura 7- Spettrofotometro a infrarossi ALCOQUICK 4000	44
Figura 8- Sezione del sensore fotonico e sua struttura interna [23].....	45
Figura 9- Spaccato del sensore: (a) corpo dell'idrogel dopo la sintesi senza lo spaziatore in silicone, (b) corpo dell'idrogel con spaziatore in silicone.	46
Figura 10- Sensore sviluppato da Sebastian Abegg, Leandro Magro, Jan van den Broek, Sotiris E. Pratsinis and Andreas T. Güntne [25]	48
Figura 11 - Principio di ritenzione ed eluizione delle molecole di metanolo ed etanolo da parte delle particelle di Tenax [25]	49
Figura 12-Principali composti fenolici monomerici del vino	56
Figura 13-Lingua elettronica Astree Alpha MOS.....	63
Figura 14-Sensore basato sul chip modificato con polianilina [59].....	70
Figura 15- a) apparato necessario per il metodo Rankine, b) strumento Rankine miniaturizzato [59].....	71
Figura 16-Sensore sviluppato da Fukana et al. basato sulla microfluidica su carta [60] ..	72
Figura 17-Diagramma di flusso della vinificazione in bianco e in rosso.....	75

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

NIR	Near infrared region
MOS	Metal-oxide semiconductor.
DBBQ	3,5-di-t-butyl-1,2-benzochinone
OTA	Ocratossina A
μ PADS	Microfluidic paper-based analytical device
OMS	Organizzazione mondiale della sanità
OIV	Office internationale de la vigne e du vin

RIASSUNTO DELLA TESI

Le analisi dei principali analiti del vino durante il processo di vinificazione sono generalmente affidate a laboratori esterni a causa dei metodi tradizionalmente utilizzati nella loro determinazione, come gas cromatografia e spettrofotometria o ancora tramite metodi ebullioscopici e densimetrici, che richiedono l'utilizzo di reagenti costosi e personale qualificato nonché di un investimento iniziale molto alto, che ne giustifica l'acquisto solo nel caso di un intenso utilizzo. Durante il processo di vinificazione però l'enologo necessita di monitorare costantemente alcuni parametri, in particolar modo, durante la fermentazione/macerazione alcolica, la fermentazione malolattica, l'affinamento e il controllo qualitativo, con esami di routine. I sensori rappresentano uno strumento economico, rapido e affidabile nell'analisi dei principali composti chimici nel vino, garantendo gli standard di affidabilità e robustezza che un impiego per il monitoraggio del processo industriale richiede. Questa tesi vuole analizzare ed evidenziare le diverse applicazioni in enologia dei sistemi sensoristici che possiedono le caratteristiche necessarie per un reale impiego nel monitoraggio dei principali analiti, la cui analisi periodica è soggetta a esternalizzazione presso laboratori di analisi, come, ad esempio, i principali alcoli, gli acidi organici, i polifenoli e le molecole responsabili dei principali difetti dei vini. In questo modo viene creata una panoramica delle tecnologie sensoristiche attualmente disponibili per ogni analita senza dare particolare evidenza a singole classi di sensori. Dalla ricerca si evince che l'uso di nanomateriali e materiali compositi hanno giocato un ruolo di primaria importanza nell'implementazione della capacità di rilevamento dei sensori, incrementandone la sensibilità e la selettività. Il miglioramento e l'utilizzo di tecniche chemometriche, nell'elaborazione dei dati grezzi, hanno permesso un ulteriore passo avanti nella rilevazione tramite sensori, permettendo il riconoscimento degli analiti attraverso l'elaborazione dei dati e dei pattern di risposta tipici dei singoli analiti, riducendo il bisogno di elementi selettivi nella costituzione del sensore. Il panorama sensoristico risulta ancora acerbo per quanto riguarda un potenziale utilizzo industriale, necessitando di maggiore letteratura riguardante le comparazioni con metodi tradizionali di analisi e applicazione reale nel campo industriale, provvedendo la validazione necessaria per la commercializzazione, di quelli che altrimenti rimarranno solo prototipi.

ABSTRACT

The analyzes of the main wine analytes during the winemaking process are generally outsourced to external laboratories due to the methods traditionally used in their determination, such as gas chromatography and spectrophotometry or even through ebullioscopy and densiometric methods. This analysis requires the use of expensive reagents, qualified personnel as well as a very high initial investment, which justifies the purchase only in the case of intensive use. During the winemaking process, however, the oenologist needs to constantly monitor certain parameters, especially during alcoholic fermentation / maceration, malolactic fermentation, refinement and quality control, with those that become routine tests. Sensors represent an inexpensive, fast and reliable tool in the analysis of the main chemical compounds in wine, meeting the standards of reliability and robustness that a use for monitoring the industrial process requires. This thesis aims to analyze and highlight the different applications in oenology of sensor systems that possess the characteristics necessary for a real use in the monitoring of the main analytes, whose periodic analysis is subject to outsourcing to analysis laboratories, such as, for example, the main alcohols, organic acids, polyphenols and molecules responsible for the main defects in wines. In this way, an overview of the sensor technologies currently available for each analyte is created without emphasizing any sensor classes. This research shows that the use of nanomaterials and composite materials have played a primary role in implementing the detection capability of the sensors, increasing their sensitivity and selectivity. The improvement and use of chemometric techniques, in the processing of raw data, have allowed a further step forward in detection through sensors, allowing the recognition of the analytes through the processing of data and response patterns, reducing the need for highly selective elements during the design phase. The sensor's landscape is still immature as regards a potential industrial use, requiring more literature regarding comparisons with traditional methods of analysis and real application in the industrial field, providing the validation necessary for the commercialization of those that would otherwise remain only prototypes.

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Durante le varie fasi di vinificazione sono necessarie analisi chimiche e microbiologiche periodiche che generalmente vengono fatte utilizzando tecniche analitiche tradizionali come separazioni cromatografiche, spettrometrie di massa, titolazioni o ancora spettrofotometrie. Tutte tecniche che necessitano di un operatore altamente specializzato nonché ingenti investimenti iniziali per l'acquisto di tali strumentazioni e dei reagenti necessari per il loro utilizzo. L'insieme di questi fattori ha reso l'utilizzo di queste tecniche economiche solo per laboratori specializzati che riescono a giustificarne l'impiego effettuando analisi per l'industria delle bevande. L'uso dei sensori è invece una tecnica analitica innovativa che permette una veloce identificazione dei parametri più rappresentativi sia durante varie fasi del processo di vinificazione, sia durante i processi di certificazione e verifica qualitativa per valutare la sanità del prodotto, ma anche per monitorare e determinare lo stato di conservazione dei prodotti e la durata della stessa. Queste nuove tecniche analitiche sono attraenti per le aziende operanti nel settore vitivinicolo dato che presentano diversi vantaggi: non richiedono personale altamente specializzato per il loro utilizzo e sono economicamente più accessibili rispetto agli strumenti maggiormente utilizzati nelle tecniche analitiche tradizionali. Permettono quindi un monitoraggio in tempo reale durante le fasi più delicate del processo di produzione, consentendo interventi tempestivi eliminando eventuali ritardi dovuti al tempo necessario per effettuare le analisi in modo tradizionale o per ricevere il risultato delle analisi da laboratori terzi, risultando nell'ottimizzazione dell'intervento enologico.

Le tecnologie legate ai sensori sono dunque più sostenibili economicamente rispetto alle tecniche analitiche tradizionali e soprattutto sono in grado di ridurre il tempo e il costo delle analisi, riducendo allo stesso tempo anche le perdite di prodotto dovute al campionamento poiché non viene perso o alterato il campione durante l'analisi. Tutti questi fattori rendono interessanti l'uso della sensoristica nell'industria vitivinicola per le realtà che cercano un approccio analitico che riduca il tempo, il costo delle analisi e la perdita di materiale, nonché la possibilità di instaurare un processo analitico basato sulla creazione di banche dati virtuali per il miglioramento della gestione produttiva e aziendale.

I sensori comprendono una vasta gamma di strumenti di analisi e possono essere classificati in base al loro principio di funzionamento o al tipo di “out-put” che generano. Generalmente vengono classificati in base ai parametri fisico chimici che misurano, il che permette una classificazione che porta all’ottenimento di 3 macrocategorie di sensori: i sensori fisici, i sensori chimici e i sensori biologici.

La tendenza negli ultimi anni è quella di utilizzare sistemi multisensoriali che a differenza dei sensori tradizionali, come ad esempio quelli biologici, permettono l’identificazione e quantificazione di più analiti contemporaneamente. Un esempio di dispositivo multisensoriale possono essere i nasi elettronici e le lingue elettroniche che utilizzano diversi principi di funzionamento come ad esempio: potenziometria, conduttimetria e voltammetria. I principi di funzionamento tra i nasi elettronici e le lingue elettroniche sono simili, differendo però nell’insieme sensoristico specifico utilizzato per l’analisi dei gas del naso elettronico.

Lo scopo di questa tesi è quindi quella di analizzare ed evidenziare le diverse applicazioni in enologia dei sistemi sensoristici con particolare enfasi sui principali composti analizzabili nel processo di vinificazione e in quali parti del processo possono essere effettuate le misurazioni, e una comparazione rispetto alle tecniche tradizionali.

MATERIALI E METODI

Per la stesura di questa tesi sono analizzati 115 articoli di cui 60 sono stati selezionati e utilizzati come fonti. Come piattaforme sono state utilizzate prevalentemente Science direct, ACS publication, Google scholar, MDPI, Journal of Sensors and Sensor Systems e IOPscience. Gli articoli relativi ai sensori sono stati poi successivamente selezionati in base a diversi parametri quali; la selettività del sensore, la sensibilità del sensore, la reperibilità dei materiali necessari alla costruzione del sensore, i tempi di risposta e la stabilità nel tempo. Un'altra discriminante utilizzata nella selezione degli articoli è stata la data di pubblicazione, preferendo analizzare articoli il più recenti possibile considerando il 2021 come anno più recente.

Capitolo 1

TIPI DI SENSORI UTILIZZABILI IN ENOLOGIA: GENERALITÀ SUI SENSORI E PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO

1.1 Generalità sui sensori

La parola “sensore” deriva dal latino “sensus”, ossia sentire, percepire”. È un dispositivo a diretto contatto con il sistema da misurare e, interagendo con la grandezza presente e con l’ambiente circostante, ne percepisce le variazioni [2]. Per il Vocabolario Internazionale di Metrologia, la scienza che si occupa delle misurazioni e delle corrette procedure da applicare durante le stesse, i sensori sono: “elementi di un apparato di misura che è direttamente influenzato dal fenomeno, dal corpo o dalla sostanza che propongono la grandezza che deve essere misurata”.

1.1.1 *Sensori e trasduttori*

Il sensore avverte in tempo reale le variazioni della grandezza che deve misurare e con cui interagisce direttamente, non provocando un cambiamento, in fase di output, della “natura” della grandezza misurata. Da qui la differenza con i trasduttori, parola che deriva da “transducere” che invece significa trasportare, portare al di là, e che sono dispositivi usati nelle misurazioni che prevedono la produzione di una quantità di output correlata alla quantità di input rilevata [2]. Le due parole sono spesso utilizzate nella descrizione degli apparati di misura come sinonimi. L’uso delle parole corrette però è di vitale importanza nel settore scientifico e utilizzare parole sbagliate può portare a fraintendimenti e ambiguità diminuendo la precisione della lingua. Il sensore può quindi essere definito come un trasduttore di misura, cioè un dispositivo impiegato in una misurazione che fornisce una grandezza in uscita e che ha una relazione specificata con la grandezza d’ingresso. La differenza tra i due è meglio esposta dal loro funzionamento: il sensore serve per misurare la variazione del valore della grandezza “in ingresso” nel sistema di controllo in cui è inserito, il trasduttore invece deve convertire questa variazione in un nuovo segnale più facilmente elaborabile “in uscita”. I sistemi di raccolta dati, quindi, sono formati dal sensore che interagisce con il substrato effettuando una misurazione che viene poi inviata al trasduttore che converte la misurazione

effettuata dal sensore in un segnale interpretabile da un computer per la visualizzazione e l'immagazzinamento dei dati. [2 [5]]

Il sensore, interagendo con il fenomeno da misurare, causa una variazione delle proprietà (per esempio, la resistenza elettrica) della grandezza stessa che viene quindi resa misurabile. Viene spesso usato anche come sinonimo di rilevatore o detector, che per il vocabolario di metrologia è invece: “dispositivo o sostanza che indica la presenza di un fenomeno quando viene superato il valore soglia di una grandezza”. Il sensore agisce anche sotto il valore soglia e misura in ingresso la grandezza; quindi, acquisisce l'informazione rilevante per lo strumento terminale (es. un display) a cui è collegato o per i sistemi di regolazione e controllo in cui è inserito.

1.2 Vantaggi derivati dall'uso della sensoristica in campo enologico

Il vino durante il processo di vinificazione richiede un monitoraggio costante, che normalmente viene effettuato attraverso analisi microbiologiche e chimiche che vengono eseguite con i metodi tradizionali come la cromatografia, la spettrometria di massa, le titolazioni, analisi dispendiose in termini di tempo e denaro [1]. Utilizzare i sensori significa avere la possibilità di effettuare delle misurazioni accurate, tempestive e costanti senza la perdita del campione e con costi inferiori rispetto a quelle tradizionali. Permettono inoltre di avere a disposizione una grande quantità di dati che possono essere elaborati per ottimizzare processi, risorse, servizi, trovando applicazione anche nell'Internet of Things (IoT), ossia oggetti interconnessi che scambiano dati tra loro e con l'ambiente circostante. Questo per l'industria enologica si traduce nel prevenire difetti organolettici (manutenzione predittiva), aumentare la sicurezza, monitorare in tempo reale ambienti e processi, evitare sprechi di energia e risorse, riuscire a garantire standard elevati di qualità di prodotto e di processo. I sensori consentono inoltre di costruire database fondati sullo storico delle misurazioni effettuate, banche dati che possono essere consultate fornendo uno strumento di supporto strategico decisionale e possono inoltre essere integrati con tecnologie blockchain in modo da implementare la tracciabilità di prodotti e dati ad essi collegati, conservandoli in un registro digitale incorruttibile. [1] [4] [5]

1.3 Configurazione base di un sistema sensoriale

I sensori presi in considerazione per l'applicazione in senso enologico sono, quindi, dei dispositivi in grado di analizzare composti presenti in campioni liquidi e gassosi. La configurazione di questi sistemi, tenendo in considerazione lo scopo di questa tesi, è molto

simile e può essere sintetizzato come un sistema a blocchi composto dal sensore stesso, ossia il materiale che interagisce direttamente con l'analita, il trasduttore, che converte la misurazione della quantità in un segnale analogico o digitale e il personal computer, ossia il terminale che riceve il segnale dal trasduttore e ne permette la visualizzazione, accumulo ed elaborazione. Il computer può essere sia un PC fisico con tastiera e monitor sia un singolo chip collegato allo stesso circuito dell'apparato di misurazione a seconda di come è ingegnerizzato il sistema di analisi. [1][2]

1.4 Classificazione dei sensori

La classificazione dei sensori può essere eseguita in diversi modi. Un tipo di classificazione si basa sui parametri fisico-chimici che vengono misurati e che porta alla divisione dei sensori in tre categorie: sensori chimici, sensori fisici e sensori biologici. Un altro sistema di classificazione prevede la divisione in sistemi multisensoriali e "tradizionali". I primi sono congegni che possono identificare più analiti contemporaneamente come, ad esempio, i nasi e le lingue elettroniche; invece, quelli tradizionali possono analizzare solo un analita alla volta, come ad esempio i sensori chimici.[1] In realtà i nasi e le lingue elettroniche hanno la capacità di analizzare simultaneamente più composti perché spesso il loro sistema sensoriale è formato da un insieme detto "array" di singoli sensori che presentano principi di funzionamento diverso e analizzano singoli composti o molecole, ma che nel complesso dello strumento permettono di ottenere misurazioni di diversi parametri allo stesso tempo.

1.4.1 Sensori chimici

"I sensori chimici sono un sistema in grado di trasformare un'informazione chimica, che va dalla concentrazione di un singolo componente specifico del campione in analisi alla concentrazione di tutti i componenti dell'intera matrice, in un segnale analiticamente utile." Questa è la definizione IUPAC di sensore chimico. Questa categoria di sensori può essere suddivisa in due categorie [a]:

- Sensori selettivi a lettura diretta come sensori elettrochimici, fibre ottiche e sensori che contengono una fase iniziale di separazione cromatografica su colonna del campione.
- Elettroforetica capillare seguita da una rivelazione sensibile ma non esclusivamente selettiva.

La caratteristica comune ed indispensabile di tutti i sensori chimici è l'esistenza di un efficace processo di interazione dei confronti dell'analita di interesse che deve essere legato in maniera

selettiva veloce stabile e reversibile. A questo proposito un sensore chimico deve essere composto dalle seguenti parti:

- Parte recettrice: responsabile dell'interazione selettiva con l'analita.
- Unità attiva: possiede proprietà specifiche che sono relazionate all'interazione con l'analita.

Queste due parti sono legate tra loro e comunicano grazie alla presenza di uno spaziatore che controlla la geometria del sistema e ne regola l'interazione elettronica.

La parte segnalatrice o parte attiva deve possedere una determinata proprietà rilevabile e quantificabile, come per esempio la fluorescenza o un potenziale redox, che deve variare a seconda che il recettore sia libero oppure legato con l'analita. [3]

1.4.2 *Sensori fisici*

I sensori fisici permettono di misurare le grandezze fisiche come la temperatura, pressione, volume, radiazioni ecc.

1.4.3 *Sensori biologici*

Un sensore biologico o biosensore è un dispositivo che trasmette e registra le informazioni che riguardano un cambiamento fisiologico o biochimico, utilizzando un sensore in cui il sistema di riconoscimento è basato su un determinato meccanismo biochimico con una determinata sensibilità [4]. Può essere considerato una sonda con tutte le parti appartenenti alla stessa unità, che solitamente integra un componente biologico direttamente collegato a un trasduttore che converte il segnale biochimico in una risposta elettrica quantificabile. I trasduttori su cui si basano i biosensori sono diversi e spaziano dall'elettrochimica e l'elettronica all'ottica e l'acustica. La funzione del biosensore dipende dalla specificità biochimica del materiale biologicamente attivo, mentre la scelta del materiale biologico prende in considerazione diversi parametri come la specificità, la stabilità ambientale e operativa oppure il tipo di analita che si deve cercare come composti e molecole chimiche, antigeni, microrganismi ecc. Gli elementi biologicamente attivi permettono il riconoscimento dell'analita in questione e dotano il sensore di un alto livello di selettività nei confronti dell'analita, sfruttando reazioni chimiche catalizzate da molecole ingegnerizzate o presenti nell'ambiente biologico preso in considerazione, o sul raggiungimento dell'equilibrio di reazione con le suddette molecole. Possono esistere sensori biologici che sono più o meno selettivi e sensori biologici che invece sono specifici solo per un substrato o classe di substrati perché utilizzano sistemi enzimatici altamente specifici come metodo di riconoscimento [5].

Le caratteristiche più importanti per un sensore biologico sono la specificità, la sensibilità, la portabilità e la semplicità di utilizzo.

1.4.3.1 Classificazione dei biosensori

I biosensori possono essere classificati a seconda della specificità biologica conferita dal meccanismo o in base alla modalità della trasduzione del segnale fisico chimico o in alternativa nella combinazione delle due [5].

Elemento di riconoscimento biocatalitico: Il biosensore si fonda sul principio di riconoscimento per reazioni catalizzate da macromolecole che sono presenti nell'ambiente naturale, e sono provenienti da una cattura in tale ambiente oppure da colture artificiali. Tre tipi di biocatalisi sono normalmente usate

- 1- Enzimatiche: mono o poli enzimatiche, sono le più comuni e sviluppate come sistema di riconoscimento.
- 2- Microbiche: sfruttano l'utilizzo di microrganismi come batteri e lieviti o organuli cellulari come i mitocondri e pareti cellulari
- 3- Tissutali: utilizzo di parti tissutali appartenenti a piante e animali.

Elemento di riconoscimento bio-affine o bio-complessante: Il biosensore è basato sull'interazione dell'analita con una o più macromolecole che sono state isolate dal solo ambiente naturale o ottenute tramite ingegnerizzazione. In base al tipo di molecole utilizzate distinguiamo:

- 1- Interazioni anticorpo-antigene; biosensore che si basa su una reazione immunochimica che porta alla formazione di un complesso anticorpo-antigene che viene rilevato.
- 2- Recettore antagonista/agonista: uso di canali ionici, ricettori di membrana o proteine di legame come recettori in un sistema conduttometrico.

L'immobilizzazione del recettore biologico, dallo sviluppo del primo sensore basato sull'utilizzo di enzimi descritto dal Clark nel 1962, può essere eseguita in molti modi diversi descritti da numerosi articoli, l'approfondimento dei quali non verrà eseguito poiché va oltre lo scopo di questa tesi. I principali metodi di immobilizzazione di enzimi, anticorpi, cellule e tessuti possono essere sintetizzati come segue:

- Immobilizzazione dietro una membrana: il biorecettore viene confinato da una membrana permeabile solamente nei confronti dell'analita ricercato, che ricopre il trasduttore o il detector se presente.
- Immobilizzazione del recettore biologico su una matrice polimerica: i composti maggiormente utilizzati sono agar agar, poliacrilonitrile, poliuretano, polivinilalcol. Anche membrane ottenute da idrogel redox o sol gel possono essere utilizzati come

substrati per l'immobilizzazione dei recettori, questi composti solitamente presentano un centro redox.

- Immobilizzazione di recettori biologici tra un mono strato auto assemblato o tra membrane lipidiche a doppio strato
- Immobilizzazione tramite legame covalente di recettori su membrane o superfici attivati mediante gruppi bifunzionali o spaziatori.

1.4.4 *Sistemi multisensoriali*

La tendenza negli ultimi anni è quella di sviluppare sistemi in grado di monitorare più parametri contemporaneamente. Questi dispositivi sono definiti sistemi multisensoriali e hanno la capacità di analizzare composti diversi, riconoscendoli in breve tempo; quindi, una applicazione industriale nel mondo enologico sarebbe perfetta. I sistemi presi in considerazione sono i nasi elettronici e le lingue elettroniche. Un'analisi più dettagliata dei sistemi multisensoriali applicati nelle varie fasi del processo di vinificazione verrà trattata più approfonditamente in un capitolo apposito.

1.4.4.1 Naso elettronico

Un naso elettronico è un dispositivo che analizza i componenti di uno spettro odorifero, emulando il naso umano; identificando i composti che ne fanno parte. Risulta composto da un insieme detto "array" di sensori, che solitamente sono o fisici o chimici, un sistema di gestione dei campioni e un complesso di riconoscimento del pattern o modello, come ad esempio le reti neurali [6]. La versione più piccola consiste in un singolo computer chip che contiene sia i sensori che i componenti per l'elaborazione, mentre i sensori più utilizzati sono i "metal oxides semiconductor" (MOS), polimeri compositi conducenti e polimeri intrinsecamente conducenti. Anche sensori ottici e sensori di onde acustiche di superficie vengono utilizzati per l'analisi dei gas [6]. Il naso elettronico cattura quindi le tracce dei composti volatili organici presenti nello spazio di testa delle bevande alcoliche usando un "array" di sensori che interagiscono e riconoscono gli analiti presenti [7]. Una volta registrati i dati derivanti dai sensori, il sistema necessita una procedura per analizzare e classificare i dati, questo include l'analisi dei componenti principali, analisi discriminante lineare, minimi quadrati parziali, analisi di gruppo e reti neurali artificiali, solo per citarne alcune. Il processo di rilevamento di un sistema a naso elettronico è normalmente diviso in 5 gruppi [6]:

- 1- Misurazione grezza
- 2- Pre-elaborazione
- 3- Estrazione delle caratteristiche
- 4- Riconoscimento del modello

5- Classificazione

La sensibilità alle molecole o composti dipende dal sensore facente parte dell'array del naso elettronico. Il modello di risposta dei differenti composti presenti nello spettro olfattivo analizzato è una caratteristica alquanto importante per i nasi elettronici che sono in grado di distinguere un analita non riconosciuto proprio grazie al modello di risposta generato dai sensori. Il modello di risposta può essere utilizzato per riconoscere quindi l'insieme dei composti che fanno parte complesso odorifero analizzato e caratterizzarlo grazie ai metodi di riconoscimento dei modelli. I nasi elettronici possono essere utilizzati per la caratterizzazione quali-quantitativa dei composti volatili organici del vino [7]. In particolare, le applicazioni di questo sistema sensoriale può essere il controllo qualitativo nel processo enologico come riconoscimento dei difetti e adulterazioni [7], e l'analisi qualitativa per il riconoscimento delle proprietà del vino e sua classificazione [8]

1.4.4.2 Lingua elettronica

La lingua elettronica è un sistema multisensoriale simile al naso elettronico per il principio di funzionamento ad eccezione del fatto che l'array dei sensori è studiato per il funzionamento con i liquidi [9]. Dato l'enorme mole di dati ottenuti dalle misurazioni tramite lingua elettronica si necessita di metodi chemiometrici e metodi matematici avanzati per l'analisi dei dati e per la loro elaborazione, i più applicati sono: reti neurali artificiali, analisi delle componenti principali, analisi dei gruppi e analisi dei gruppi gerarchici, support vector machine, vari metodi di regressione (minimi quadrati parziali, regressione lineare multipla e regressione della componente principale) [10][7]. La strumentazione di una lingua elettronica fa riferimento alle proprietà elettrochimiche degli analiti che devono essere testati e utilizzano elettrodi che si basano sui principi voltammetrici o potenziometrici in base alla più adeguata soluzione per l'analita preso in considerazione [7]. La selettività e sensibilità dei sensori basati sulla potenziometria dipende dalla composizione dell'interfaccia, mentre le interferenze per questi tipi di sensori dipendono in gran parte dalla composizione della membrana polimerica selettiva e dal materiale di cui sono costituiti gli elettrodi. In questi sensori un elettrodo ricoperto da una membrana è immerso nella soluzione da studiare, viene successivamente creato il potenziale nell'interfaccia membrana/soluzione che dipende dalla natura del materiale di cui è composto l'elettrodo e dalle caratteristiche della soluzione [11]. Le lingue elettroniche che si basano sulla voltammetria e sull'amperometria invece prevedono l'applicazione di una tensione di polarizzazione mentre viene misurata la corrente, i grafici voltammetrici mostrano picchi che sono associati con l'ossidazione o la riduzione delle molecole presenti nella soluzione, la loro intensità è proporzionale alla concentrazione [11]. Sono generalmente

robusti, versatili e dotati di una discreta sensibilità, perché possono essere utilizzati diversi materiali e metodi di eccitazione elettronica quali ad esempio il carattere riducente o ossidante della soluzione che può modificare il potenziale ossidativo del materiale di cui è composto l'elettrodo, l'attività elettroanalitica del materiale di cui è costituito l'elettrodo che può facilitare l'ossidazione dei composti disciolti nella soluzione presa in esame, il carattere acido o basico della soluzione che può protonare o deprotonare l'elettrodo e infine la natura e concentrazione degli ioni presenti nella soluzione che si diffondono dentro la membrana sensibile mantenendo la neutralità elettrica [11]. Anche la spettroscopia a impedenza elettrica è stata usata come metodo di trasduzione per l'analisi dei vini., questo metodo si basa sull'utilizzo di elettrodi modificati con materiale organico di vario genere come polimeri conduttori, nanotubi in carbonio e altri [11]. L'analisi viene ridotta o ossidata in base al tipo di elettrodo e campo potenziale applicato. Uno dei limiti che presentano le lingue elettroniche è la limitata selettività per la presenza di composti e molecole elettrochimicamente attive che interferiscono con i segnali misurati [7].

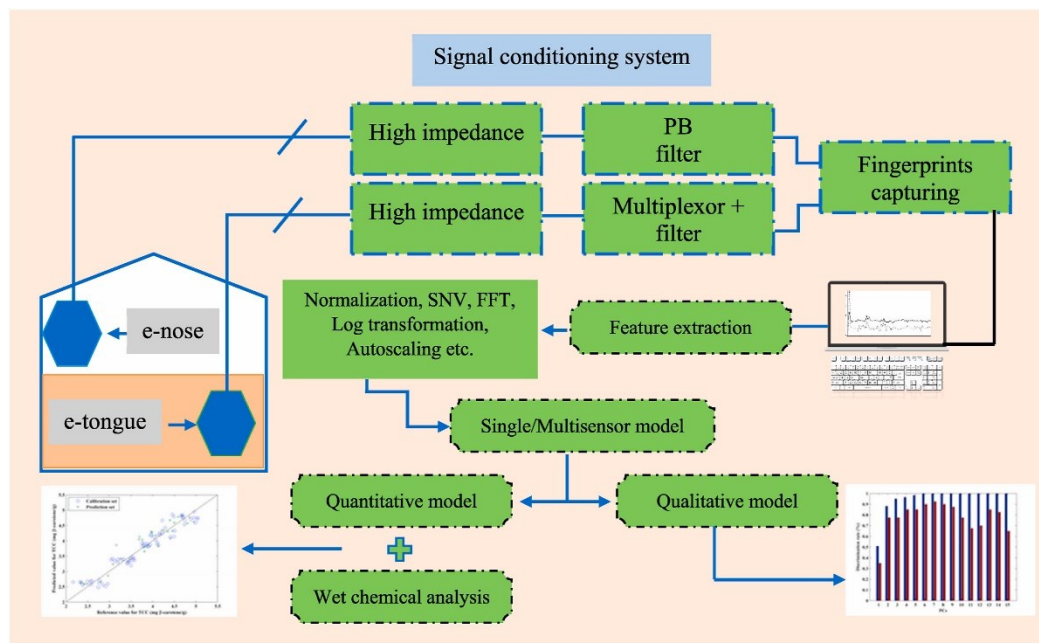


Figura 1- Schematizzazione del metodo di misurazione utilizzando lingue e nasi elettronici [7]

1.4.4.3 Sistemi sensoriali colorimetrici

I sensori colorimetrici possono essere utilizzati per simulare il naso umano nel determinare i composti che fanno parte di uno spettro odorifero, in particolare dei composti organici volatili. L'array di questo sensore, interagendo con i composti organici volatili, produce una forte interazione chimica tra i centri attivi del sensore e gli analiti che compongono l'aroma,

risultando in una risposta chimica si esprime attraverso il cambiamento di colore [7]. I vantaggi che derivano dall'utilizzo di questo metodo sono un rilevamento in tempo reale basato sul cambiamento di colore, senza l'utilizzo di strumenti eccessivamente complicati, in secondo luogo se l'uso del sensore è associato all'uso di tecnologie digitali i risultati si ottengono facilmente, efficientemente e rapidamente, inoltre, i sensori colorimetrici possono essere miniaturizzati e permettere il contemporaneo controllo di più analiti con un singolo dispositivo. Per riassumere, i vantaggi derivanti dall'uso di questo sistema di analisi sono, una buona selettività, alta sensibilità, metodo non distruttivo, basso costo di realizzazione, basso limite di rilevamento e tempi di risposta rapidi.[12]. La struttura dell'array di un sensore colorimetrico si compone di due parti principali, il supporto solido e un colorante chemio-sensibile. Il rilevamento basato sui sensori colorimetrici usa una sensibilità incrociata su diverse tinte chemio sensibili invece di una alta selettività, questo principio di funzionamento mima il processo olfattivo umano [12]. I requisiti fondamentali per la scelta dei coloranti chemio-sensibili sono principalmente quattro: il colorante deve avere un centro di interazione che può interagire fortemente con l'analita, viene provocato un cambio di colore dopo l'interazione poiché il centro di reazione della tintura chemio-sensibile è di norma accoppiata a un cromoforo intenso. Dovrebbero essere presenti gruppi di coloranti chemio-sensibili che possono dare una risposta incrociata su uno stesso o più analiti; infine, i risultati derivanti dall'uso del sensore dovrebbero essere riproducibili e affidabili [12]. Le classi che presentano queste caratteristiche sopracitate sono: i coloranti basici o gli acidi di Brønsted, come ad esempio gli indicatori di pH, i coloranti che sono acidi e basi di Lewis e infine i coloranti zwitterionici solvato-cromici [12]. Il supporto solido invece utilizza film sensibili basati su diversi principi di trasduzione per l'analisi di soluzioni gassose e liquide. Il supporto solido per essere utilizzato in questa categoria di sensore deve possedere 3 caratteristiche essenziali: il materiale non deve reagire con i coloranti, le proprietà del supporto solido devono permettere una diffusione del colorante uniforme e infine deve garantire un fondo bianco per meglio apprezzare il cambiamento di colore [12]. Inoltre, se possiedono proprietà idrofobiche spesso si ritrova anche la riduzione di interferenze dovute all'umidità ambientale mentre la presenza di una nano struttura e un'alta area di superficie possono aiutare la diffusione delle molecole della tintura chemio-sensibile [12]. I materiali e composti utilizzati come supporto solido nella struttura dell'array di un sensore colorimetrico possono essere suddivisi in organici e inorganici:

- I substrati inorganici sono stabili sia chimicamente che strutturalmente, quindi sono solitamente i più usati. Alcuni esempi di substrati inorganici possono essere: vetro, gel

di silice, e silice fuso. Tuttavia, alcuni di questi materiali non sono facili da usare per la realizzazione di film sottili oppure possono presentare una fragilità significativa o ancora non presentare la giusta porosità per gli analiti e la loro diffusione [12].

- I polimeri organici utilizzati per il materiale di supporto come, ad esempio, la cellulosa o il difluoruro di polivinilidene sono stati utilizzati per la costruzione di questi sensori perché possiedono le caratteristiche sopracitate e sono disponibili commercialmente con diversi tipi di microstrutture.
- Infine, le nano strutture che si presentano costituite da un blend di materiali organici e inorganici presentano il meglio delle due classi, per questo costituiscono la scelta migliore per lo sviluppo di un sensore colorimetrico.

L'utilizzo di sensori colorimetrici è relativamente nuovo e ancora molto deve essere studiato, sicuramente l'utilizzo nel campo enologico risulta interessante soprattutto in quei casi dove si richiede un'analisi rapida ed efficiente dei composti aromatici volatili.

1.5 Principi di funzionamento dei sensori

I sensori si basano su principi di funzionamento diverso a seconda del tipo di sensore e dell'analita analizzato. Generalmente però il principio cardine su cui si basa il funzionamento dei sensori maggiormente utilizzati nel campo delle bevande è quello elettrico. Nei sensori che utilizzano questo tipo di funzionamento le quantità misurate in uscita sono sempre convertibili in voltaggi elettrici, indifferentemente dalla natura analogica o digitale del segnale ricevuto. I metodi utilizzati sono quindi elettro analitici, basati sulla voltammetria, potenziometria e conduttimetria. L'approfondimento dei metodi elettroanalitici va al di là dello scopo di questa tesi, pertanto, non verranno trattati in modo approfondito, ma saranno utilizzati per la caratterizzazione di alcuni sensori o processi di analisi descritti in seguito.

1.5.1 *Amperometria*

L'amperometria si basa sulla misura della corrente risultante dall'ossidazione o riduzione di una specie elettro-attiva, solitamente eseguita attraverso il mantenimento di un potenziale costante in un elettrodo o insieme di elettrodi basati su Pt, Au o C rispetto ad un elettrodo di riferimento. La corrente che ne risulta è direttamente correlata alla concentrazione della massa delle specie elettro-attive o alla loro produzione o ancora alla loro degradazione, poiché, le reazioni biocatalitiche sono solitamente dipendenti dalla concentrazione della massa dell'analita [5].

1.5.2 *Potenziometria*

Le misurazioni potenziometriche implicano la determinazione della differenza di potenziale tra, o un indicatore e un elettrodo di riferimento, o due elettrodi di riferimento separati da una membrana semipermeabile quando non si ha una corrente particolarmente significativa che scorre tra di loro. I più comuni dispositivi potenziometrici sono i pH-metri [5].

1.5.3 *Conduttometria*

Le misurazioni che si basano sull'uso della conduttimetria sfruttano la conducibilità degli ioni presenti in soluzione. Gli ioni presentano tutti una conducibilità propria e i due ioni che conducono di più in acqua sono H^+ e OH^- . L'analisi sfrutta quindi il concetto della variazione della conducibilità in funzione del volume dell'analita presente rispetto ad una soluzione campione priva della specie da analizzare [5].

Capitolo 2

ACIDI ORGANICI NEI VINI:

ANALISI DEI PRINCIPALI ACIDI ORGANICI DEL VINO E DEI MOSTI

2.1 Generalità sugli acidi organici nel vino

Gli acidi organici sono una classe di composti che concorrono a determinare la stabilità chimico-fisica e microbiologica nel vino, in modo particolare nei vini bianchi [13] e sono i composti all'origine della caratteristica acida del vino. Le loro proprietà conservanti sono più elevate in quei vini che non effettuano fermentazione malolattica, e presentano, ad esempio, minori precipitazioni tartariche oltre al fatto che vini con tenori di acidità elevati possiedono generalmente anche elevati potenziali di invecchiamento [13]. Nei vini rossi è possibile riscontrare acidità più basse rispetto ai bianchi poiché, essendo maggiormente presenti i composti fenolici, la sensazione gustativa acida viene accentuata. Le proprietà conservanti dovute all'acidità si realizzano in un aumento della potenzialità di invecchiamento di un vino [13].

I principali acidi organici presenti nel vino e nei mosti possono essere distinti in acidi organici derivanti dal processo di sviluppo e maturazione delle uve e acidi organici sviluppati durante i processi fermentativi, siano essi prodotti durante la fermentazione alcolica o durante la fermentazione malolattica [13][29]. Acido tartarico, acido malico e acido citrico sono gli acidi più presenti all'interno dei mosti e del vino, eccezione fatta per l'acido malico che non è presente o è presente solo in tracce, nel caso in cui venga effettuata la fermentazione malolattica. La fermentazione malolattica è un processo fermentativo sfruttato durante il processo enologico per abbassare l'acidità di un vino, durante questa fermentazione l'acido malico, acido bicarbossilico, viene metabolizzato in acido lattico, acido monocarbossilico, risultando in un abbassamento dell'acidità, e di conseguenza anche della sensazione che ne deriva, e del cambiamento del profilo aromatico. In generale il contenuto di acidi organici è relazionato alla regione di provenienza delle uve e al clima durante il periodo di sviluppo e maturazione dell'acino [29]. Come regola generale i vini e mosti ottenuti nelle regioni meridionali, più generalmente in zone in cui le temperature sono elevate, il contenuto di acidi

organici risulta più basso rispetto a uve ottenute in zone settentrionali o comunque con un clima più freddo [13]. Inoltre, il tenore di acido tartarico nei mosti ottenuti da uve provenienti da zone meridionali o a clima caldo è preponderante rispetto agli altri acidi, in contrapposizione con quelli ottenuti nelle zone settentrionali dove l'acido malico predomina o comunque è presente in concentrazioni maggiori. Dal punto di vista quantitativo l'acido tartarico è presente nei mosti fino ad un massimo di 15 g/L [13], anche se i valori per i mosti prodotti con uve derivanti da vigneti delle aree settentrionali si attestano su concentrazioni superiori a 6 g/L, mentre se le uve sono provenienti da regioni meridionali la concentrazione varia da 2 a 3 g/L [13]. La stessa variazione della concentrazione dipendente dalla zona geografica di provenienza delle uve, la ritroviamo per l'acido malico che è un acido bicarbossilico, come anche l'acido tartarico, la cui concentrazione varia da 4 a 6.5 g/L nei mosti delle zone settentrionali, calando invece per le uve ottenute nelle zone meridionali a circa 1-2 g/L [13]. L'acido citrico invece è un acido tricarbossilico, molto diffuso in natura e dalla elevata importanza metabolica e biochimica, in quanto rappresenta il metabolita più importante facente parte del ciclo di Krebs altrimenti detto ciclo dell'acido citrico [13]. La sua concentrazione nel mosto prima della fermentazione malolattica varia da 0.5 a 1 g/L [13]. Oltre a questi tre acidi si possono aggiungere gli acidi della serie cinnamica esterificati con una funzione alcolica dell'acido tartarico e l'acido ascorbico che si ritrova nel mosto sotto forma di lattone e può giocare un ruolo importante nel proteggere i mosti dall'ossidazione, viene infatti spesso utilizzato in campo enologico come agente riducente, accanto all'anidride solforosa [13]. L'acido gluconico è considerato un parametro importante e specifico dello stato sanitario del mosto e delle uve, infatti, serve come indicatore della malattia provocata da *Botrytis cinerea*, la muffa grigia [29]. La presenza di acido gluconico, che corrisponde al glucosio, permette di differenziare tra uve colpite da muffa nobile o uve colpite da muffa grigia [13]. Questo e altri acidi derivano, infatti, dall'ossidazione della funzione aldeidica o della funzione alcolica primaria del carbonio 1 dei chetosi, nel caso di uve colpite da muffa nobile la concentrazione nei mosti di acido gluconico si attesta intorno ai 3 g/L, mentre nelle uve che presentano un'infezione la concentrazione dello stesso acido supera i 3 g/L [28]. Per quanto riguarda invece gli acidi organici che sono prodotti a partire dalla fermentazione quello che riscontra maggior importanza è senz'altro l'acido acetico, questo acido infatti viene prodotto durante la fermentazione del mosto in dosi variabili da 0.2 a 0.3 g/L circa ed è il principale composto della così detta acidità volatile [13]. Il suo tenore è direttamente collegato alla qualità dei vini; infatti, tenori troppo elevati di acidità volatile impediscono la commercializzazione dei vini. Il limite di acidità volatile, per la commercializzazione dei vini, è fissato, a 1.08 g/L

di acido acetico per i vini bianchi e rosati e a 1.2 g/L per i rossi, dal regolamento UE 1493/99 [13]. L'acido acetico viene normalmente prodotto dai lieviti durante le prime e ultime fasi della fermentazione alcolica, ma una sua eccessiva presenza all'interno di un vino dipende principalmente dall'attività di batteri lattici anaerobi e dalla presenza di batteri acetici [13]. Altri acidi organici rilevanti prodotti durante le fasi fermentative sono l'acido lattico e l'acido succinico [29]. Da i fatti sopra elencati risulta evidente che l'analisi degli acidi organici, intesa sia come analisi qualitativa che quantitativa, è necessaria per permettere agli enologi di controllare e monitorare il cambiamento della composizione acida e delle caratteristiche da essa derivanti durante i processi fermentativi. Nel corso di questo capitolo verranno revisionati sistemi sensoristici per l'analisi di acido tartarico, malico e citrico, ma anche di acido gluconico, acetico e lattico paragonandoli con i metodi tradizionalmente utilizzati per la loro determinazione.

2.2 Metodi tradizionali di determinazione degli acidi organici e dell'acidità di un vino

La nozione di acidità in un vino viene distinta ai fini enologici in tre tipi di acidità, l'acidità totale, l'acidità fissa e l'acidità volatile. Per quanto riguarda i metodi raccomandati per la determinazione dell'acidità si è fatto riferimento al compendio sui metodi di analisi dei mosti e dei vini pubblicato annualmente dall'OIV.

2.2.1 Acidità totale

L'acidità totale rappresenta il numero di milliequivalenti di base forte necessari a neutralizzare a pH 7 le funzioni acide di un litro di mosto o di vino [13]. Viene detta anche acidità di titolazione o acidità titolabile. In generale l'acidità totale è dovuta all'espressione di tutte le specie acide presenti nel vino o nel mosto, dagli acidi minerali agli acidi organici [13]. Il grado di contributo acido delle specie presenti quale che sia la sua classe di appartenenza è, sia il suo stato di dissociazione, sia il suo stato di salificazione [13]. Si ottiene appunto mediante titolazione del mosto o del vino con una base forte, solitamente una soluzione a concentrazione nota di idrossido di sodio, in presenza di un indicatore come il blu di bromotimolo o di un pHmetro, per seguire la titolazione potenziometricamente [13].

2.2.2 Acidità volatile

L'acidità volatile, come accennato nel paragrafo dedicato alle generalità degli acidi organici, in Italia viene espressa come g/L di acido acetico essendo quest'ultimo il principale composto a determinarla. In generale questo tipo di acidità è associata a caratteristiche

organolettiche negative che tendono tutte verso difetti olfattivi e gustativi che ricordano l'aceto. Il metodo con cui viene tradizionalmente determinata l'acidità volatile è una distillazione degli acidi volatili, previa estrazione di anidride carbonica, a cui segue la titolazione con idrossido di sodio [16].

2.2.3 Acidità fissa

L'acidità fissa di un vino o mosto è ottenuta per sottrazione del valore dell'acidità volatile da quello dell'acidità totale.

2.2.4 Determinazione degli acidi organici

Gli acidi organici vengono determinati qualitativamente attraverso l'uso della cromatografia liquida ad alte prestazioni. I singoli acidi organici devono prima essere separati dalla matrice utilizzando 2 tipi di fasi stazionarie: la silice ottil-legata e colonne di resina a scambio ionico.

2.3 Sensori per la determinazione degli acidi organici nei mosti e nei vini

I costi e l'operosità dei metodi tradizionali di analisi degli acidi organici hanno spinto i ricercatori a progettare sensori per una rapida e accurata analisi degli stessi. Un metodo rapido attualmente disponibile sul mercato sono i kit enzimatici che si basano sulla cromatografia su carta o su strati sottili e vengono attualmente utilizzati per la determinazione di acido citrico, malico, acetico, lattico e succinico [29]. Questi kit permettono solo una stima imprecisa degli analiti in questione e sono usa e getta [29]. Attualmente vari biosensori sono stati sviluppati per il monitoraggio e quantificazione dei singoli acidi organici nei mosti e nei vini, poiché una serie enzimatica permette di distinguere tra acidi organici diversi senza che si verifichi un'interferenza significativa. I sensori presi in esame per la stesura di questo capitolo sono quelli per la determinazione dell'acido acetico, lattico, malico, citrico, tartarico e gluconico, essendo questi i principali acidi organici il cui monitoraggio risulta interessante ai fini enologici.

2.3.1 Sensori per la determinazione dell'acido acetico

Come accennato nel capitolo di introduzione sugli acidi organici, la determinazione dell'acido acetico nei mosti e nei vini risulta di estrema importanza nel processo di vinificazione, se presente nel mosto, infatti, l'acido acetico può indicare la presenza di processi metabolici indesiderati ad opera di batteri acetici o di altri microrganismi. La sua presenza in

un vino entro una certa soglia invece è del tutto normale, in quanto, viene normalmente prodotto dai lieviti durante la fermentazione [13]. Tuttavia, la soglia di percezione dell'acido acetico è estremamente bassa e se superata può donare al vino caratteristiche organolettiche negative. Se poi la sua concentrazione supera gli 1.2 g/L ne viene bloccata la commercializzazione [30]. Uno dei sensori presi in considerazione per la determinazione dell'acido acetico è basato su una serie di 3 enzimi: l'acetato chinasi, piruvato chinasi e la lattato deidrogenasi [29], tutti immobilizzati su un film di poli(etilenglicole) diglicidil etere contenente blu cresile brillante, che funge da mediatore elettrochimico e successivamente depositati su un elettrodo base Ag/AgCl [31]. Nel sensore in questione, sviluppato da Mieliauskienė, Rasa, Mihaela Nistor, Valdas Laurinavicius, e Elisabeth Csöregi, la concentrazione di acido acetico è ottenuta dalla diminuzione della corrente amperometrica [31] e la risposta all'acido acetico varia da 0.2 a 8 mM con un limite di rilevamento di 0.13 mM. Un altro sensore di recente introduzione è quello proposto da Shumeiko, Vlad, Einav Malach, Yael Helman, Yossi Paltiel, Gili Bisker, Zvi Hayouka, e Oded Shoseyov, che presenta un innovativo metodo di rilevamento, infatti, viene descritto il prototipo di un biosensore ottico "real time" basato su nanotubi in carbonio a singola parete, incorporati in peptidi, per il rilevamento di basse concentrazioni di acido acetico nella fase gassosa. I nanotubi in carbonio a parete singola, ovvero dei tubuli in grafite del diametro di 1.0 nm, in soluzione acquosa sono fotoluminescenti, emettendo una radiazione luminosa nella "near-infrared region" (NIR), ovvero, nella regione dello spettro elettromagnetico prossima agli infrarossi [32]. In base alla chiralità dei nanotubi viene emessa una radiazione elettromagnetica ad una specifica lunghezza d'onda, una delle quali è sotto i 1000nm e può quindi essere rilevata da un comune sensore fotografico, rendendo fruibile una spettroscopia NIR in tempo reale senza la necessità di acquistare apparecchiature complesse e costose [32]. Il prototipo di sensore è costituito da un laser a 532nm, la cui funzione è quella di eccitare i nanotubi in carbonio immobilizzati in una matrice peptidica, una fotocamera a sensore CMOS, che permette di monitorare la risposta fotoluminescente dei nanotubi in carbonio in presenza dell'analita, il quale viene adsorbito nei nanotubi riducendone la fotoluminescenza, di un'intensità correlabile alla concentrazione dell'analita [32]. Il sensore è stato testato sia con soluzioni di acido acetico puro, sia con campioni di vino. Il sensore presenta un limite di rilevamento a 0.5 g/L di acido acetico ed è possibile monitorare l'aumento di acido acetico in soluzione poiché la quantità di acido acetico presente in soluzione è correlata alla diminuzione dell'intensità luminosa emessa dai nanotubi [32]. Tuttavia, durante i test con il vino, si è osservato un aumento dell'intensità luminosa dei nanotubi subito dopo l'aggiunta del campione di vino, probabilmente dovuto al legame

formatosi da molecole volatili e i nanotubi, che hanno provocato un aumento della fotoluminescenza emessa, per poi diminuire una volta che l'acido acetico è stato adsorbito nei nanotubi. Inoltre, la risposta fluorescente all'aggiunta dell'acido acetico è stata più marcata rispetto agli esperimenti di calibrazione in assenza di vino, molto probabilmente ciò indica la presenza di composti aromatici volatili che provocano interferenza nell'analisi [32]. Nonostante le problematiche riscontrate, la tecnologia presentata nello sviluppo di questo sensore risulta interessante, si può prospettare un futuro impiego nel campo enologico per il monitoraggio dell'acido acetico se le problematiche legate alla selettività venissero migliorate. Una delle tecnologie più usate nella determinazione dell'acido acetico è quella dei nasi elettronici, che più in particolare, analizzano i composti volatili organici, di cui l'acido acetico è uno dei composti principali. Uno dei problemi legati ai nasi elettronici è la necessità di preparare il campione da analizzare perché l'acqua e l'etanolo interferiscono con la determinazione dell'acido acetico, per questo sono stati studiati metodi per intrappolare i composti volatili su polimeri o altri composti che allo stesso tempo sono poco affini con l'acqua e l'etanolo, come ad esempio la micro estrazione della fase solida, oppure utilizzo di composti come il Tenax che ha un'alta affinità con l'etanolo il quale rimane intrappolato mentre i composti volatili vengono desorbiti [33]. Un altro studio condotto da A. L. Paredes-Doig et al. Presenta un naso elettronico in cui il sensore basato su composti di SnO_2 viene modificato con zeolite in modo da eliminare il passaggio di alcuni composti sulla superficie del sensore la selezione è dovuta alla microporosità del composto con zeolite che impedisce il passaggio di molecole con dimensioni superiori a quelle dei micropori [34]. Per quanto riguarda i sensori utilizzati nei nasi elettronici i più utilizzati sono i MOS (Metal-oxide semiconductor) [35], che sono sensori elettrochimici la cui risposta è espressa come resistenza (Ohm) e si basa sui cambiamenti della conducibilità indotti dall'adsorbimento della molecola target presente nella fase gassosa analizzata [33]. Nonostante i risultati ottenuti da diversi studi indicano che l'utilizzo di nasi elettronici nell'analisi dei composti volatili organici ha una buona sensibilità, se comparata con i metodi tradizionali di analisi, l'utilizzo per analisi di routine nel processo di vinificazione è ostacolato dalla scarsa portabilità di questi e dalla necessità di pretrattamento del campione per ottenere dei risultati attendibili. A tale proposito risulta molto interessante il naso elettronico sviluppato da Juan C. Rodriguez Gamboa et al, basandosi sullo studio condotto da Macias et al. sulla determinazione dell'acido acetico in una soluzione idroalcolica utilizzando solo un campionatore automatico e un naso elettronico commerciale (PEN3) [33], infatti, Rodriguez sviluppa un naso elettronico basato su 6 sensori MOS per il rilevamento di diverse soglie di acido acetico in modo da classificare diversi vini

e di simulare l'aumento di acidità volatile durante il processo di vinificazione, in modo da rilevare le concentrazioni limite durante gli esami di routine per il controllo qualitativo del vino [36], senza utilizzare tecniche di pretrattamento del campione. Per ottenere una rapida

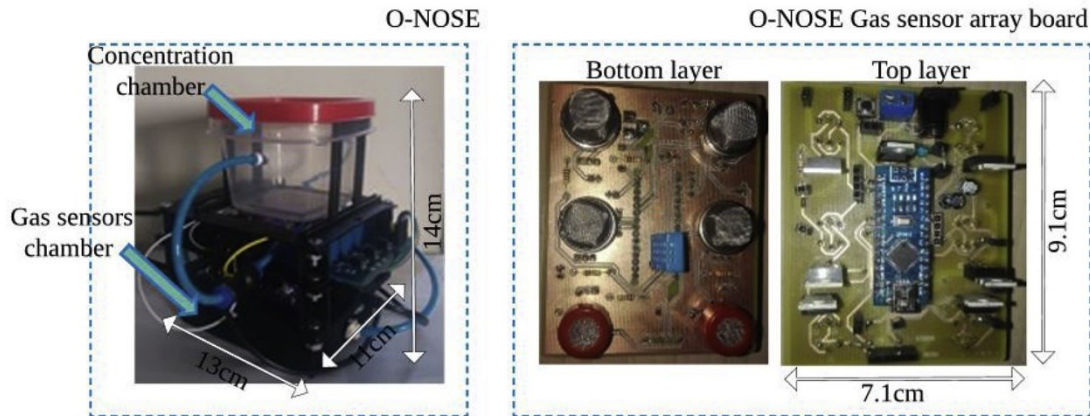


Figura 2-Naso elettronico proposto da Gamboa et al. sulla sinistra si vede il sistema relazionato alle dimensioni, a destra invece abbiamo la scheda principale con i sensori 6 sensori MOS

determinazione dell'acido acetico che fosse anche disponibile online, i ricercatori, propongono un metodo di "Rising Window" focalizzato nell'elaborazione dei dati grezzi ottenuti, per trovare in anticipo una porzione dei segnali del sensore con la migliore prestazione di rilevamento [36]. Questo metodo viene poi confrontato con un approccio più convenzionale che coinvolge l'estrazione delle caratteristiche e la selezione di tecniche per l'elaborazione dei dati seguite da un "Support Vector Machine" [36]. I risultati ottenuti indicano che la prima stima di quantificazione della molecola target avviene dopo 2.7 secondi, fino a 63 volte più velocemente di esperimenti condotti con l'approccio più convenzionale [36].

2.3.2 Sensori per la determinazione dell'acido malico

L'acido malico, come indicato nel paragrafo dedicato alle generalità sugli acidi organici nel vino, è uno dei 3 principali acidi organici che ritroviamo nel mosto e nei vini ed è il substrato principale della fermentazione malolattica, che altera la composizione acida del vino, mutandone anche le caratteristiche organolettiche che ne derivano; pertanto, una rapida determinazione in sito o sensori che ne permettono il monitoraggio in tempo reale risultano di notevole interesse. In generale la determinazione dell'acido malico nei vini e nei mosti avviene attraverso l'utilizzo di biosensori enzimatici che utilizza 3 enzimi: la malato deidrogenasi, la malato:chinone ossidoreduttasi e l'enzima malico [37]. Tutti i biosensori revisionati sono amperometrici poiché sono generalmente considerati più sensibili delle alternative potenziometriche. Nella review prodotta da Matthews et Al. sono stati presi in considerazione

34 biosensori a partire da quello pioneristico prodotto da Blaedel and Engstrom nel 1980. L'enzima malato deidrogenasi è sicuramente quello maggiormente utilizzato nella costruzione dei sensori, essendo stato utilizzato in 25 dei 34 sensori analizzati [37]. La malato deidrogenasi catalizza reversibilmente la conversione del malato a ossalacetato, ossidazione accompagnata dalla riduzione del NAD^+ a NADH . La catalisi operata dall'enzima malico invece porta alla decarbossilazione ossidativa del malato, producendo piruvato e CO_2 e può essere sia NAD^+ dipendente che NADP^+ dipendente [37]. L'enzima malico richiede generalmente la presenza di ioni metallici bivalenti, di cui i più comuni sono Mg^{2+} e Mn^{2+} , è allostericamente attivata dal fumarato e inibita dall'ATP. Il malato:chinone ossidoreduttasi è una flavoproteina di membrana che è stata descritta per la prima volta in *Corynebacterium glutamicum* e successivamente in altre specie batteriche incluso *Escherichia coli* [37]. In genere catalizza l'ossidazione del malato a ossalacetato con la differenza che l'elettrone viene donato al

Tabella 1-Proprietà dei biosensori per la determinazione del malato

Analita	Elettrodo	Enzima	LOD (μM)	Sensibilità	Stabilità nel tempo
<i>Acido malico</i>	Platino	ME/piruvato ossidasi	0.5	NR	3 mesi a 4 °C
	Clark	ME/piruvato ossidasi	2	$9.6 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	10 giorni a TA
	Clark	ME/salicilato ossidasi	NR	$18.5 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	30 giorni TA
	Carbonio/Rodio	ME	28	NR	NR
	platino	ME	3	NR	NR
	Grafite	ME	10	NR	NR

ME = malic enzime; NR = non riportato; TA= temperatura ambiente

chinone del trasporto elettronico invece che al NAD^+ o NADP^+ [37]. Le altre caratteristiche principali di un biosensore è la soglia limite di rilevamento, ossia, la sensibilità, la soglia limite di riferimento è il più piccolo cambiamento rilevabile nella concentrazione dell'analita [37]. La sensibilità di un biosensore enzimatico amperometrico è il risultato di una complessa interconnessione tra l'enzima, il mediatore elettronico, elettrodo, elettrolita e variabili esterne [37]. Le pubblicazioni revisionate riportano la sensibilità come corrente generata per unità di concentrazione di malato (μAmM^{-1}) o come relazionata alla all'area dell'elettrodo ($\mu\text{AmM}^{-1} \text{cm}^{-2}$), risulta quindi difficile compararle se non impossibile [37]. La sensibilità del sensore determina anche la sua resistenza all'interferenza di altri composti, nel caso analizzato si è visto che l'acido ascorbico e i polifenoli, essendo entrambi forti riducenti, sono i composti che interferiscono maggiormente riducendo direttamente l'elettrodo, per quanto riguarda invece l'interferenza con la parte enzimatica del sensore solo pochi composti come l'acido tartarico

e l'acido lattico sono stati riportati come interferenti, solo però per una minoranza di biosensori a riprova dei benefici che si possono ottenere dalla specificità per il substrato che si ottiene utilizzando questi enzimi [37]. La stabilità nel tempo di un sensore è un'altra caratteristica di fondamentale importanza per un biosensore enzimatico, infatti, la vita minima richiesta è di almeno 6 mesi [37], alla fine dei quali lo strumento deve mantenere un'ottima sensibilità e funzionalità. Molti sensori analizzati però hanno una stabilità riportata di 3 mesi o meno.

Tabella 2-Sensori per la determinazione dell'acido malico che usano la malato deidrogenasi come trappola enzimatica

Analita	Enzima	LOD (μM)	Sensibilità	Stabilità
<i>Acido malico</i>	MDH	6	$0.2 \mu\text{A mM}^{-1}$ $0.16 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	NR
	MDH NADH ox.	5	NR	8 settimane (4 °C)
	MDH/diaforasi	NR	NR	NR
	MDH	240	$0.001 \mu\text{A mM}^{-1}$	2 mesi (4°C)
	MDH/ diaforasi	1	NR	6 mesi
	MDH/ODC	2	$0.8 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	10 giorni
	MDH/diaforasi	10	NR	5 mesi
	MDH/diaforasi	15	NR	1 mese
	MDH	NR	$1.35 \mu\text{A mM}^{-1}$ $0.69 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	NR
	MDH/NADH Ox.	9.1	$0.99 \mu\text{A mM}^{-1}$	3 mesi
	MDH	9.4	$1.09 \mu\text{A mM}^{-1}$	3 mesi
	MDH/HRP	32	$0.031 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	NR
	MDH	33	$0.46 \mu\text{A mM}^{-1}$	NR
	MDH	3	$12.4 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	2 settimane
	MDH/diaforasi	0.52	$1.58 \mu\text{A mM}^{-1}$ $22.4 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	15 giorni
	MDH/diaforasi	5.4	$0.55 \mu\text{A mM}^{-1}$ $27.4 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	1 anno TA
	MDH/diaforasi	1.57	$1.17 \mu\text{A mM}^{-1}$ $58.2 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	1 anno TA
	MDH/diaforasi	1.77	$1.22 \mu\text{A mM}^{-1}$ $60.7 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	1 anno TA
	MDH/diaforasi	0.16	$3.2 \mu\text{A mM}^{-1}$	25 giorni
	MDH/diaforasi	0.063	$21.8 \mu\text{A mM}^{-1}$ $1350 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	37 giorni
MDH/glutammato ossalacetato transamminasi	4.02	$0.3 \mu\text{A mM}^{-1}$	17 giorni	
MDH/diaforasi	11	$0.7 \mu\text{A mM}^{-1}$ $22.3 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$	NR	

2.3.3 Sensori per la determinazione dell'acido lattico

L'acido lattico rappresenta un risultato metabolico della fermentazione malolattica, dove un acido bicarbossilico, l'acido malico, viene trasformato in un acido monocarbossilico, l'acido lattico, provocando un abbassamento dell'acidità del vino [13]. La fermentazione malolattica quando desiderata influenza positivamente le caratteristiche aromatiche del vino [38]. L'utilizzo di sensori per la determinazione dell'acido lattico risulta interessante al fine di monitorare l'andamento della fermentazione malolattica, quando voluta.

2.3.3.1 Biosensori per la determinazione dell'acido lattico

La determinazione del lattato avviene attraverso biosensori enzimatici utilizzando la lattato ossidasi o la lattato deidrogenasi [29]. Tuttavia, l'ultima richiede la presenza del cofattore NAD^+ che apporta una complicazione nell'analisi e un aumento dei costi di produzione, in aggiunta è necessaria, perché avvenga una reazione efficace, la presenza di enzimi supplementari, come ad esempio glutammato e piruvato transaminasi, determinando un ulteriore aumento dei costi e della complessità costruttiva del sensore [38]. Di conseguenza la lattato ossidasi è l'enzima maggiormente utilizzato nella costruzione di biosensori per il riconoscimento e determinazione dell'acido lattico, catalizzando la trasformazione del lattato in piruvato e perossido di idrogeno [38]. Nonostante ciò, questo rilevamento è ostacolato nelle applicazioni analitiche dalla cinetica degli elettrodi e dagli alti potenziali, che possono risultare in alte interferenze per la presenza di specie elettroattive. Una soluzione a quest'ultimo problema è stata proposta da Loaiza et al., che propone un biosensore che usa l'immobilizzazione covalente della lattato ossidasi in un elettrodo serigrafico modificato con nano-fibre in carbonio grafitizzato e nano-particelle di platino. Le nano-particelle di platino possiedono infatti proprietà elettro-catalitiche migliorata causa della loro maggiore superficie specifica, rispetto al platino sfuso [38], che migliorano il trasferimento elettronico a basso potenziale nelle nano-fibre di carbonio, rendendo eccellente l'attività elettro-catalitica nei confronti dell'ossidazione/riduzione del perossido di idrogeno [38] e permettendone un rilevamento amperometrico a basso sovrapotenziale. Viene quindi ottenuto un sensore che presenta un limite di rilevamento di $6.9 \mu\text{M}$ e con una stabilità testata fino a 3 mesi a temperatura ambiente. Un altro lavoro interessante è stato fatto da Pablo Giménez-Gomez et al. dove viene proposto un sensore dall'eccellente sensibilità, si tratta di un biosensore bienzimatico con un trasduttore elettrochimico a pellicola d'oro sottile modificata con una membrana enzimatica formata da matrice di polipirrolo tridimensionale immobilizzante la lattato ossidasi e la perossidasi [39]. La funzione della perossidasi è quella di idrolizzare il perossido di idrogeno prodotto dalla lattato ossidasi, producendo delle specie ossidate che

possono essere rilevate a basso potenziale in modo da evitare possibili interferenze del campione. La risposta al lattato è lineare per un intervallo di concentrazione tra 1×10^{-6} e -1×10^{-4} M, con un limite di rilevamento di 5.2×10^{-7} M e una sensibilità di $-13.500 \pm 600 \mu\text{AM}^{-1}$.

2.3.3.2 Sensori ultrasonici per il monitoraggio della fermentazione malolattica.

Gli ultrasuoni sono una tecnologia emergente, già utilizzata nell'industria per la misurazione delle distanze, rilevamento di ostacoli e monitoraggio dei livelli di riempimento [40]. L'utilizzo di ultrasuoni nell'industria enologica potrebbe risultare interessante in quanto queste tecniche non sono invasive, non sono distruttive, sono generalmente accurate e rapide, sono applicabili a processi di automazione e disponibili per un monitoraggio online [40]. Çelik et al. propongono un sensore ultrasonico per il monitoraggio della fermentazione malolattica che può essere installato direttamente su una cisterna in acciaio inox di una cantina industriale. Il principio su cui si basa questa tecnologia è la diversa velocità di propagazione di un'onda ultrasonica in un liquido al variare della sua composizione. Viene usato un impulso elettrico che viene trasformato, da un trasduttore, in un'onda ultrasonica, la quale viene trasmessa al liquido, che si trova tra una zona cuscinetto, che serve a propagare l'onda, e un riflettore

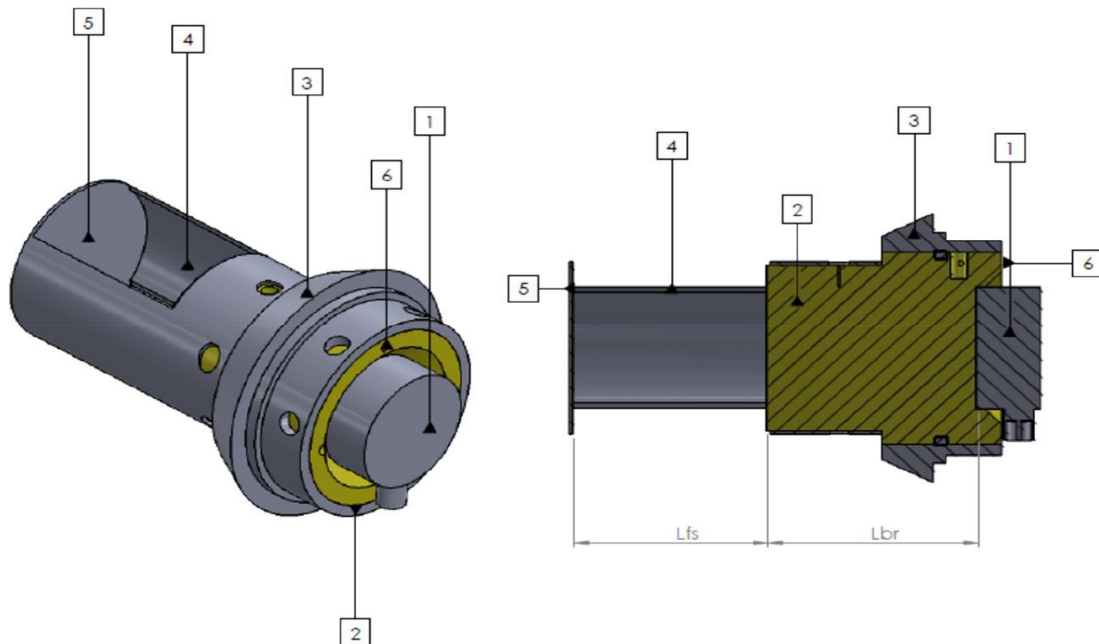


Figura 3- Spaccato del sensore ultrasonico: 1) trasduttore, 2) zona cuscinetto, 3) anello in acciaio inox, 4) corpo cilindrico, 5) riflettore d'onda, 6) trasduttore di temperatura [40]

d'onda. Una volta che l'onda viene riflessa dal riflettore viene captata dal trasduttore. Il sensore è stato quindi testato in soluzioni contenenti diverse concentrazioni di acido malico, acido lattico e alcool per ottenere uno standard di velocità di propagazione, dopo di che, è stato testato in cisterne di contenenti vino che avrebbe dovuto eseguire la fermentazione malolattica. Durante la fermentazione malolattica il contenuto di acido malico diminuisce, quindi, in teoria,

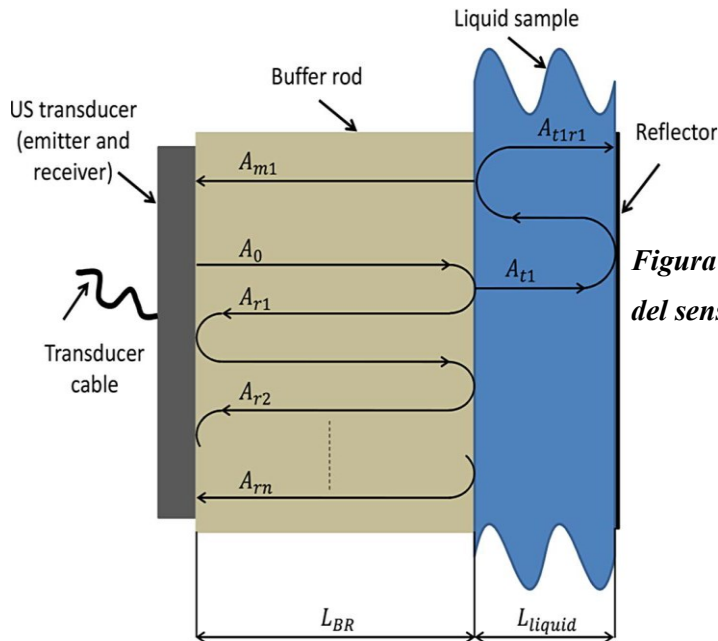


Figura 4-Principio di funzionamento del sensore ultrasonico [40]

la velocità di propagazione dovrebbe aumentare, in realtà si è vista un iniziale aumento della velocità seguita da una decrescita, finendo con un altro aumento [40]. La differenza rilevata tra la curva del comportamento reale e la curva del comportamento teorico sulla base dello standard è stato spiegato dai ricercatori come relazionata alla presenza di fattori relativi alla crescita dei batteri lattici e non alla variazione della concentrazione di acido malico e acido lattico [40]. I risultati ottenuti indicano un potenziale utilizzo di questa tecnologia per il monitoraggio online della fermentazione malolattica.

2.3.4 Sensori per il rilevamento dell'acido citrico

L'acido citrico è il terzo acido maggiormente presente all'interno dei vini, inoltre può essere utilizzato come acidificante nell'industria alimentare. Una sua determinazione può risultare utile solo nella determinazione del profilo acido di un vino. Ad oggi sono, infatti, disponibili in letteratura pochi sensori per la sua determinazione, probabilmente ciò è dovuto al fatto che la determinazione della sua concentrazione ai fini enologici risulta poco interessante. Per la sua determinazione vengono descritti biosensori enzimatici che richiedono la co-immobilizzazione di tre enzimi: il citrato liasi, l'ossalacetato decarbossilasi e la piruvato ossidasi [29].

2.3.5 Sensori per la determinazione dell'acido tartarico.

Nonostante il fatto che l'acido tartarico sia l'acido maggiormente presente nel vino e nei mosti, la sua determinazione attraverso l'uso dei sensori non è documentata se non per l'articolo prodotto da Lourenço et al. dove viene dimostrata l'ossidazione elettrocatalitica dell'acido tartarico su un elettrodo in pasta di carbonio modificato con cobalto (II)-ftalocianina, come mediatore elettronico e applicata allo sviluppo di un sensore voltammetrico altamente sensibile, semplice, veloce ed economico [41]. Le interferenze dovute alla presenza di altri acidi organici a basso peso molecolare, come ad esempio l'acido citrico, succinico e malico, comunemente presenti nei vini, sono state sorpassate utilizzando una tecnica chemometrica di calibrazione multivaria, modellando i dati voltammetrici con minimi quadrati parziali rivelati attraverso la bilinearizzazione residuale (U-PLS/RBL). È stato ottenuto un intervallo di risposta lineare compreso tra 10 e 100 mmol L⁻¹ ($r = 0,9991$) e un intervallo di recupero compreso tra 96,41 e 102,43% [41].

2.3.6 Sensori per la determinazione dell'acidità titolabile

La determinazione dell'acidità titolabile viene classicamente effettuata attraverso una titolazione del campione con una base forte, generalmente idrossido di sodio, ed è espressione del contenuto acido totale del campione [16]. Le problematiche legate a questa tecnica sono essenzialmente riducibili al bisogno di personale specializzato, possibilità di errore durante il viraggio per difficoltà a rilevare il cambiamento di colore e impossibilità di eseguire la titolazione rapidamente e in situ. Viene quindi proposto da Kotani et al. un sensore voltammetrico in grado di determinare l'acidità titolabile con una buona correlazione alla tradizionale titolazione potenziometrica che utilizza 0.1 mol/L di idrossido di sodio [42]. Il principio su cui si basa questo sensore è la riduzione amperometrica di un chinone, in particolare è stato scelto il 3,5-di-t-butil-1,2-benzochinone (DBBQ), in quanto gli acidi, sia organici che inorganici, causano, in una soluzione non tampone, un nuovo picco di riduzione (denominato "prepeak") su un voltammogramma a potenziali più positivi rispetto a quelli corrispondenti al potenziale di riduzione originario del DBBQ [42]. È stato quindi, prima

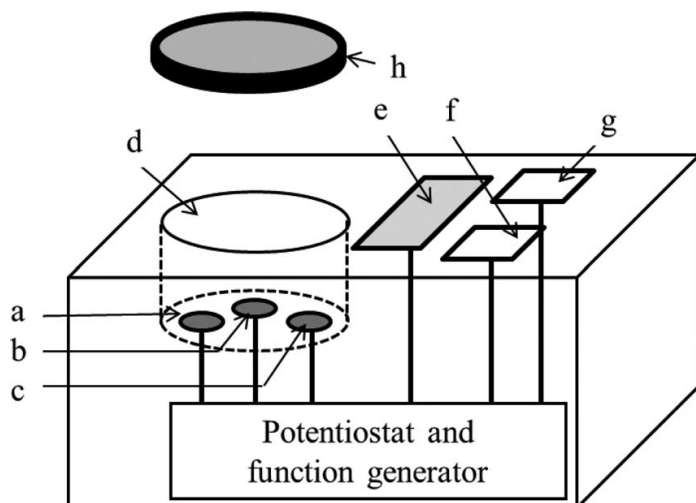


Figura 5- diagramma del sensore; a) elettrodo di lavoro; b) elettrodo di riferimento; c) elettrodo ausiliario; d) cella elettrochimica; e) monitor; f) bottone per la misurazione; g) bottone per aggiustamento dello zero; h) coperchio in acciaio inossidabile [42]

testata la rilevazione degli acidi per via voltammetrica con l'uso della riduzione del chinone con soluzioni alcoliche contenenti diverse quantità note di acidi organici. Successivamente sono state comparate le acidità titolabili, di diversi campioni sia di vino che di caffè, grassi e oli, ottenute mediante la riduzione voltammetrica del chinone con la titolazione di neutralizzazione tradizionale, ottenendo una correlazione tra le due: $y = 0.989x - 0.54$ ($r=0.966$), dove y è l'acidità titolabile ottenuta per

voltammetria, e x è quella dalla titolazione potenziometrica. Da questi risultati, la presente voltammetria si è dimostrata pratica e utile per determinare l'acidità titolabile nel vino [42]. Una volta provata l'efficacia della determinazione dell'acidità titolabile attraverso l'uso della riduzione voltammetrica del chinone è stato sviluppato un sensore basato su questo metodo, che fosse piccolo (solo 100g di peso) e alimentato a batteria (due batterie di tipo AAA) [42]. Il sensore sviluppato presenta un potenziostato con un generatore di funzioni, una cella elettrochimica con capacità di 1 ml, un circuito integrato e un monitor [42]. Come elettrodi sono stati utilizzati 3 elettrodi ("Plastic Formed Carbon Electrode") come elettrodo di lavoro, elettrodo di pseudo-riferenza ed elettrodo ausiliare, nel fondo della cella elettrochimica ogni elettrodo è stato incastonato nel tetrapoli fluoruroetilene. Le procedure per la calibrazione sono richieste almeno una volta al mese usando acidi standard prima dell'analisi del campione.

Capitolo 3

ALCOLI E ALTRE SOSTANZE VOLATILI: ANALISI DELL'ETANOLO, METANOLO E DELLE PRINCIPALI SOSTANZE VOLATILI DEL VINO E DEI MOSTI

3.1 Etanolo

3.1.1 Generalità sull'etanolo: *provenienza e composizione chimica*

L'alcol etilico o etanolo dopo l'acqua è il composto quantitativamente più presente nella composizione chimica del vino. Il titolo viene espresso per mezzo del grado alcolico che rappresenta la percentuale, in volume, di alcol nel vino. L'alcol, nel vino, generalmente si ritrova in concentrazioni di circa 100 g/L ed eccezionalmente può raggiungere la soglia massima di 136 g/L, ossia corrispondente ad una gradazione pari a 16% vol. [13]. La provenienza dell'etanolo nel vino è da ricercare nella fermentazione alcolica degli zuccheri operata dai lieviti che porta all'ottenimento dell'etanolo. Dal punto di vista chimico l'etanolo

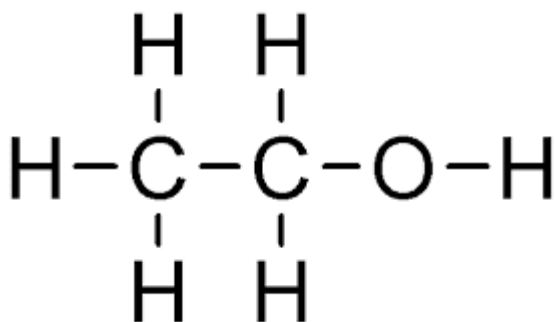


Figura 6-Formula chimica dell'etanolo

è un alcol primario, ovvero, un composto in cui il carbonio 1, che presenta ibridazione sp^3 con geometria elettronica tetraedrica, è legato a due atomi di idrogeno e a un idrossido

A causa della sua affinità e della sua solubilità in acqua l'etanolo è un potente disidratante. Questa proprietà gli conferisce proprietà antisettiche

largamente utilizzate nella conservazione del vino, infatti, l'azione dell'etanolo coniugata a quella dell'acidità permette di conservare il vino per lunghi periodi di tempo senza riscontrare particolari degradazioni sensoriali.

3.1.2 Norme per l'indicazione del titolo alcolometrico

Il grado alcolico costituisce una espressione importante di qualità rivestendo grande importanza ai fini commerciali, infatti, la maggior parte delle legislazioni impongono l'indicazione del grado alcolico sulle etichette delle bottiglie, compresa quella europea con il regolamento (UE) n. 1169/2011 del 25 ottobre 2011 che disciplina all'art. 28 il titolo alcolometrico. Il par. 1 di tale articolo stabilisce che le modalità d'indicazione del titolo alcolometrico volumico sono determinate, per quanto riguarda i prodotti di cui al codice NC 2204, dalle disposizioni specifiche dell'Unione europea applicabili a tali prodotti. La determinazione del grado alcolico assume una notevole importanza anche per quanto concerne l'esportazione: i sistemi di tassazione delle bevande alcoliche in altri paesi, soprattutto quelli anglosassoni, sono proporzionali al tenore alcolico della bevanda commercializzata, pertanto, è obbligatoria l'indicazione del titolo alcolometrico nell'etichetta e nei documenti relativi. Inoltre, l'etanolo risulta tossico per l'uomo e può portare alla comparsa di problemi cardiovascolari, danneggiamento del fegato e intossicazione del pancreas se l'assunzione di questa sostanza è cronica e prolungata nel tempo [1].

3.1.3 Importanza della determinazione dell'alcol

La determinazione dell'alcol è quindi fondamentale durante il processo di vinificazione per diversi motivi: la concentrazione dell'alcol durante la fermentazione alcolica è direttamente legata alla degradazione degli zuccheri e da informazioni circa l'andamento della fermentazione. Nei mosti invece la presenza di etanolo, può essere correlata a processi microbiologici fermentativi dovuti a lieviti e microrganismi indigeni presenti nelle uve, che spesso si traduce in una contaminazione microbica che deve essere controllata. Il tipo di alcol etilico presente può anche rappresentare un indicatore di qualità e di identità, nelle bevande finite come il vino, quando l'ottenimento di questo metabolita deriva solo dalla degradazione dei composti appartenenti al materiale di partenza [13]. Dell'alcol etilico prodotto dalla fermentazione, fanno parte molecole in cui alcuni atomi di idrogeno legati ai carboni 1 e 2 sono rimpiazzati dal deuterio, un isotopo dell'idrogeno; queste molecole rappresentano però una percentuale molto bassa sul totale, e il loro numero è caratteristico sia dell'origine dello zucchero fermentato, ossia da uva, barbabietola o canna da zucchero, sia dell'origine geografica della coltura [13][14]. Durante la fermentazione il deuterio contenuto nello zucchero è distribuito nei gruppi metilici con un rapporto tipico. il rapporto tipico tra l'isotopo deuterio e l'idrogeno nell'alcol etilico derivante dalla fermentazione degli zuccheri dell'uva

viene alterato dall'aggiunta artificiale di zucchero al mosto prima e dopo la fermentazione [14]

Questa caratteristica permette un metodo di controllo per vini ottenuti grazie all'arricchimento dei mosti con saccarosio, detta chaptalizzazione, e il rilevamento delle frodi corrispondenti [13]. La chaptalizzazione è correntemente vietata in Italia, la normativa di riferimento risale al 1965, d.p.r. 162 recante le "norme per la repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio dei mosti, vini ed aceti", tale legislazione si ritiene ormai consolidata anche in riferimento alla sentenza della Corte costituzionale n.188 del 1982.

3.1.4 *Metodi tradizionali di determinazione dell'alcol*

Ad oggi la determinazione dell'alcol viene eseguita prevalentemente con tecniche tradizionali, quelli correntemente utilizzati sono diversi, i più comunemente utilizzati sono la cromatografia a gas o liquida [15]. La cromatografia a gas è la più comune e utilizzata delle metodologie per determinare la quantità di etanolo nelle bevande [1], si presenta però il problema che queste tecniche richiedono un pretrattamento del campione, personale altamente specializzato e risultano costose. È possibile utilizzare le tecniche, per la determinazione dell'alcol etilico, descritte nel "Compendium of International Methods of Must and Wine" redatto dall'OIV, usato come linea guida, dagli stati europei, per la definizione delle normative relative alle metodologie utilizzabili per la certificazione del titolo alcolometrico del vino. I metodi descritti sono:

- determinazione del titolo alcolometrico su volume di una bevanda misurando la densità del distillato attraverso l'uso di un picnometro
- determinazione del titolo alcolometrico su volume di una bevanda misurando la densità del distillato con un densimetro elettronico a oscillatore di frequenza.
- Determinazione del titolo alcolometrico su volume di una bevanda misurando la densità del distillato usando il principio dell'equilibrio idrostatico
- Determinazione del titolo alcolometrico su volume di una bevanda misurando la densità del distillato per idrometria o rifrattometria.

La determinazione del titolo alcolometrico grazie ai metodi descritti dall'OIV si basa sull'ottenimento di un distillato a partire dal campione di vino previa alcalinizzazione mediata da idrossido di calcio, con lo scopo di prevenire la chelazione degli acidi volatili. In secondo luogo, la densità del distillato viene misurata secondo il principio che un liquido ad una data temperatura è uguale al quoziente della sua massa sul suo volume secondo la relazione " $\rho=m/V$ " che per il vino viene espresso in g/cm^3 [16]. Per le soluzioni idroalcoliche quando la

temperatura è nota apposite tabelle vengono utilizzate per trovare la corrispondenza tra la densità e il titolo alcolometrico su volume.

I metodi certificati nella determinazione dell'etanolo correntemente usati sono diversi. Il più vecchio ma ancora discretamente usato è ebullioscopia semi-quantitativa che si basa sulla determinazione del punto di ebollizione. Metodi specifici gravitazionali basati sull'idrometria sono più accurati ma richiedono maggiore tempo per essere eseguiti, inoltre, richiedono l'estrazione di un campione per distillazione prima dell'analisi di laboratorio. Un altro metodo utilizzato è l'ossidazione del dicromato che però viene utilizzato maggiormente per analisi di larga scala in laboratori autorizzati. Il metodo di analisi più comunemente utilizzato oggi per la determinazione di alcol etilico è la cromatografia liquida/gassosa [15].

3.1.5 Sensoristica per la determinazione dell'etanolo

il costo e l'operosità delle tecniche tradizionali per la determinazione dell'etanolo le rende poco portate per il monitoraggio rapido di tale parametro. L'industria enologica d'altro canto richiede dei metodi di determinazione rapidi per le analisi di routine atte a monitorare il processo di vinificazione e in quei processi di controllo qualità dei suoi prodotti. [17]. Nel corso degli ultimi anni sono state sviluppate nuove tecniche per il riconoscimento dell'etanolo nei processi di vinificazione che si basano sull'utilizzo di sistemi elettro-analitici come i sensori chimici e bio-sensori, ma anche sull'utilizzo di sensori fotonici e ad infrarossi [18][19]. Una descrizione dei sensori presi in considerazione viene fatta per ogni singolo sensore nei sotto capitoli seguenti.

3.1.6 Biosensori enzimatici per la determinazione dell'alcol

la determinazione dell'etanolo nei biosensori spesso si basa sull'utilizzo di due enzimi, l'alcol ossidasi e l'alcol deidrogenasi, che vengono immobilizzati sul sensore, solitamente, grazie a vernici per elettrodeposizione o a idrogel appositi. [20]. La bassa selettività dell'alcol ossidasi fa preferire l'alcol deidrogenasi per lo sviluppo di biosensori enzimatici. Alcol ossidasi ha una bassa selettività ed è principalmente indicata per alcol alifatici a catena corta come, ad esempio, etanolo e metanolo ma anche altri. [17]. il principio di funzionamento generale si basa quindi sulla catalizzazione della degradazione dell'alcol etilico seguita da, formazione di perossido di idrogeno nel caso in cui l'analita venga ossidato oppure la generazione della forma ridotta della β -nicotinammide adenina dinucleotide (NAD⁺) quando l'alcol deidrogenasi è usata come enzima. Un altro biosensore enzimatico che ha dato ottimi risultati è quello basato su enzimi PQQ, come la chinoxalene-chinone reduttasi, che presenta una buona indipendenza dall'ossigeno e il trasferimento diretto degli elettroni tra il

loro centro attivo e l'elettrodo, questo rende più facile la costruzione dei sensori biologici che utilizzano questo sistema. [21]. Viene quindi generata una reazione redox che provoca un trasferimento elettronico che viene registrata dal trasduttore. Le sensibilità di questi sensori sono molto sviluppate e generalmente sono negli ordini di pochi mM, Le proprietà dei biosensori analizzati sembrano dipendere altamente dalla composizione dell'idrogel utilizzato, dal polimero legato all'enzima-redox e dal rapporto con i cross-linker [21]. I cross-linker sono agenti che legano stabilmente una sostanza ad un substrato.

3.1.7 Biosensori microbici per la determinazione dell'etanolo

Un principio interessante su cui si basa la determinazione dell'etanolo di alcuni biosensori è l'applicazione di microrganismi, come i lieviti e i batteri, per riconoscerne la presenza nella soluzione. L'applicazione di microrganismi ai sensori è stata proposta perché spesso gli enzimi utilizzati per la produzione di biosensori devono essere sintetizzati o purificati, tutti procedimenti che richiedono tempo e possono anche diventare costosi [22]. I microrganismi come lieviti e batteri sono in grado di metabolizzare i composti su molti substrati, spesso si presentano immobilizzati in un substrato su cui metabolizzano l'alcol, possono essere considerati altamente selettivi poiché la loro specificità può essere migliorata attraverso diversi metodi, che spaziano dall'induzione di sistemi di trasporto metabolico alla inibizione di vie metaboliche indesiderate. L'aggiunta al sistema sensoriale di membrane semipermeabili aumenta la selettività nel complesso del biosensore microbico. Il principio di funzionamento si basa sul metabolismo del lievito che in presenza di etanolo tende ad assimilarlo, assimilazione che comporta il consumo di ossigeno (da una soluzione satura di ossigeno) durante il processo di respirazione [5]. La respirazione provoca quindi una diminuzione della concentrazione di ossigeno che risulta essere direttamente correlata con la concentrazione di etanolo del campione e che può quindi essere utilizzata per esprimere il titolo alcolometrico. Le misurazioni hanno portato all'ottenimento di una curva di risposta per concentrazioni che variano da 0.2 a 50 mM. [17].

L'attività dei lieviti dipende sia dalla presenza di un substrato carbonioso che dalla temperatura, quest'ultima può leggermente interferire con le rilevazioni. Una variazione di pH invece non ha portato a particolari differenze poiché lo strato biocatalitico del sensore, che contiene i lieviti, si presenta diviso dal campione da una membrana permeabile solo ai gas che non permette lo scambio di ioni tra l'esterno e l'interno della membrana, di conseguenza il pH non interferisce con le misurazioni. Per quanto riguarda le interferenze da altri metaboliti solo il glucosio ne provoca una sulla misurazione della concentrazione dell'etanolo, problema che può essere facilmente eliminato con l'aggiunta di uno strato enzimatico basato su glucosio

ossidasi. [17]. Il tempo di risposta varia in base alla struttura e composizione del biosensore con particolare importanza assunta dal numero degli strati enzimatici se presenti nel sensore. Un tempo di risposta di 100s è stato riscontrato nel 2013 per un sensore microbiologico basato sul batterio “*Methylobacterium organophilium*” [22].

3.1.8 Sensori fisico chimici per la determinazione dell’etanolo

Questi sensori usano delle superfici che interagiscono con l’analita e da questa interazione si ha la generazione di un segnale in uscita che risulta correlato alla concentrazione dell’analita stesso. I sistemi sensoriali presi in considerazione per redigere questa tesi sono stati uno spettrometro a infrarossi e un sensore fotonico.

3.1.8.1 Spettrometro a infrarossi

Lo spettrometro a infrarossi in questione è stato preso in considerazione perché è stato ingegnerizzato un dispositivo molto più semplice rispetto a quelli utilizzati per la spettrometria a infrarossi combinata con la regressione lineare multivariata, come il “Fourier transform infrared spectroscopy” (FTIR) normalmente utilizzato nelle procedure di “screening”, inoltre i risultati ottenuti da questo tipo di dispositivo sono altamente accurate. Il congegno in questione consiste in un sensore a infrarossi multi-raggio in associazione con una cella a iniezione in flusso per il rilevamento automatizzato dell’etanolo nel vino, disponibile anche in una versione che permette analisi in sito. Per la validazione della tecnica sopradescritta si è evinto che la precisione di questo strumento è paragonabile se non superiore allo FTIR. La deviazione standard è stata sotto lo 0.2%, ottenuta con l’analisi di 260 bevande alcoliche



diverse. Questo sensore, quindi, risulta perfetto per i protocolli di controllo industriale inoltre presenta la possibilità di essere mobile e di poter essere portato per rilevazioni in situ, permette anche il monitoraggio in tempo reale delle fermentazioni, presentando

Figura 7- Spettrofotometro a infrarossi ALCOQUICK 4000

un tempo di risposta di 60s e un LOD di 0.05 %vol. Il modello preso in esame è stato “Alcoquick 4000” di “Unisensor Systeme” [18].

3.1.8.2 Sensore fotonico

L'altro sensore preso in considerazione è quello fotonico, che però viene presentato attraverso una simulazione attraverso COMSOL. Il sensore usa una fibra di cristallo fotonico che permette una facile progettazione dei parametri dell'area di lavoro, in particolare della posizione e dimensione dei capillari, che a sua volta rende possibile facili modifiche per adattarsi all'uso di alte frequenze dello spettro elettromagnetico, nello specifico dello studio preso in considerazione le onde ad alta frequenza utilizzate sono onde Thera. Le onde Thera rendono possibile una spettroscopia migliore del materiale che deve essere analizzato perché presentano una lunghezza d'onda inferiore rispetto alle onde ottiche. L'architettura del sensore terahertz basato sullo Zonex prevede una regione di rivestimento che presenta una struttura reticolare Kagome semplificata che delimita un core esagonale al quale interno sono presenti capillari circolari di circa 6 μm come indicato nella figura 3. Per la progettazione di un sensore

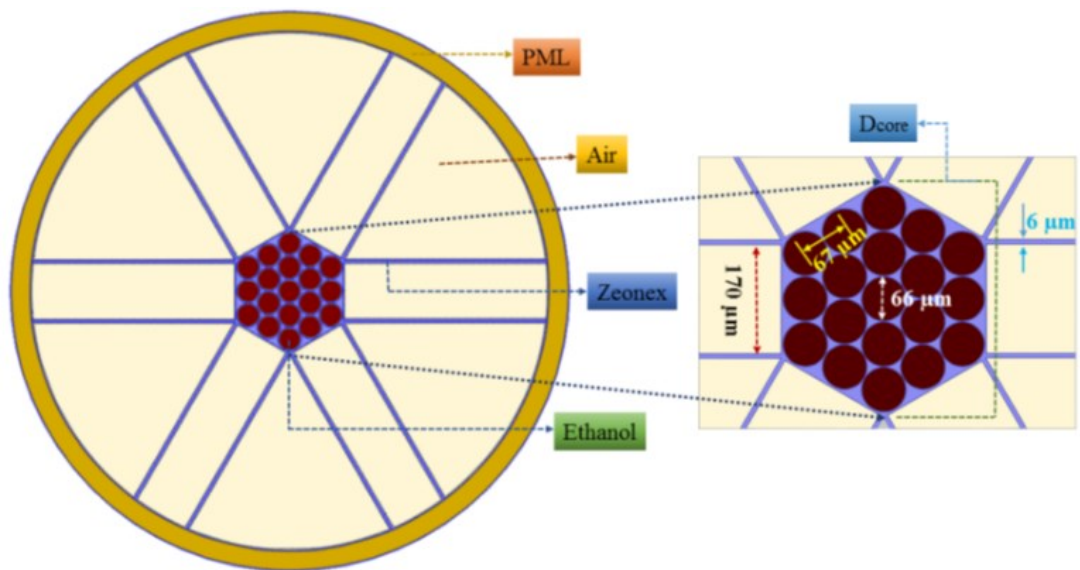


Figura 8- Sezione del sensore fotonico e sua struttura interna [23]

a fibra di cristallo fotonico possono essere utilizzati diversi polimeri ma il polimero di ciclo olefina, commercialmente chiamato Zonex, presenta una perdita per adsorbimento minore rispetto ad altri materiali. La sensibilità relativa del sensore dipende dall'intensità di interazione tra la luce e l'analita da rilevare e per l'etanolo questo sensore arriva ad una sensibilità relativa (teorica) del 88.6% per una frequenza d'onda di 1,9 THz. La sensibilità elevata rende questo sensore adatto alla ricerca di etanolo nelle bevande, inoltre, presenta un notevole vantaggio derivante dalla sua relativa semplicità di fabbricazione, grazie alla

possibilità di stampare in 3d il core e il rivestimento, ma anche dalle sue dimensioni ristrette, che ne permettono una buona applicazione industriale [23].

3.1.9 Sensori fisici per la determinazione dell'alcol etilico

Il sensore fisico preso in considerazione per la determinazione dell'alcol etilico nel vino è quello proposto da Jan Erfkamp, Margarita Guenther e Gerald Gerlach. un sistema sensoriale che si basa sull'utilizzo di un idrogel composto da acrilamide e bisacrilamide, applicati a un sensore piezoresistivo, che fin dalla prima misurazione effettuata ha dimostrato un'alta sensibilità associata a un tempo di risposta relativamente breve. Gli idrogel sono delle reti polimeriche idrofile che presentano la peculiare proprietà di dilatarsi e restringersi a seconda di stimoli vari, ovviamente lo stimolo preso in considerazione per l'applicazione di questo sensore è la presenza di etanolo. La variazione di concentrazione dell'alcol provoca una dilatazione, o rigonfiamento del gel, reversibile, che viene registrato dal sensore piezoresistivo grazie al cambio di resistenza, successivamente, grazie a un circuito a ponte di Wheatstone, il cambiamento registrato viene trasmesso nel segnale di misurazione

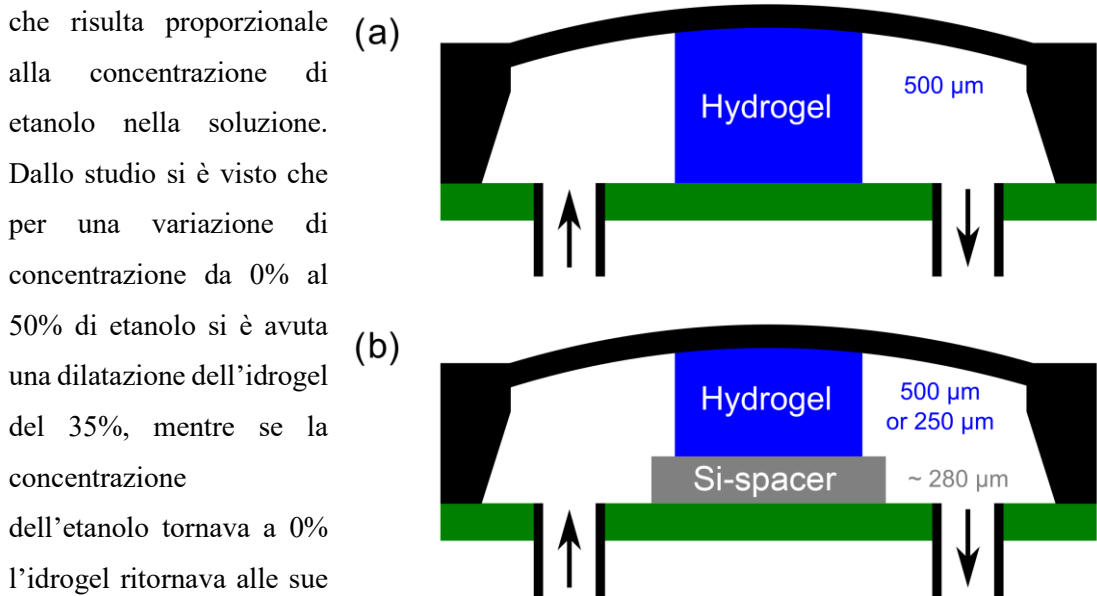


Figura 9- Spaccato del sensore: (a) corpo dell'idrogel dopo la sintesi senza lo spaziatore in silicone, (b) corpo dell'idrogel con spaziatore in silicone.

che risulta proporzionale alla concentrazione di etanolo nella soluzione. Dallo studio si è visto che per una variazione di concentrazione da 0% al 50% di etanolo si è avuta una dilatazione dell'idrogel del 35%, mentre se la concentrazione dell'etanolo tornava a 0% l'idrogel ritornava alle sue dimensioni di partenza. La proprietà dell'idrogel di dilatarsi e tornare alle sue dimensioni iniziali in base alla variazione della concentrazione di alcol etilico può essere spiegata come segue: maggiore è la polarità dell'alcol e minori sono le interazioni con l'idrogel che causano il rigonfiamento. Allo stesso modo nelle soluzioni idroalcoliche si hanno interazioni attrattive tra acqua ed etanolo che sottraggono l'alcol alle interazioni con l'idrogel,

questo provoca un aumento dell'energia libera nelle forze di attrazione polimero-polimero che porta le catene polimeriche a interagire più fortemente tra di loro, causando il restringimento dell'idrogel. Il rigonfiamento indotto dall'etanolo provoca delle pressioni sufficientemente forti per piegare la piastra deformante del sensore di pressione. Il tempo di risposta del sensore dipende dalla cinetica di deformazione dell'idrogel e quindi dalla dimensione dello stesso. L'applicazione nell'industria enologica è interessante in quanto la produzione non è costosa, ha un tempo di risposta rapido (qualche minuto) e ha un'alta sensibilità (0% vol. a 50%vol.) [24].

3.2 Metanolo

3.2.1 Generalità sull'etanolo: provenienza e composizione chimica.

Il metanolo è presente sempre nei vini in quantità piccole, generalmente comprese tra 60 e 150 mg/L, e non ha influenze sensoriali [16]. La formazione di tale composto è da ricercarsi nel processo di idrolisi enzimatica delle pectine, durante la vinificazione, in cui i gruppi metossilici delle pectine vengono scissi per formare acidi pectici [13]. Il contenuto in metanolo dipende quindi dalla quantità di pectine presenti nel mosto durante la vinificazione, poiché le pectine sono contenute principalmente nelle bucce, la durata di contatto tra le bucce e il mosto ne influenza il contenuto. I vini rossi, quindi, presentano un contenuto pectico più elevato rispetto ai vini bianchi e di conseguenza un contenuto di alcol metilico più elevato [13]. L'impiego di enzimi pectolitici durante il processo di vinificazione, per aumentare l'estrazione dal mosto o per facilitare le operazioni di chiarifica, può aumentare la presenza di metanolo nel vino per azione pectinmetilesterasica [13].

3.2.2 Importanza della determinazione del metanolo.

Il metanolo ha un'azione tossica nei confronti dell'organismo umano in quanto per ingestione viene ossidata portando alla formazione di aldeide formica e ad acido formico che sono entrambi dannosi per il sistema nervoso centrale [13]. Le normali pratiche di vinificazione non permettono di raggiungere le dosi di metanolo dannose per l'organismo [20], tuttavia, si sono verificati in passato casi di aggiunte di metanolo nei vini o distillati con l'obiettivo di alzare la gradazione alcolica, a discapito della salute dei consumatori, come ad esempio lo "scandalo del vino al metanolo" verificatosi nel 1986, che provocò 23 vittime e altre decine di persone che riportarono lesioni gravi [c]. Viene quindi proposto un sensore in grado di rilevare e quantificare la presenza di alcol metilico in una soluzione idroalcolica che può essere usato, sia dai produttori per il monitoraggio di tale parametro, durante i processi di

vinificazione e durante l'eventuale distillazione per l'ottenimento di superalcolici derivanti da vini o da prodotti di scarto del processo di vinificazione, ma anche dalle autorità di controllo che se ne possono servire per il controllo e individuazione di eventuali frodi [25]. La presenza di metanolo nei distillati in Europa è regolata dal “REGOLAMENTO (EU) 2019/787 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 17 Aprile 2019”, dove vengono indicate le soglie limiti per ogni categoria di prodotto. Generalmente i laboratori specializzati provvedono alla quantificazione del metanolo con la gascromatografia con detector a fotometria di fiamma, come previsto dal compendio OIV sui metodi di analisi dei mosti e dei vini [b] [16].

3.2.3 Sensore per la determinazione del metanolo.

Viene preso in considerazione il sensore sviluppato da Sebastian Abegg, Leandro Magro, Jan van den Broek, Sotiris E. Pratsinis and Andreas T. Güntner, in quanto è facilmente integrabile con sistemi computerizzati, compatibile con smartphone e consente una determinazione rapida sia del metanolo che dell'etanolo. Il sensore si basa su una colonna di separazione validata su bevande alcoliche reali come vino e birra, la colonna di separazione



Figura 10- Sensore sviluppato da Sebastian Abegg, Leandro Magro, Jan van den Broek, Sotiris E. Pratsinis and Andreas T. Güntne [25]

consiste di particelle Tenax che riescono a ritenere le molecole di etanolo più a lungo rispetto

a quelle di metanolo. La colonna è poi accoppiata ad un sensore chemio resistivo ad alta sensibilità, ottenuta da nanoparticelle di ossido di stagno depositate a fiamma e rivestite di palladio, che rilevano entrambe le molecole sequenzialmente e quindi selettivamente [25]. Grazie al basso consumo energetico il dispositivo può essere azionato in modo discontinuo e quindi può essere alimentato da batterie. Il sensore, grazie alla comunicazione Wi-Fi, è in

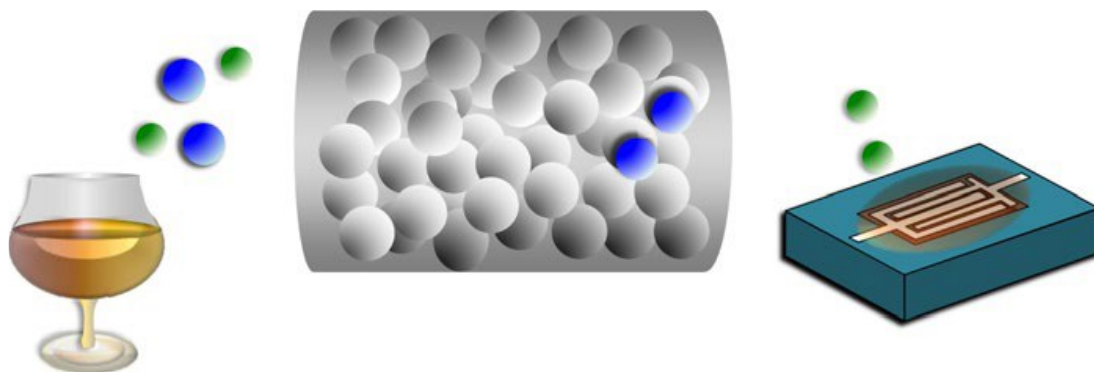


Figura 11 - Principio di ritenzione ed eluizione delle molecole di metanolo ed etanolo da parte delle particelle di Tenax [25]

grado di essere collegato ad uno smartphone per visualizzare la concentrazione di metanolo ed etanolo in tempo reale., in mancanza di una rete invece può essere collegato anche attraverso il Bluetooth. Il principio di funzionamento su cui si basa questo dispositivo prevede il prelievo di un campione dallo spazio di testa del dispositivo nella colonna di separazione, dove il metanolo e l'etanolo sono trattenuti temporaneamente dalle particelle di Tenax. Il metanolo eluisce prima dell'etanolo, permettendo di analizzare e quantificarne la concentrazione, raggiungendo un picco a 1.5 min rispetto all'etanolo che eluisce più lentamente (1.9 min). la contemporanea analisi di entrambi gli analiti è di fondamentale importanza in quanto per la regolamentazione europea la concentrazione legale di metanolo è determinato in funzione della concentrazione di etanolo nel distillato. Il dispositivo è stato valutato con 89 campioni, sia puri che contaminati da metanolo, di distillati, vini e birre e presenta un errore relativo piuttosto basso (12,9%) [25]. L'applicazione di questo sensore risulta interessante per le realtà che prevedono la produzione di distillati a partire da uva e per le agenzie di controllo per il monitoraggio di frodi e adulterazione del vino e derivati.

3.3 Alcoli superiori.

3.3.1 Generalità sugli alcoli superiori e metodi tradizionali di determinazione.

Gli alcoli superiori sono alcoli che possiedono più di due atomi di carbonio, sono per la maggior parte di origine fermentativa. Ci si riferisce solitamente al loro contenuto complessivo

nel vino e sono presenti a dosi variabili da 150 a 550 mg/L [13]. Caratteristica di questi composti è il possesso di odori intensi che possono giocare un ruolo importante nell'aroma dei vini, a bassa concentrazione, ossia meno di 300 mg/L, essi partecipano alla complessità aromatica del vino, mentre a concentrazione più elevata il loro odore penetrante maschera la finezza aromatica, rendendo il vino più "grossolano" [13]. La formazione di questi alcoli può avvenire sia direttamente dagli zuccheri che a partire dagli amminoacidi presenti nel mosto d'uva attraverso la reazione di Ehrlich. Gli alcoli superiori più importanti sono l'alcol isobutilico e gli alcoli amilici. Può quindi risultare interessante la loro rapida determinazione per un monitoraggio dello sviluppo del profilo aromatico del vino, durante la fermentazione, e dei suoi distillati. Il metodo tradizionalmente utilizzato per la loro determinazione è normalmente basato sulla cromatografia, che come specificato più volte questo metodo risulta dispendioso in termini di tempo ed economia. Viene quindi presentato un sensore sviluppato per la determinazione dell'alcol isoamilico in soluzioni contenenti i così detti "fusel oils".

3.3.2 *Sensore amperometrico per la determinazione dell'alcol isoamilico*

Viene proposto come sensore per la determinazione dell'alcol isoamilico quello sviluppato da Mariano, Thiago, Maise Beluomini, e Nelson Stradiotto, che prevede un sensore amperometrico basato sul polipirrolo molecularmente marcato e impresso su un elettrodo di carbonio vitreo, o vetroso, modificato con ossido di grafene ridotto e nanoparticelle di oro. Questo sensore costituisce un metodo rapido, economico ed alternativo per la determinazione dell'alcol isoamilico nelle soluzioni di alcoli superiori. Si basa su un polimero a stampa molecolare che presenta un'alta sensibilità e selettività nei confronti della molecola marcante [26], queste caratteristiche sono principalmente dovute al fatto che la molecola utilizzata come stampo permette la formazione di cavità, nello strato di polipirrolo, che sono altamente selettive nei confronti della molecola ricercata proprio per la forma che le cavità assumono, essendo complementari alla molecola utilizzata come stampo, in alcuni casi queste cavità permettono anche una selezione enantiomerica per alcune molecole [26]. Per la preparazione del polimero a stampa molecolare viene usato l'alcol isoamilico come stampo, mentre come monomero funzionale viene usato il polipirrolo, attraverso un'elettropolimerizzazione si ha l'interazione tra i due che porta all'ottenimento di un polimero altamente selettivo per la molecola target [26]. Viene utilizzato il polipirrolo perché presenta ottime caratteristiche di stabilità, biocompatibilità e conduttività, aggiunte a una facile preparazione e reperibilità del composto [26]. Una problematica riscontrata utilizzando questo polimero riguarda l'adesione all'elettrodo che solitamente è bassa e causa un segnale elettrochimico basso. In questo senso l'uso di nanostrutture permette di superare questo e altre problematiche, che non saranno prese

in esame perché vanno al di là dello scopo di questa tesi; infatti, la superficie degli elettrodi modificati con nanomateriali possiedono un più alto rapporto volume/superficie che aumenta il numero di siti possibili per la stampa molecolare, aumentandone di conseguenza sensibilità e selettività fino a 15 volte rispetto agli stessi elettrodi con superficie liscia [26]. Per quanto riguarda il materiale di cui sono composti gli elettrodi si è visto che i materiali a base di grafene permettono di ottenere superfici ampie e ottime proprietà termiche e meccaniche unite ad alta conduttività [26]. Viene dunque utilizzato l'ossido di grafene per modificare gli elettrodi a carbonio vitreo, soprattutto per il fatto che viene permessa la solubilità in soluzioni acquose e la presenza di gruppi funzionali ossigenati [26]. È possibile ridurre dell'ossido di grafene elettro-chimicamente sulla superficie dell'elettrodo in modo diretto e controllando la quantità di materiale che si deposita, formando l'ossido di grafene ridotto. Con la riduzione dell'ossido di grafene viene ottenuta una migliore conduttività elettrica se comparata all'ossido di grafene [26]. L'aggiunta di nanoparticelle metalliche, infine, migliora le performance elettrocatalitiche e aumenta la conducibilità elettrica dell'elettrodo stesso, che insieme conducono ad una migliore risposta elettrochimica poiché si verifica un trasferimento elettronico più efficiente [26]. L'alcol isoamilico inizialmente utilizzato come stampo viene successivamente rimosso, in modo da permettere ai pozzetti formati di interagire con la stessa molecola, se presente nei campioni analizzati [26]. Il riconoscimento selettivo di questo sensore è dovuto alle cavità che si formano in seguito alla rimozione della molecola stampo, le cavità si formano grazie alla realizzazione di legami specifici che portano all'ottenimento di una struttura tridimensionale che contribuisce altamente al riconoscimento della molecola target [26]. Anche se il sensore presentato è stato testato su campioni di "fusel oils" e campioni contenenti alte quantità di alcol isoamilico, la sua applicazione in campo enologico risulta interessante poiché i risultati ottenuti rappresentano una buona prestazione analitica e possono incoraggiarne un possibile utilizzo in campo enologico e non solo. Il tempo di risposta varia da 30 a 120 secondi con un limite di rilevamento di 8.4×10^{-8} mol/L [26].

3.4 Glicerolo

3.4.1 Generalità sul glicerolo e sua determinazione con metodi tradizionali

Il glicerolo è il composto più presente nel vino dopo l'acqua e l'etanolo ed è il primo prodotto secondario derivante dalla fermentazione alcolica. Il tenore minimo in cui viene riscontrato nei vini è pari a 5 g/L e può raggiungere, in funzione delle condizioni di fermentazione (temperatura e concentrazione di anidride solforosa), valori massimi di 20 g/L [13], soprattutto in quei vini che risultano ottenuti da uve attaccate da marciume nobile. Il

glicerolo viene prodotto per la maggior parte dai lieviti nelle fasi iniziali della fermentazione alcolica, attraverso la via che prende il nome di fermentazione gliceropiruvica, che rappresenta per il lievito l'unico modo per riossidare il coenzima $\text{NADH}+\text{H}^+$ a NAD per riduzione del diidrossiacetone a glicerolo in questa fase [13]. Il glicerolo porta anche alla formazione di composti secondari che hanno un'influenza sul ventaglio aromatico del vino, un esempio potrebbe essere la sua doppia disidratazione ad opera di batteri che lo trasforma in acroleina, la quale in presenza di tannini ci interagisce e provoca un aumento della sensazione gustativa amara, normalmente ritenuto un difetto [13]. Il glicerolo, inoltre, influenza l'aroma del vino impartendo sensazioni di grasso e di morbidezza. Il metodo normalmente utilizzato per la sua determinazione si basa sulla cromatografia liquida previa preparazione del campione attraverso una reazione enzimatica o chimica con ossidasi e perossidasi o con acidi periodici [b] [16] [27], il che richiede la presenza di operatori qualificati e risulta dispendiosa economicamente sia per l'acquisto delle attrezzature necessarie che per il tempo necessario a condurre l'analisi. Vengono quindi proposti in seguito sensori biologici e chimici per una rapida determinazione del glicerolo nei vini che risulti meno costosa e comunque affidabile se comparata alla cromatografia liquida.

3.4.2 Sensori per la determinazione del glicerolo

I sensori per la determinazione del glicerolo nel vino e durante la fermentazione del mosto presenti in letteratura sono principalmente biosensori che si basano sull'utilizzo di enzimi e sulla loro selettività e sensibilità verso questo metabolita. La costruzione di biosensori amperometrici per il riconoscimento e la quantificazione del glicerolo nel vino utilizza diverse composizioni enzimatiche come la glicerolo deidrogenasi pirrolo-chinolina dipendente, glicerolo deidrogenasi/diaforasi, glicerolo chinasi/glicerolo 3-fosfato ossidasi/perossidasi accoppiati a con un sistema che permette di riconoscere e quantificare l'ossidazione del glicerolo che porta alla produzione di perossido di idrogeno, il quale viene direttamente rilevato da elettrodi [27]. L'utilizzo di questi enzimi presenta delle problematiche, ad esempio la glicerolo ossidasi non è disponibile in commercio e quindi deve essere sintetizzata e purificata in laboratorio a partire dal metabolismo di alcuni miceti delle specie *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Botrytis allii* [28]. Altri biosensori proposti, come ad esempio quello basato su glicerolo chinasi co-immobilizzati con glicerolo-3-fosfato ossidasi presenta il problema della stabilità: infatti, dopo 3 giorni di conservazione in soluzione campione, solo il 10% degli enzimi sono rimasti attivi [28]. Per quanto riguarda invece i sensori che si basano sull'uso di glicerolo deidrogenasi, il problema principale risiede nella mancanza del cofattore NAD nella composizione enzimatica, il quale deve essere aggiunto al sistema causando un

aumento dei costi di produzione del sensore [28]. Viene quindi proposto un sensore per la determinazione del glicerolo nel vino che si basa su una composizione enzimatica diversa da quelle elencate (Rastislav Monošík), tutti commercialmente disponibili, e con una stabilità maggiore rispetto ai suddetti sensori. Biosensore amperometrico multi-enzimatico basato su elettrodi planari in oro o in materiali nanocompositi per la determinazione del glicerolo

Il sensore proposto è quello sviluppato da Monošík, Rastislav, Dana Ukropcová, Miroslav Stred'anský, e Ernest Šturdík, che si basa sull'uso di elettrodi planari in oro e nanocompositi. Viene utilizzata una serie enzimatica a "cascata" che consiste in glicerolo chinasi/creatina chinasi/creatinasi/sarcosina ossidasi/perossidasi, tutti immobilizzati in un elettrodo planare d'oro o nanocomposito. Gli enzimi sono disponibili in commercio e stabili. L'obiettivo dello sviluppo di questi sensori e quello di creare un biosensore che può essere utilizzato per effettuare analisi di routine per la determinazione del glicerolo durante il processo di vinificazione [27]. La preparazione dei nanocompositi viene spiegata nell'articolo di riferimento, perciò chi decidesse di approfondire l'aspetto costruttivo può fare riferimento all'articolo elencato in letteratura, poiché ai fini di questa tesi verranno presi in considerazione solamente il principio di costruzione e di funzionamento. Una volta preparato i nanocompositi vengono trasferiti sulla superficie conduttrice, portando alla formazione di un elettrodo modificato che si basa su un elettrodo Ag/AgCl di riferimento [27]. L'immobilizzazione degli Enzimi, sulla superficie dell'elettrodo, è stata effettuata attraverso la deposizione degli stessi tra strati di chitosano, la deposizione successiva viene effettuata una volta asciugato il primo strato. Una volta completato l'assemblaggio il sensore è stato conservato in un essiccatore prima dell'uso. In una soluzione idroalcolica come il vino sono numerose le componenti che possono interferire nell'accuratezza dell'analisi, per interferenza con gli enzimi o per ossidazione diretta sull'elettrodo, in particolare i polifenoli, l'etanolo, alcuni zuccheri e acidi organici. Il sensore è stato quindi testato in condizioni in cui la concentrazione di zuccheri, etanolo e acidi è stata aumentata e si è evinto che non interferiscono in maniera significativa con l'analisi, come d'altronde anche la presenza di polifenoli. I risultati ottenuti dalle analisi effettuate sono stati comparati con i dati ottenuti da una spettrofotometria enzimatica, delineando una buona correlazione tra i dati. I tempi di risposta di entrambi i sensori è di circa 70 secondi con limiti di rilevamento tra 1.96 e 2.24 μM e una ottima stabilità operativa in quanto non si sono verificate perdite di sensibilità per 90 misurazioni consecutive e si è avuta una ritenzione del 90% della sensibilità iniziale dopo 15 mesi di immagazzinamento a temperatura ambiente [27]. Si può quindi concludere che l'utilizzo di una serie consecutiva di enzimi come quella proposta e l'utilizzo di più strati di chitosano per immobilizzare gli enzimi

sull'elettrodo permettono l'ottenimento di un sensore dall'ottima selettività e sensibilità ma anche di buona stabilità sia durante l'utilizzo che durante l'immagazzinamento, rendendolo adatto alla produzione di massa e uso commerciale nel campo enologico.

Tabella 3-Sensori per la determinazione degli alcoli

Analita	Tipo di sensore	Principio	Trasduttore	LOD (Limit of Detection)	Refere nza
<i>Etanolo</i>	Biologico	Enzimatico QH-ADH	Amperometrico	Da 5 mM	[20]
		Enzimatico AOX e HRP		2 mM	[21]
		Microbiologico (lieviti)	Potenzimetrico	5.7 mM	[17]
		Microbiologico (batteri)		0.025 mM	[22]
	Ottico	Rifrattometria	Infrarosso	0.05 % vol.	[18]
	Chimico-fisico	Rifrattometria	Fibra di cristallo fotonico	88.6 % rel.	[23]
	Fisico	Pressione	Piezoresistivo		[24]
<i>Metanolo</i>	Chimico	Ritenzione	Potenzimetrico (?)	Da 0.01 %vol.	[25]
<i>Alcol isoamilico</i>	Chimico	Stampa molecolare	Amperometrico	8.4X10 ⁻⁸ mol/L	[26]
<i>Glicerolo</i>	biologico	Enzimatico	Amperometrico	3.96 μM	[27]

Capitolo 4

COMPOSTI FENOLICI: ANALISI DEI POLIFENOLI

4.1 Generalità sui composti fenolici

I composti fenolici sono un complesso gruppo di composti sintetizzati durante la crescita della pianta, la loro produzione sembra essere una risposta della stessa a situazioni di stress, infatti, agiscono come protettori nei confronti dei raggi UV, essendo i principali componenti dei pigmenti e delle essenze [43]. Sono localizzati per la maggior parte nella buccia e vengono estratti durante il processo di vinificazione, subendo variazioni sensibili della loro struttura durante il processo di affinamento, infatti, inizialmente la quantità di composti fenolici contenuti nel vino dipende principalmente dalla maturità (fenolica) delle uve non che dal processo di estrazione del mosto, per poi mutare durante il processo di affinamento in botte poiché avvengono reazioni chimiche che ne modificano la composizione chimica [13]. I composti fenolici si ritrovano in notevole quantità nel vino, e sono alla base delle principali differenze tra vini bianchi e vini rossi, in particolare nella determinazione delle caratteristiche sensoriali tipiche di quest'ultimi e del loro colore [13]. I polifenoli sono divisi in 2 macrogruppi di cui il principale è quello dei flavonoidi (flavoni, flavonoidi, flavanoli e antociani) mentre il secondo è quello dei non-flavonoidi comprendente gli acidi della serie cinnamica e gli acidi benzoici, le cui formule chimiche sono riassunte nella figura n.

Contribuiscono quindi alla qualità complessiva del vino e alle sue caratteristiche organolettiche, come d'altronde alla stabilità del vino e alle sue capacità antiossidanti [44], in particolare sono responsabili delle sensazioni di astringenza e amaro del vino. I polifenoli possiedono proprietà battericide, antiossidanti, antinfiammatorie, antiallergeniche, anticarcinogeniche, vitaminiche, e protettive nei confronti dell'organismo umano [13] [43], principalmente dovute alla loro attività antiossidante e antiradicale, che sono legate a loro volta alle proprietà redox dei polifenoli stessi [43]. Possono quindi giocare un ruolo importante nella riduzione e neutralizzazione dei radicali liberi e nella decomposizione dei perossidi [43]. Per tutti questi motivi un'analisi rapida che consenta un monitoraggio della quantità e qualità dei

composti fenolici durante il processo di produzione del vino risulta interessante nell'ottica di un' enologia di precisione e nel supporto all' enologo durante le fasi di vinificazione.

4.2 Metodi tradizionali di determinazione dei polifenoli

La determinazione dei polifenoli viene tipicamente eseguita con procedure spettrofotometriche e cromatografiche [16][44], che mirano alla determinazione del contenuto polifenolico totale, come ad esempio il test di Folin-Ciocalteu e l'indice fenolico I₂₈₀ che rappresenta l'assorbanza a 280 nm di un campione di vino diluito, oppure determinazione dei singoli costituenti, volta a determinare il profilo della composizione fenolica del campione in

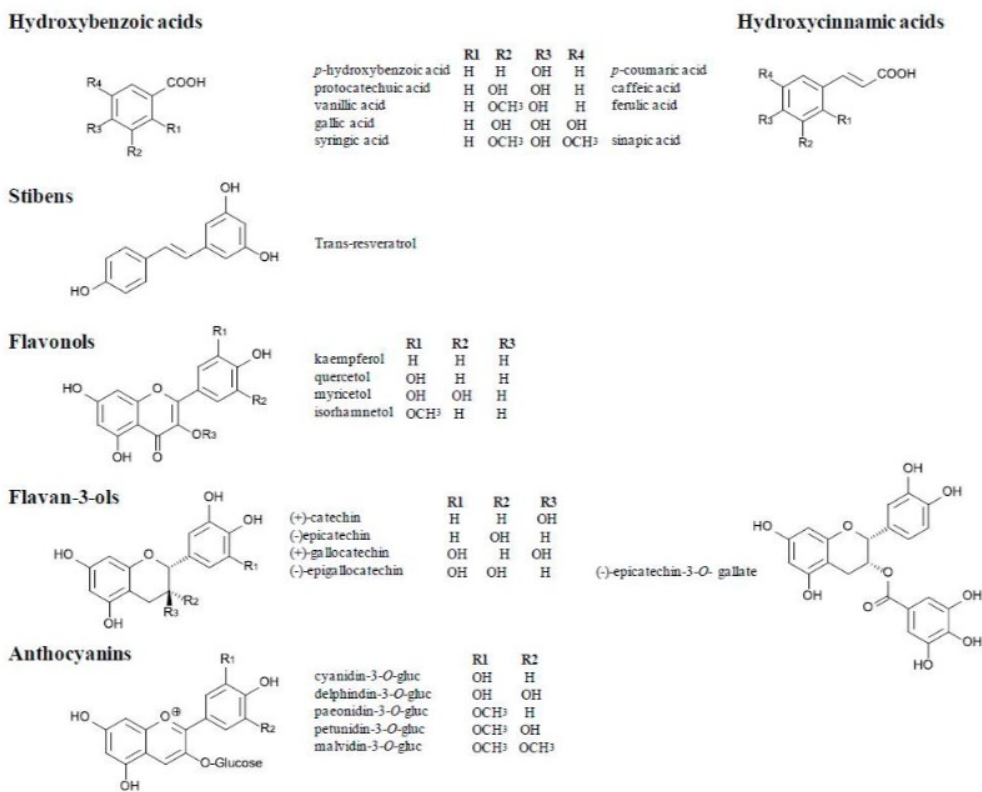


Figura 12-Principali composti fenolici monomerici del vino

esame, attraverso l'uso della gascromatografia. Queste tecniche però necessitano di molto tempo per essere effettuate e necessitano di personale altamente qualificato nonché di reagenti specifici per essere operate [44], anche l'acquisto della strumentazione necessaria ad eseguire queste analisi rappresenta una barriera per le cantine o gli enologi, che necessitano quindi di strumenti che consentano una rapida determinazione in situ del contenuto di polifenoli del vino durante tutte le sue fasi di produzione.

4.3 Biosensori per la determinazione dei polifenoli nel vino

Come accennato nel paragrafo sulle generalità dei polifenoli del vino, questi composti risultano di primaria importanza nella definizione del profilo sensoriale del vino finito e nella sua stabilità organolettica, che si riflette anche nella propensione all'invecchiamento, risulta dunque di primaria importanza la quantificazione di tale parametro con un metodo di analisi che permetta una rapida rilevazione, coadiuvata da una facilità di utilizzo e possibilità di condivisione dei dati ottenuti, nell'ottica di ottimizzare i processi di costruzione di banche dati per la creazione di uno storico delle rilevazioni o di permettere un monitoraggio in tempo reale durante le varie fasi macerazione, fermentazione e affinamento.

I sensori analizzati per la stesura di questa tesi sono raggruppabili in 3 categorie principali: (I) ossidazione diretta dei vini in nel "nudo" elettrodo o in elettrodi modificati con nanomateriali o chimicamente, (II) trasformazione dei composti fenolici a carico di enzimi con la successiva rilevazione amperometrica dei prodotti di reazione o del consumo/produzione di ossigeno/perossido di idrogeno e (III) ossidazione su elettrodi modificati con nanoparticelle biomimetiche [44]. L'identificazione selettiva dei singoli composti presenta delle difficoltà, in particolare il potenziale ossidativo è relativamente simile in questi composti, rendendo impegnativo il loro riconoscimento. Inoltre, quando vengono usati sensori enzimatici il tasso di conversione biocatalitica, operata dalla laccasi, è molto simile per molti fenoli [44]. Ciò nonostante, sono stati sviluppati sensori che utilizzano diverse strategie per discriminare tra molecole simili come, ad esempio, l'utilizzo di materiali selettivi per una sola molecola o classi di molecole. Nei diversi studi affrontati è stato investigato il ruolo di etanolo, glucosio, solfito e acido ascorbico come potenziali interferenti, in particolare sono state messe in atto strategie per aggirare l'ossidazione diretta sugli elettrodi del solfito e dell'acido ascorbico [44].

4.3.1 *Sensori chimici ad ossidazione diretta dei composti fenolici sull'elettrodo*

L'elettro-attività dei composti fenolici rende possibile determinare la loro concentrazione basandosi sull'intensità di corrente registrata al potenziale specifico della loro trasformazione elettrochimica. Data la simile struttura chimica alcuni composti fenolici vengono ossidati a potenziali simili, sulla superficie degli elettrodi, come anche l'acido ascorbico e solfito che possono quindi interferire con la misurazione [44]. Il metodo proposto da Moreno et al. risulta interessante per il monitoraggio dell'andamento della concentrazione dei polifenoli durante i processi di macerazione e fermentazione, ossia i due processi durante i quali si ha la maggiore estrazione dei polifenoli. Viene infatti proposto un metodo di analisi a iniezione di flusso con determinazione amperometrica dei polifenoli su elettrodi modificati con una miscela di

nanotubi in carbonio e polivinilpirrolidone. La sensibilità e l'eccellente stabilità di segnale hanno permesso di stimare l'indice elettrochimico che ha una buona correlazione con i dati ottenuti sugli stessi campioni con metodi spettrofotometrici. Infine, sottoponendo il voltammogramma all'analisi delle componenti principali si è notato che i segnali amperometrici ottenuti dalle varie analisi posseggono delle informazioni latenti che caratterizzano il vino in base alla varietà delle uve [45]. Un aspetto negativo però è il fatto che il sensore è stato testato solo su vini bianchi, dove la concentrazione polifenolica è molto più scarsa, rispetto ai rossi. A questo proposito Alberto Sánchez Arribas et al. hanno proposto un metodo di determinazione dei polifenoli attraverso l'analisi in iniezione di flusso con un rilevamento amperometrico operato da un elettrodo in carbonio vitreo modificato con nanotubi in carbonio dispersi in polietilenimmina [46], testato prima in soluzioni contenenti diverse concentrazioni di acido gallico, caffeico, cumarico e ferulico, per monitorarne la risposta, e poi testato su campioni di vino bianco e rosso [46]. Il sensore ha dimostrato una buona stabilità durante le operazioni di analisi, protezione contro le incrostazioni derivanti dall'adsorbimento dovuto all'ossidazione diretta dei polifenoli sull'elettrodo e contro la passivazione. Dopo un periodo di test durato 4 giorni, dove ogni giorno venivano testati 40 vini, la sensibilità del sensore è diminuita fino al 70% del valore iniziale e rappresenta una stabilità adatta al monitoraggio della fermentazione. Inoltre, è possibile rilevare la frazione polifenolica facilmente ossidabile o il contenuto totale di polifenoli semplicemente impostando il valore del potenziale [46]. Per quanto riguarda le interferenze non sono state riscontrate risposte all'etanolo, acidi organici o zuccheri e solo un piccolo aumento del segnale, circa il 4 %, è stato osservato in presenza di 0.1 g/L di solfito [46]. Inoltre, i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti con il test di Folin-Ciocalteu ($R^2=0.981$) e con l'indice polifenolico I_{280} ($R^2=0.988$) denotandone una buona correlazione. Infine, Zhanga Ji-Wei et al. nel 2020 hanno proposto un metodo di determinazione dell'acido caffeico nei vini rossi utilizzando un rilevamento amperometrico che prevede l'utilizzo di un elettrodo in carbonio vitreo ricoperto di un materiale composito formato da grafene e SnO_2 . Il sensore è stato testato in soluzioni contenenti acido caffeico per monitorarne il comportamento, e nei confronti dei principali interferenti, dando ottimi risultati e confermando l'ottima selettività nei confronti dell'acido caffeico [47]. Per quanto riguarda la stabilità si è visto che solo il 6,2% del picco di corrente si è ridotta dopo 100 cicli, per quanto riguarda la riproducibilità e la stabilità nel tempo si evince dalle investigazioni svolte che dopo 5 analisi consecutive condotte sotto le stesse condizioni, non ci sono state differenze significative. La stabilità nel tempo, utile in fase di immagazzinamento, è stata studiata lasciando esposto il sensore per 1 mese all'aria, ottenendo

solo il 4,6% di diminuzione del picco di corrente dopo il primo mese. Dopo le analisi dei vini la percentuale di recupero delle funzionalità è stata nel campo del 93-103.9%. mentre il limite di rilevamento è di circa 80 nM [47]. Questi dati dimostrano l'ottima propensione del sensore ad essere impiegato nei processi di fermentazione e macerazione.

4.3.2 Biosensori enzimatici per la determinazione dei composti fenolici

I biosensori amperometrici per la determinazione del contenuto polifenolico del vino utilizzano principalmente 3 enzimi: (1) la Tirosinasi, che catalizza l'ossidazione di monofenoli e O-difenoli a chinoni in presenza di ossigeno, (2) la laccasi che catalizza l'ossidazione di mono e polifenoli, insieme a tioli e ammine aromatiche che portano all'ottenimento di radicali fenossi, che a loro volta possono essere ossidate a chinoni. (3) e la perossidasi di rafano che agisce come catalizzatrice nell'ossidazione di fenoli in presenza di perossido di idrogeno [44]. Ai fini della stesura di questa tesi i verranno presi in considerazione solo sensori che utilizzano la laccasi come mediatore enzimatico. Il motivo di questa scelta può essere spiegato attraverso le caratteristiche dei diversi mediatori enzimatici: la laccasi ha una specificità più larga e una stabilità maggiore se paragonata alla tirosinasi, inoltre confrontandola con la perossidasi del rafano, che presenta una risposta ad una più ampia serie di composti polifenolici, il vantaggio risiede nella semplicità di reazione, infatti non è richiesta l'aggiunta di alcun reagente, a differenza della perossidasi che richiede invece l'aggiunta di perossido di idrogeno [44]. Il primo sensore presentato è quello proposto da Melissa M. Rodríguez-Delgado et al. che propone appunto un biosensore per la determinazione dei composti fenolici che utilizza la laccasi come mediatore enzimatico. Chawla et al. propongono un sensore per la determinazione dei polifenoli basato sull'azione della laccasi immobilizzato su un elettrodo in oro grazie ad una miscela complessa costituita da particelle di rame, chitosano, nanotubi in carbonio a multiparete e polianilina [48]. Il sensore ha presentato un'ottima sensibilità di rilevazione, di 0.156 μM per il guaiacolo e un tempo di risposta molto rapido, circa 4 secondi. Il sensore è stato utilizzato per 300 misurazioni in un arco di 7 mesi, perdendo solo il 20% della sua attività iniziale. Anche se il sensore non è stato testato direttamente sul vino ma su foglie di tè e bevande alcoliche, principalmente whiskey, e formulazioni farmaceutiche, sembrerebbe adatto anche per un utilizzo enologico nelle fasi di fermentazione, macerazione.

Un altro sensore interessante di più recente introduzione è quello proposto da Zrinski et al. che propone un biosensore ad alta sensibilità basato sulla laccasi immobilizzata su un elettrodo serigrafico in carbonio attraverso di una miscela di nanoparticelle d'oro e nanoplastine in grafene [49]. Il sensore dimostra una eccellente attività elettrocatalitica nei confronti dell'ossidazione dell'idrochinone in una soluzione tampone fosfatata, è stato testato anche in

campioni reali di vino e succo di mirtilli e successivamente comparata con metodi spettrofotometrici, mostrando una buona correlazione con i dati ottenuti [49]. Il limite di rilevamento, riferito all'idrochinone è di 1.5 μM , mentre la ripetibilità dei test è stata investigata su un numero di 5 rilevazioni senza una significativa perdita di corrente nemmeno se usato 5 giorni dopo [49]. Va notato però che non si hanno ulteriori informazioni sulla durata del sensore e della sua stabilità per periodi superiori a quelli citati, anche se il periodo di attività indicato lo rende utilizzabile nella fase fermentativa della vinificazione.

4.3.3 *Determinazione dei polifenoli per azione biomimetica dei nanomateriali*

È stato introdotto un innovativo metodo di determinazione dei polifenoli nel vino grazie all'uso di nanoparticelle di cerio. Il lavoro presentato da Andrei et al. propone un sensore usa e getta elettrochimico basato sulle nanoparticelle di Cerio. Queste nanoparticelle posseggono due stati di ossidazione, Ce^{+3} , Ce^{+4} , che permettono al cerio di agire come catalizzatori, ossidando i composti fenolici e producendo derivati semichinonici attivi, simili a quelli prodotti da laccasi e tirosinasi mimandone l'attività., la più alta reattività si ha con i composti facilmente ossidabili con una funzione o-diidrossi [50]. I chinoni ottenuti cataliticamente possono formare un complesso di trasferimento di carica con il nano-cerio aumentando la concentrazione locale del chinone reattivo sulla superficie dell'elettrodo aumentando di conseguenza la sensibilità. Inoltre, i sensori che utilizzano queste nanoparticelle non sono suscettibili a variazioni di temperatura e denaturazione, rendendo i sensori più stabili e duraturi [50]. Le nanoparticelle vengono quindi colate a goccia sull'elettrodo di un elettrodo serigrafico in carbonio. La facilità e il basso costo di produzione di questo sensore, anche se usa e getta, sono accoppiati ad una buona sensibilità, nell'ordine di $\mu\text{mol/L}$, e ad una interferenza da parte di altre molecole insignificante [50].

Più recentemente Tortolini et Al. hanno comparato le proprietà elettrochimiche e sensibilità all'acido gallico, acido caffeico, acido ascorbico, quercitina e trans-resveratrolo e successivamente per la determinazione dell'attività ossidante di 12 campioni di vini rossi e bianchi, di diversi tipi di biosensori enzimatici e con nanoparticelle di Cerio [51]. Dal confronto si è evinto che il sensore con la sensibilità migliore è stato quello costituito da un elettrodo serigrafico usa e getta modificato con nanoparticelle di cerio e nanotubi in carbonio a multi-pareti funzionalizzato con acidi carbossilici e nanoparticelle super magnetiche di Fe_3O_4 . Il limite di rilevamento è di 7 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 9 $\mu\text{mol/L}$, 8 $\mu\text{mol/L}$, 7 $\mu\text{mol/L}$, rispettivamente per acido gallico, caffeico, quercitina, trans resveratrolo e acido ascorbico, i dati ottenuti per la determinazione del contenuto polifenolico totale è stata positivamente correlata alla capacità antiossidante totale determinata con la TEAC ossia con un metodo

spettrofotometrico [51]. Questo sensore risulta interessante per il controllo dei polifenoli dopo il processo di fermentazione e/o macerazione.

Capitolo 5

DIFETTI DEL VINO E SOSTANZE PERICOLOSE

5.1 Difetti del vino dovuti alle interazioni microbiche

I progressi nel campo enologico hanno permesso il miglioramento della qualità dei vini e la valorizzazione della specificità delle diverse varietà in relazione alle condizioni ambientali, in una sola parola il *terroir* caratteristico di ogni vigneto. L'ottenimento di vini di alta qualità e sani è possibile pressoché ovunque ed è la qualità delle uve il fattore essenziale che ne distingue la bontà nella degustazione [13]. Va anche accennato il fatto che l'aumento della qualità del vino ha portato ad una tecnica di assaggio sempre più rigorosa e attenta alle deviazioni organolettiche minori, che fanno perdere qualche punto alla qualità del vino senza comprometterla irrimediabilmente [13]. In casi più gravi la presenza di difetti può portare a significative perdite economiche principalmente dovute al costo dell'immagazzinamento e della distruzione del prodotto. In generale le tecniche di monitoraggio utilizzate fino a questo momento sono principalmente analisi olfattivo-sensoriali effettuate personalmente dall'enologo che però è in grado di rilevarne la presenza quando i difetti sono già presenti e i microrganismi già sviluppati. In alternativa, possono essere eseguite conte microbiche su piastra, caratterizzazioni microscopiche, o analisi biochimiche, che però richiedono personale specializzato e strumentazioni costose. Questo capitolo è quindi dedicato alla rilevazione dei principali difetti gustativi e olfattivi dovuti alle interazioni dei microrganismi quali i batteri acetici, come *Acetobacter*, lattici come ad esempio, il genere *Lactobacillus* e i lieviti come *Brettanomyces bruxellensis* e *Botrytis cinerea* attraverso l'uso di sistemi sensoristici, caratterizzati da un rapido rilevamento e una buona affidabilità.

5.1.1 Lingua elettronica per il simultaneo rilevamento di difetti del vino rosso

Paup et al. hanno confrontato una lingua elettronica e profilazione sensoriale rapida sulla valutazione dei cambiamenti di un vino rosso nel tempo, in seguito all'inoculo di diversi microrganismi apportanti difetti. I microrganismi inoculati sono stati *Brettanomyces bruxellensis*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus parvulus*, *Acetobacter pasteurianus*. La lingua elettronica utilizzata è stata la Alpha MOS della Astree electronics, quindi una lingua

elettronica commercialmente disponibile [51]. La lingua elettronica Astree Alpha MOS



utilizza sette sensori selettivi rivestiti in policarbonato che selezionano ioni o composti diversi associati ai cinque gusti di base, oltre a speziato e metallici. I vini sono stati analizzati settimanalmente fino al 42° giorno utilizzando la lingua

Figura 13-Lingua elettronica Astree Alpha MOS elettronica, la profilazione sensoriale e la conta in piastra, per relazionare i difetti osservati con lo sviluppo dei microrganismi. I risultati hanno evidenziato che la lingua elettronica è riuscita a discriminare tra i vini inoculati a partire dal giorno 21, con un indice di discriminazione del 91%, mentre la profilazione sensoriale ha iniziato a discriminare i vini a partire dal giorno 28 [51]. Dall'esperimento si evince come l'utilizzo della lingua elettronica può essere considerata uno strumento che permette il rilevamento precoce dei principali difetti del vino dovuti a microrganismi, costituendo un aiuto per gli enologi che sono in grado di agire tempestivamente evitando perdite economiche.

5.1.2 Difetti dovuti a *Brettanomyces*

I difetti dovuti a *Brettanomyces bruxellensis* sono dovuti alla produzione di etilfenoli e vinilfenoli. I vinilfenoli si ottengono per la decarbossilazione enzimatica, da parte della cinammato decarbossilasi, dell'acido *p*-cumarico e ferulico che rispettivamente portano all'ottenimento del 4-vinilfenolo e 4-vinilguaiacolo i quali grazie all'azione della vinilfenol reduttasi vengono trasformati nei corrispondenti degli etilfenoli. Questi composti apportano al vino caratteristiche aromatiche altamente negative, come odore di stalla o sudore di cavallo, speziato, vernice e presentano delle soglie olfattive estremamente basse che a seconda della molecola variano da un minimo di circa 400 µg/L a 720 µg/L [13][51]. Di conseguenza, il rapido riconoscimento dei metaboliti dei microrganismi che provocano alterazioni risulta cruciale al fine di porre rimedio il più precocemente possibile, in modo da evitarne l'ulteriore sviluppo. Villalonga et al. propongono un biosensore usa e getta per la rilevazione di *Brettanomyces bruxellensis* che ne permette anche la quantificazione. Il sensore usa nanoparticelle super-paramagnetiche di Fe₃O₄@SiO₂ (NanoCaptors) funzionalizzate con

biorecettori specifici, come la Concanavalina A, per l'analisi dei lieviti totali e anticorpi policlonali specifici per *Brettanomyces* [52]. Come elemento di segnalazione è stata usata Concanavalina A perossidasi mentre come interfaccia sensibile è stato proposto l'uso di un elettrodo serigrafico [52]. Questo sistema permette il rilevamento amperometrico di *B. bruxellensis*, testato in soluzioni campione e campioni di vino, con un limite di rilevamento di 6 CFU/ml e 8 CFU/ml, rispettivamente e la quantificazione dei lieviti totali nel campo di 10^1 - 10^6 CFU/mL con un limite di rilevamento di 5 CFU/ml [52]. Questo sensore risulta molto adatto alla verifica della presenza di *Brettanomyces* nel caso di fermentazioni stentate, dove la conta dei lieviti totali e del numero di unità formanti colonia del patogeno possono dare un'indicazione del loro sviluppo rapportato alla fermentazione alcolica. In alternativa il sensore può essere utilizzato prima e durante la fase di affinamento per monitorarne l'eventuale insorgenza.

5.1.3 Difetti dovuti a batteri lattici e *Acetobacter*

I difetti dovuti a batteri lattici e acetici apportano diversi difetti sensoriali. *L'Acetobacter* porta alla formazione eccessiva di acido acetico dovuta principalmente all'ossidazione dell'etanolo, caratterizzando il difetto dell'accescenza o spunto acetico, facendo assumere al vino caratteristiche negative che richiamano appunto l'aceto. I batteri lattici possono apportare difetti diversi in base al substrato metabolizzato, ad esempio il difetto del girato, dovuto principalmente alla degradazione dell'acido tartarico, amaro dovuto alla degradazione del glicerolo e il difetto del filante o grasso, che rende il vino viscoso ed oleoso [13]. In generale lo sviluppo anormale di batteri lattici e acetici è accumulato da un innalzamento dell'acidità volatile, quindi della concentrazione dell'acido acetico, e talvolta può avvenire simultaneamente, soprattutto in casi di fermentazioni stentate o in seguito ad arresti di fermentazione alcolica, dove i batteri lattici e acetici hanno accesso agli zuccheri per il loro accrescimento [13]. Il monitoraggio dello sviluppo di questi batteri viene eseguito attraverso la rilevazione e quantificazione dell'acido acetico, i quali sensori sono stati esposti nell'apposito capitolo (2.3.1).

5.1.4 Rilevamento di *Botrytis cinerea*

L'indicatore di una potenziale infezione da parte di *Botrytis cinerea* è la concentrazione di acido gluconico nell'uva e nel mosto, infatti, i mosti e i vini provenienti da uve colpite dalla botrite contengono acidi derivati dall'ossidazione della funzione aldeidica o della funzione alcolica primaria del carbonio N°1 dei chetosi, come ad esempio l'acido gluconico che corrisponde al glucosio [13]. La sua concentrazione permette di discriminare tra vini ottenuti

da uve attaccate da muffa grigia e vini derivanti da uve colpite da muffa nobile, infatti, se si tratta di muffa grigia l'acido gluconico è presente in concentrazioni elevate, fino a 3 g/L [13]. Un attacco da parte della botrite è ovviamente riscontrabile ad occhio nudo attraverso l'osservazione della sintomatologia che questo patogeno provoca, come ad esempio l'estrusione dei corpi fruttiferi del fungo dagli acini, ma determinare l'entità dell'attacco e i potenziali danni che essa apporta al mosto è possibile solo attraverso analisi specifiche. A questo proposito la determinazione della concentrazione di acido gluconico viene effettuata attraverso l'utilizzo di tecniche tipiche della quantificazione degli acidi, come ad esempio la cromatografia liquida, la spettroscopia e saggi enzimatici [53], tutti metodi costosi e che richiedono sia personale specializzato, che tempo.

I biosensori disponibili sono tutti biosensori enzimatici che possono essere divisi in base all'enzima che utilizzano: la gluconato deidrogenasi e una serie enzimatica composta da gluconato chinasi e 6-fosfo-d-gluconato deidrogenasi. Essendo però la gluconato deidrogenasi difficile da reperire commercialmente, per la stesura di questa tesi è stato proposto il biosensore basato sulla serie enzimatica, sviluppato da del Torno-de Román. Il sensore in questione permette la rilevazione amperometrica dell'acido gluconico attraverso l'utilizzo di un elettrodo serigrafico sulla quale superficie sono stati immobilizzati la gluconato chinasi e 6-fosfo-d-gluconato deidrogenasi in una matrice di gluteraldeide e sieroalbumina bovina [53]. Il sensore è stato testato con campioni reali di vino senza che venisse pretrattato, con un limite di rilevamento di 7.46µM. Il sensore trova applicazione nelle fasi pre-fermentative durante l'accertamento dello stato sanitario delle uve.

5.2 Sostanze tossiche nel vino provenienti dal metabolismo dei microrganismi

Il metabolismo dei microrganismi presenti nel mosto e nel vino può apportare al vino composti tossici per l'organismo umano. Questo è il caso dell'ocratossina A e delle ammine biogene.

5.2.1 Generalità sull'ocratossina A e metodi tradizionali di rilevamento

L'ocratossina A (OTA) è un metabolita secondario prodotto da diverse specie fungine appartenenti al genere *Aspergillus* e *Penicillium*, comunemente presenti sulla superficie dell'acino d'uva [54]. Questa molecola ha, negli ultimi anni, destato molto interesse per i suoi effetti sulla salute umana, infatti sembrerebbe avere un'azione immunosoppressiva, teratogenica e carcinogenica [54]. Per questo motivo l'unione europea ha limitato la sua presenza a 2 µg/L nei vini. I metodi comunemente utilizzati per la sua determinazione sono

dei test ELISA (Enzyme-linked immune sorbent assays) e mediante purificazione con colonnine di immunoaffinità e successiva separazione in HPLC (cromatografia liquida ad alta pressione) con rivelazione FLD (detector fluorimetrico) [b], tutti metodi che richiedono molto tempo per essere effettuati, necessitano strumenti sofisticati e personale altamente specializzato.

5.2.1.1 Determinazione e rilevazione dell'ocratossina A mediante l'uso di sensori

Il sensore proposto da Xiaoyan Li et al. risulta molto interessante per la determinazione rapida ed affidabile della concentrazione dell'OTA prima della commercializzazione del vino o nel caso si sia verificata un'infezione da parte di *Aspergillus* o *Penicillium* ma anche per il controllo del prodotto da parte di organismi statali ufficiali. Il sensore proposto è un sensore impedimetrico "label free" basato su un film in idrogel in nanofibre di dipeptide e chitosano, accoppiato a DNA immobilizzato con aptameri per il riconoscimento dell'ocratossina A. Il sensore è stato testato in soluzioni campioni contenenti ocratossina A e campioni reali di vino bianco, mostrando una ottima sensibilità alla molecola, dovuto all'alta specificità di legame tra l'aptamero e l'ocratossina, con un limite di rilevamento di 0.03 ng/mL [54].

Un altro sensore basato sull'uso di aptameri è quello proposto da Nekrasov et al. che propongono un sensore basato sull'uso di aptameri immobilizzati su una matrice di transistor ad effetto di campo in grafene, integrati in un unico chip [55]. Questo sensore è stato studiato per la determinazione in tempo reale della presenza e quantificazione dell'ocratossina A e infatti presenta un tempo di risposta di 50s. Anche la sensibilità è ottima con addirittura un limite di rilevamento 1.4 pM [55].

5.2.2 Generalità sulle ammine biogene e metodi tradizionali di rilevamento

Le ammine biogene sono un gruppo di composti biologicamente attivo, molto diffuse in natura, derivano principalmente dalla decarbossilazione del corrispondente precursore amminoacidico, essendo catalizzata da una decarbossilasi specifica prodotta dalla flora microbica del vino durante la fermentazione alcolica, fermentazione malolattica e affinamento (nel caso in cui il vino sia entrato in contatto con organismi positivi alla decarbossilasi) [56]. La concentrazione delle ammine biogene è regolamentata in alcuni paesi del mondo e d'Europa, usando i livelli di istamina come marker per la sicurezza e qualità del vino. I limiti in mg/L per alcuni paesi europei sono: 10 per Svizzera e Austria, 8 in Francia, 5-6 in Belgio, 5 in Finlandia, 3 in olanda e 2 in Germania [56]. Questi composti se assunti in dosi superiori a 20 mg/L possono avere effetti indesiderati sulla salute e provocare intossicazioni alimentari con effetti di stampo allergico. Attualmente i metodi utilizzati per la determinazione delle

ammine biogene sono la cromatografia liquida ad alte prestazioni, fluorimetria e tecniche spettrofotometriche [57] [b]. Tutte tecniche costose che necessitano di pretrattamento del campione e di personale altamente specializzato.

5.2.3 *Sensori per la quantificazione delle ammine biogene nel vino*

Nel caso di esportazioni di vino, in alcuni paesi la determinazione delle ammine biogene è un'analisi obbligatoria previa commercializzazione. A questo proposito per gli organismi di controllo ufficiali, o per l'enologo che voglia verificare o quantificare la presenza delle ammine biogene in seguito a fermentazioni stentate/bloccate o per verificare che i livelli di concentrazione delle ammine biogene non sia superiore ai limiti legali presenti nei paesi in cui in vino è stato esportato. L'utilizzo di strumenti che permettono la determinazione rapida dell'istamina, che viene presa come marcatore della presenza delle ammine biogene, risulta di fondamentale importanza; quindi, per la scrittura di questa tesi sono stati selezionati 2 sensori basati sull'utilizzo di un polimero molecolarmente stampato, che assicura una ottima selettività e ripetibilità delle analisi nel tempo.

Il primo sensore presentato è quello di Li et al. che presenta delle nanoparticelle d'oro elettrodepositare sulla superficie di un elettrodo in carbonio vitreo su cui è stato successivamente immobilizzato un polimero molecolarmente stampato attraverso l'elettropolimerizzazione. L'istamina è stata usata come molecola stampo per l'ottenimento del polimero, mentre come monomero funzionale è stato utilizzato acido p-amminobenzen solfonico. Il sensore presenta un limite di rilevamento di 0.6 μM ed è stato testato su campioni reali di vino e birra ottenendo risultati ben correlati con la cromatografia liquida ad alte prestazioni, confermandone l'adeguatezza di utilizzo nel monitoraggio rapido di campioni di vino [58], inoltre il recupero dopo l'utilizzo si attesta in un range dell'89.6-100.2% dimostrando una buona attitudine alla ripetibilità.

Il secondo sensore basato sull'utilizzo di un polimero a stampa molecolare viene proposto da Herrera-Chacón et al. presentando un sensore voltammetrico per il rilevamento della quantità di istamina nel vino. Le particelle di polimero molecolarmente stampato sono state sintetizzate e integrate in elettrodi in composito di grafite ed epoxy usando una matrice di immobilizzazione in sol-gel [58]. Il sistema così caratterizzato è stato dapprima confrontato con un elettrodo senza lo strato di polimero stampato e successivamente comparato con i metodi di riferimento, metodi fluorimetrici, per l'analisi di campioni reali di vino. Anche la selettività nei confronti dell'istamina e composti simili, ritrovabili nel vino, è stata analizzata per verificare la presenza ed entità delle interferenze. In generale il sensore ha dimostrato un limite di rilevamento di 0.19 $\mu\text{g/mL}$, una buona discriminazione dell'istamina negli studi

sull'interferenza, in quanto il segnale derivante dall'istamina era chiaramente distinguibile da quelli delle molecole indagate, e infine la comparazione con il metodo fluorimetrico ne mostra un'ottima relazione [58]. Infine, la ripetibilità delle analisi è stata testata con analisi nello stesso giorno (12 analisi) e su più giorni ottenendo una deviazione standard pari a 4.26%, indicando una buona ripetibilità delle misurazioni per il sensore in questione.

Capitolo 6

ANIDRIDE SOLFOROSA

6.1 Generalità sull'anidride solforosa e metodi tradizionali di quantificazione.

L'anidride solforosa o diossido di zolfo è diffusamente impiegata nella produzione dei vini per via delle sue numerose proprietà che la rendono indispensabile nella pratica di cantina. L'assenza totale del diossido di zolfo nel vino risulta eccezionale poiché il lievito stesso durante la fermentazione ne produce deboli quantità che variano da 10 a 30 mg/L. Le proprietà più importanti della solforosa sono 4: (1) azione antisettica, inibisce lo sviluppo dei microrganismi, (2) azione antiossidante, ossia si combina con l'ossigeno disciolto e permette di proteggere i vini dall'ossidazione di natura chimica e dall'ossidazione della componente fenolica/aromatica, (3) effetto antiossidasico, ovvero inibisce istantaneamente l'azione degli enzimi ossidasici e se necessario ne consente la successiva distruzione, (4) si combina con molecole come l'etanal e simili, proteggendo l'aroma dei vini ed eliminando la nota di svanito [13]. Nonostante tutte queste caratteristiche positive la tendenza negli ultimi anni, sia da parte della ricerca enologica sia da parte dei produttori, è quella di ridurre le dosi di impiego, principalmente per l'effetto sulla salute. L'OMS (organizzazione mondiale della sanità) ha infatti fissato l'assunzione giornaliera a 0.7 mg/kg/gg, ossia una dose che varia da 45 a 56 mg al giorno in funzione del peso corporeo [13]. Dose che viene ampiamente superata anche da metà bottiglia di vino se pensiamo che le dosi massime consentite per i vini nell'unione europea sono di 150 mg/L per i vini rossi e 200 mg/L per i bianchi, come descritto nel Reg. CE 606/2009 [13]. La tendenza a utilizzare dosi di diossido di zolfo sempre minori è testimoniato dal fatto che in Francia la quantità media di anidride solforosa è di 75 mg/L per i vini rossi e 105 mg/L per i vini bianchi [13].

6.1.1 Metodi tradizionali di determinazione della SO_2

L'anidride solforosa nel vino è presente sotto diverse forme, la forma libera ossia le forme della SO_2 non legate ad altre molecole quali la SO_2 molecolare, la forma più attiva e che

presenta tutte e quattro le proprietà elencate nel paragrafo precedente, e lo ione bisolfito, la forma maggiormente frequente al pH tipico del vino [13]. Per quanto riguarda invece la forma combinata, il diossido di zolfo è in grado di fissarsi alle molecole aventi un gruppo carbonilico secondo una reazione reversibile [13]. La somma tra le quantità delle due forme della SO_2 dà la SO_2 totale. Ai fini legislativi, in Europa il contenuto in solforosa totale dei vini deve essere regolato dal Reg. CE 606/2009 per il quale il tenore di diossido di zolfo totale deve essere inferiore a 150 mg/L nei vini rossi e 200 mg/L nei bianchi con eccezioni per alcune categorie di vini particolari come, ad esempio, gli spumanti e i vini attaccati da muffa nobile. I metodi tradizionalmente utilizzati per la determinazione dei solfiti nei vini sono titolazioni per via di distillazione come indicato dall'OIV nel compendio internazionale dei metodi di analisi, nella sezione 3.2.3 relativa ai composti non organici presenti nel vino [b] [16]. Dunque, un metodo che consenta una rapida e affidabile determinazione della solforosa nel vino risulterebbe di grande utilità nei contesti di analisi per il controllo del rispetto delle normative, da parte degli organismi di controllo ufficiali, e nelle fasi del processo di vinificazione e affinamento.

6.2 Sensori per la determinazione della solforosa

6.2.1 Sensori elettrochimici per la determinazione dell'anidride solforosa libera e totale

Begum et al. propongono 2 sistemi per la determinazione della SO_2 nei vini, il primo è un sensore elettrochimico che si basa su un chip modificato con polianilina, attraverso l'elettropolimerizzazione, che resiste l'adsorbimento non specifico per i componenti del vino come SO_2 , acidi fenolici e organici [59]. Il secondo invece è un apparato miniaturizzato che permette di applicare il metodo di Rankine in modo più agevole, ossia, in situ e con tempi di risposta rapidi. Il sensore elettrochimico basato sul chip modificato con la polianilina è stato

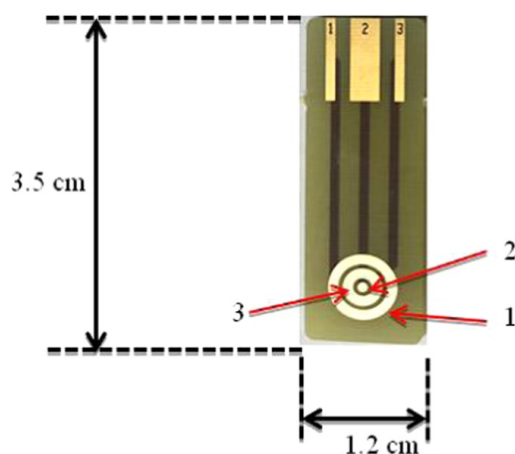


Figura 14-Sensore basato sul chip modificato con polianilina [59]

testato per la determinazione della SO_2 attraverso l'uso dei metodi elettrochimici, in particolare la voltammetria ciclica, dal quale si è evinto che, l'analisi della SO_2 può essere effettuata anche in presenza dei polifenoli e può essere utilizzata per stimare la SO_2 libera presente, nel vino o mosto, al momento dell'analisi senza necessità di pretrattare il campione [59]. Il secondo dispositivo invece permette di effettuare il metodo Rankine per la determinazione della concentrazione della SO_2

totale nel vino, l'analisi consiste nella distillazione in condizioni acide, ottenute attraverso acidificazione del vino utilizzando H_3PO_4 e la successiva titolazione con una soluzione alcalina previa ossidazione della SO_2 a H_2SO_4 , utilizzando il perossido di idrogeno [59]. Il dispositivo studiato permette di fare tutto questo rapidamente e nel luogo dove è necessario performare l'analisi grazie all'uso del chip sensore con polianilina che grazie all'uso della voltammetria ciclica è in grado di determinare la quantità di SO_2 libera e legata, con un tempo

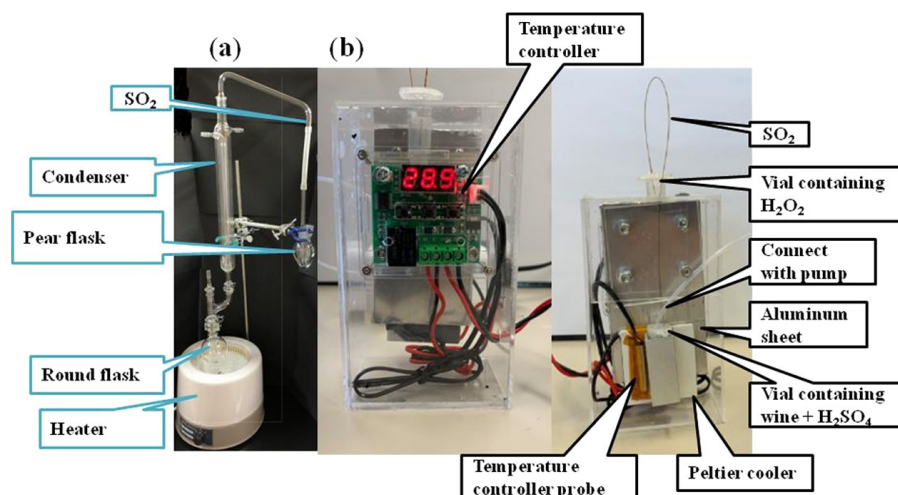


Figura 15- a) apparato necessario per il metodo Rankine, b) strumento Rankine miniaturizzato [59]

di risposta che varia dai 3 ai 5 minuti [59]. Il sensore modificato con la polianilina è in grado di svolgere questa analisi senza il pretrattamento necessaria per il metodo Rankine, proprio per la presenza della polianilina che impedisce l'adsorbimento non specifico delle molecole facenti parte della matrice del vino e che potrebbero interferire con l'analisi, nonostante ciò, i due metodi sono stati comparati ottenendo una buona correlazione tra i due. Il limite di

rilevamento per il chip è di 6×10^{-3} ppm mentre quella del dispositivo Rankine è pari a quella del metodo Rankine [59].

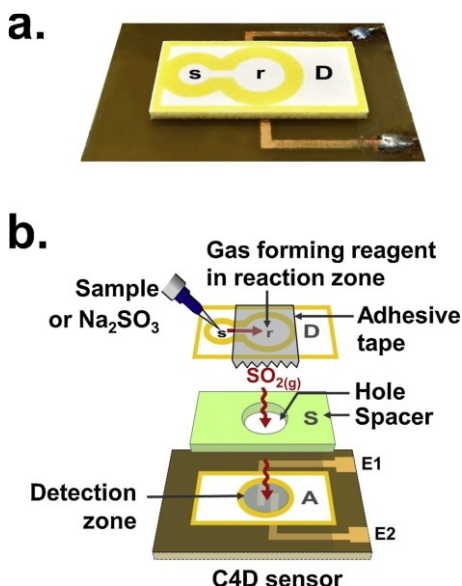


Figura 16-Sensore sviluppato da Fukana et al. basato sulla microfluidica su carta [60]

Un altro sensore interessante per la quantificazione dei solfiti nel vino viene presentato da Fukana et al., che elaborano un sensore di conducibilità “contactless” come rivelatore per un dispositivo analitico microfluidico cartaceo (μ PADs). Rappresenta un metodo analitico per la determinazione diretta dei solfiti, senza quindi la necessità di utilizzare reagenti. Il campione viene caricato nello strato superiore del μ PADs, scorre fino alla zona di reazione coperta adiacente che contiene un acido adsorbito, la reazione porta alla formazione di SO_2 . Il gas così formato si diffonde nello spazio di testa compreso nello strato mediano, venendo adsorbito nella zona di rilevamento

sita nello strato base e provocando un cambiamento del segnale del rivelatore di conducibilità “contactless” dovuto al cambio di carica generato dalle specie conduttive ioniche H^+ e HSO_3^- [60]. Il sensore presenta un limite di rilevamento di 6.61 mg/L e un tempo di risposta di 3.3 minuti, rendendolo adatto a tutte le situazioni di rilevamento della solforosa totale. Inoltre, il sensore può essere utilizzato più volte con i sistemi μ PADs usa e getta, infatti, è stata testata la sua resistenza all’immagazzinamento, provando che può essere immagazzinato per tempi superiori all’anno e 8 mesi, con una perdita della calibrazione di solo l’1.7%. [60].

6.2.2 Sensori ottici per la determinazione della solforosa nei vini

Berner et al. hanno sviluppato un sensore ottico per la quantificazione della solforosa totale negli estratti organici derivanti da diverse categorie di alimenti, tra cui il vino. Il sensore in questione è stato progettato per una semplice, rapida e sensibile analisi del contenuto di solfiti nei campioni alimentari. Il reagente cloridrato acidificato alla pararosanilina in forma cationica viene immobilizzato sulla superficie della membrana dello scambiatore cationico Nafion mediante interazioni elettrostatiche. In un medium di formaldeide, la pellicola formata con Nafion e pararosanilina presenta di colore rosa pallido, viene successivamente convertita in viola intenso a causa della formazione di acido alchilamminosolfonico altamente coniugato in presenza di solfito, registrando la variazione di assorbanza a 588 nm, che risulta collegata alla quantità di solfiti presenti nel campione [61]. La peculiarità di questo metodo è la possibilità

di creare kit simili a quelli utilizzati per la determinazione del pH. In generale il limite di rilevamento e di quantificazione sono rispettivamente 0.084 e 0.280 ppm. Questo sensore è stato comparato con la titolazione iodometrica dando risultati altamente comparabili, anzi questa tecnologia, nel caso dei vini rossi, risulta più sicuro e sensibile, perché non risente delle interferenze dovute alla torbidità e/o campioni altamente colorati, inoltre, non richiede la preparazione del campione e utilizzo di reagenti particolari [61]. Il sensore in questione può essere quindi utilizzato in tutte quelle fasi in cui è utile avere una lettura della solforosa totale presente, come ad esempio nelle fasi prefermentative, affinamento e controllo qualità.

Capitolo 7

APPLICAZIONE DEI SENSORI NEL PROCESSO DI VINIFICAZIONE

7.1 Processo di vinificazione: vantaggi e applicazioni dei sensori durante la fase produttiva

Monitorare il progresso della produzione, qualità e sicurezza del vino richiede la quantificazione di una serie di parametri organolettici in aggiunta ai parametri fisici normalmente monitorati come la temperatura, densità, acidità e pH. Inoltre, la conoscenza dei livelli degli indicatori principali della fermentazione, macerazione e fermentazione malolattica, come l'etanolo, acidi organici e composti fenolici, possono essere integrati con la quantificazione di parametri secondari come la quantità di glicerolo, solfiti, ammine biogene, acido gluconico e acetico, acido lattico, in modo da aiutare l'enologo a migliorare il controllo del processo di produzione e determinare la qualità e profilo aromatico/gustativo finale del vino. Questi parametri della composizione del vino sono tradizionalmente determinati da una grande varietà di metodi analitici, per esempio, i metodi ufficiali stabiliti dall'OIV vanno da semplici misurazioni dell'indice di rifrazione, per determinare il grado alcolico, a metodi enzimatici cromatografici, per la determinazione degli acidi, o ancora a spettrofotometrie e cromatografia liquida ad alte prestazioni, rispettivamente per polifenoli e ammine biogene etc. [16] [44] Molte di questi metodi richiedono strumentazioni ingombranti e costose, con protocolli di manutenzione e funzionamento lunghi che richiedono l'utilizzo di reagenti e personale tecnico molto qualificato. Come alternativa analitica, i sensori, presentano differenti strategie di rilevamento e promettono di fornire analisi veloci, precise e portabili permettendo le analisi in sito.

In questo capitolo vengono riassunte le principali applicazioni dei sensori presi in analisi coprendo le varie fasi del processo di vinificazione a partire dalla fermentazione alcolica. Nella

fig. 17 viene rappresentato un diagramma di flusso del processo di vinificazione in rosso e in bianco, che viene preso come modello per le principali fasi che verranno analizzate.



Figura 17-Diagramma di flusso della vinificazione in bianco e in rosso

7.1.1 Monitoraggio della fermentazione alcolica

Per seguire il progresso della fermentazione alcolica, il principale parametro monitorato è il consumo degli zuccheri ed in particolare del glucosio, infatti, durante questo processo metabolico il glucosio viene trasformato in etanolo e anidride carbonica. I metodi disponibili ad oggi però assolvono perfettamente questa funzione e risultano abbastanza rapidi; quindi, ai fini della stesura di questa tesi non sono stati presi in considerazione sensori per la loro determinazione. D'altronde il risultato metabolico della fermentazione alcolica è la produzione di etanolo e CO₂. L'etanolo può quindi essere preso come parametro per verificare che il consumo degli zuccheri sia svolto ai fini della fermentazione alcolica e non altri processi metabolici. Nella realtà dei fatti però non tutto il glucosio viene metabolizzato in alcol etilico ma una parte viene utilizzata dai lieviti nella fermentazione gliceropiruvica che vede come metabolita finale il glicerolo. Inoltre, se al vino viene fatta intraprendere la fermentazione malolattica, le colonie di batteri lattici potrebbero utilizzare una parte di zuccheri presenti per la loro moltiplicazione, parametro che varia a seconda della strategia di inoculo adottata. I sistemi sensoriali proposti nel capitolo sulla determinazione dell'etanolo (Capitolo 3) sono tutti adatti al monitoraggio di questo parametro, i sensori enzimatici e microbici però utilizzando molecole organiche sono sicuramente suscettibili al metodo di immagazzinamento e hanno un uso limitato al periodo di vinificazione, dovendo essere sostituiti l'anno successivo. Ciò in realtà non dovrebbe costituire un problema se il costo del sensore ne giustifica l'utilizzo. In aggiunta possono essere utilizzati i sensori per la determinazione del glicerolo e dell'alcol isoamilico che oltre a dare informazioni circa l'andamento della fermentazione possono aiutare l'enologo nel monitoraggio della formazione del profilo sensoriale del vino.

7.1.2 Monitoraggio della fermentazione malolattica.

La fermentazione malolattica nel vino consiste nella conversione dell'acido L-malico in acido L-lattico, ad opera dei batteri lattici presenti nel vino o inoculati. Il risultato più evidente è quello di una diminuzione dell'acidità, in realtà le trasformazioni a cui va incontro il vino sono ancora più complesse, la formazione di lattato di etile parteciperebbe alle sensazioni di volume che la fermentazione malolattica conferisce al vino. Anche diversi prodotti secondari come il diacetile si integrano in un complesso che comprende diversi meccanismi di formazione e degradazione [13]. A dosi moderate questo composto secondario interviene certamente nella complessità aromatica del vino. Un'altra trasformazione imputata all'attività dei batteri lattici è quella della decarbossilazione dell'istidina in istamina, un'ammina biogena di cui abbiamo parlato nel capitolo 5. Infine, la fermentazione malolattica si accompagna alla

modifica del colore dei vini rossi, che perdono intensità e la tinta rosso acceso si attenua [62]. In generale la fermentazione malolattica apporta un miglioramento delle qualità organolettiche del vino, ma le condizioni di realizzazione influiscono sicuramente sul risultato. È quindi importante monitorare e condurre adeguatamente questo tipo di fermentazione anche perché i batteri lattici sono in grado di metabolizzare altre molecole come, il glicerolo, che però non apportano caratteristiche positive al vino ma anzi si accompagnano ad un aumento dell'acidità volatile [13]. I sensori che si possono utilizzare sono quelli descritti nel capitolo 2, sugli acidi organici, in particolare quelli per acido malico e lattico, che possono essere utilizzati in tandem per avere dei risultati più precisi durante il monitoraggio. La durata della fermentazione malolattica può arrivare anche fino a 15 giorni, per questo motivo i sensori che hanno una tempi di vita minore devono essere scartati se si vuole ottenere un monitoraggio costante in tempo reale della formazione dell'acido lattico e consumo di quello malico. Nel caso in cui la fermentazione alcolica abbia subito un arresto o sia stata stentata, il monitoraggio dell'acidità volatile attraverso l'uso di sensori sensibili all'acido acetico può dare informazioni importanti sullo sviluppo dei batteri sia acetici che lattici, che spesso cooperano determinando un aumento dell'acidità volatile e conferendo al vino aromi sgradevoli. Siccome la fermentazione malolattica provoca un calo dell'acidità del vino, per trasformazione di un acido bicarbossilico in un acido monocarbossilico, il monitoraggio dell'acidità titolabile, attraverso ad esempio l'uso del sensore sviluppato da Kotani et al., può essere utile per evitare che il profilo acido del vino, soprattutto se destinato all'invecchiamento, scenda sottosoglie critiche. Inoltre, i sensori esposti per la rilevazione e quantificazione degli acidi organici possono aiutare l'enologo nel monitoraggio del profilo acido del vino, con lo scopo di intervenire con eventuali correzioni, in base alle caratteristiche del vino che si vuole ottenere.

7.1.3 Monitoraggio della macerazione

La macerazione è alla base dell'ottenimento di tutte le caratteristiche specifiche, visive, olfattive e gustative, che distinguono i vini rossi dai vini bianchi. Ai fini della stesura di questa tesi verrà presa in considerazione la macerazione tipicamente utilizzata per l'ottenimento dei vini rossi. Essa apporta diversi composti come i polisaccaridi e sostanze aromatiche, ma i più importanti sono sicuramente i composti fenolici, in particolare gli antociani e tannini. Queste sostanze vengono estratte dalle bucce, dai raspi e dai vinaccioli, che rimangono a contatto con il mosto in fermentazione per un periodo di tempo variabile a seconda dei caratteri che si vogliono apportare al vino. I composti estratti, per quanto riguarda i composti fenolici, differiscono in quantità, composizione chimica ed effetto sensoriale in base all'organo di provenienza e anche in funzione della varietà, ne consegue che, la conduzione della

macerazione richiede la ricerca di un compromesso che si traduce in un'estrazione frazionata in grado di apportare esclusivamente i costituenti dell'uva che contribuiscono favorevolmente all'aroma e al sapore del vino e che però devono essere estratti nella loro totalità [62]. Il monitoraggio della quantità di composti fenolici presenti nel vino è dunque un parametro di fondamentale importanza durante la fase fermentativa e di macerazione. I sensori proposti al capitolo 4, ossia quello che tratta appunto dei polifenoli, possono essere usati durante la macerazione e fermentazione per il monitoraggio dell'estrazione dei polifenoli, a patto che la loro stabilità ne consenta l'uso prolungato nel tempo che deve essere almeno pari alla durata del periodo di macerazione. L'impiego di sensori usa e getta invece rimane interessante nell'ottica del controllo della macerazione, al termine di essa, per valutare l'entità dell'estrazione effettuata e per decidere se continuare con la stessa o se fermarla.

7.1.4 Monitoraggio dei principali difetti del vino e delle sostanze tossiche.

Il monitoraggio dei principali difetti del vino può essere fatto con sistemi multisensoriali in continuo, come le lingue e i nasi elettronici o con sensori usa e getta per verificare la presenza di determinati composti. In generale i sistemi multisensoriali trovano la loro principale occupazione nel monitoraggio del processo di affinamento del vino, ovvero quel periodo in cui il vino conservato per periodi variabili in botti di legno, bottiglie o cisterne. Durante questa fase il vino viene lasciato maturare in modo che il bouquet aromatico sia il più equilibrato possibile, la durata del processo dipende dai disciplinari di produzione e dallo stile del vino. Una delle problematiche che si possono riscontrare è l'insorgenza di infezioni dovute al proliferare di microrganismi come i batteri lattici o acetici, lieviti come *Brettanomyces* o una ripresa della fermentazione da parte dei lieviti nel caso ci siano residui zuccherini. Tutti sono accomunati dall'aumento dell'acidità volatile, quindi l'impiego di sensori per la determinazione dell'acido acetico, ad alta stabilità, possono aiutare l'enologo nel riconoscimento di queste infezioni per intervenire tempestivamente nell'eventualità che si verificano. Nel caso di *Brettanomyces* questi lieviti possono svilupparsi considerevolmente in 2 fasi: (i) durante la fermentazione, nel caso di fermentazioni arrestate o stentate, in cui questi lieviti hanno a disposizione le risorse nutritive per svilupparsi, e quindi è necessario verificarne la presenza, oppure, (ii) durante il periodo di affinamento se il vino viene contaminato, infatti questi microrganismi sono in grado di svilupparsi anche in anaerobiosi e anche solo la metabolizzazione di 300 mg/L di zuccheri residui può portare alla formazione di etilfenoli in quantità sufficiente per superare la soglia olfattiva [13]. Sono dunque queste due le fasi in cui trovano impiego i sensori per la determinazione della presenza di *Brettanomyces*, che è comunque accompagnata dall'aumento della acidità volatile. Per quanto riguarda invece

l'utilizzo del sensore per la determinazione dell'acido gluconico, che è indicativo della presenza di un'infezione di *Botrytis cinerea*, la fase di utilizzo è sicuramente quella della valutazione dello stato sanitario dell'uva, in modo da valutarne l'entità e agire di conseguenza. La presenza di ocratossina invece va valutata prima della commercializzazione, meglio se prima della fase di imbottigliamento o come strumento di valutazione a campione per gli organi ufficiali di controllo. Lo stesso vale per le ammine biogene, specie se si sono avuti problemi con la fermentazione malolattica in quanto i batteri lattici ne sono i principali produttori [13].

7.1.5 Monitoraggio della solfitazione.

Il diossido di zolfo è un antisettico ad ampio raggio che esercita un'azione polivalente su diversi microrganismi del vino. Le sue modalità di azione non sono state oggetto di questa tesi, se ne può trovare un'ampia trattazione a riguardo in P. Ribéreau-Gayo, Y. Glories, A Maujean, D. Dubourdieu "Trattato di enologia vol. 1. Microbiologia del vino e vinificazioni". In generale se la solfitazione viene effettuata prima della fermentazione ha un effetto nei confronti dei lieviti; infatti, riesce ad assicurare un ritardo nell'avvio della fermentazione del pigiato consentendo un certo raffreddamento. Anche se il suo utilizzo principale viene fatto per la protezione dall'ossidazione, ha anche l'effetto nei vini bianchi di far precipitare le particelle in sospensione in modo da procedere con la sfecchiatura e in microdosi può invece stimolare la fermentazione [62]. In questa fase può essere fatto un monitoraggio della solforosa mirata a quantificare la parte attiva, il dispositivo miniaturizzato proposto da Begum et al. in grado di effettuare la misurazione del diossido di zolfo libero con il metodo Rankine o il sensore basato sul chip modificato con la polianilina sono in grado di compiere questa misurazione, in quanto, in grado di rilevare la SO_2 libera, che con opportune tabelle relazionate al pH danno informazioni circa la solforosa attiva. Un altro impiego che viene fatto della solforosa per la protezione del vino dall'ossidazione durante il periodo di affinamento, ma anche per evitare lo sviluppo di lieviti e batteri o le rifermentazioni nei vini dolci. Monitorare il livello di anidride solforosa durante la fase di affinamento può aiutare l'enologo nella diminuzione di tale composto, per questo fine il sensore a chip modificato con polianilina di Begum et al., quello di Fukana et al. e quello di Berner et al. possono essere utilizzati durante questa fase per la quantificazione dei solfiti. Queste tecnologie potrebbero risultare particolarmente interessanti per i vini prodotti in regime di biologico, dove le dosi di impiego di anidride solforosa sono limitate rispetto a quelle normalmente disponibili per le stesse categorie, e dove quindi un utilizzo più mirato può fare la differenza.

CONCLUSIONI

Il mercato del vino è un settore economico importante e il suo accrescimento porta sempre di più le cantine ad investire in nuove tecnologie, ma nonostante il progresso degli strumenti analitici che permettono di monitorare le fermentazioni, i biosensori non sono entrati con convinzione nel mercato delle analisi del vino [44], malgrado la riluttanza, nel campo della produzione di vino all'implementazione dei biosensori e al loro utilizzo, si è riscontrato in letteratura un impegno costante nello sviluppo di nuovi sensori e nuove tecniche di rilevamento. Questa tesi ha dapprima definito cosa sono i sensori e quali sono i loro principi di funzionamento per poi presentare differenti tipi di sensori, selezionati prendendo in considerazione come parametri discriminanti la stabilità nel tempo, la sensibilità, la propensione alla produzione e l'effettivo test su campioni di vino reali (tranne nel caso del sensore fotonico in Zonex per la determinazione dell'etanolo), per ogni categoria di analita affrontata, e infine presentato le applicazioni pratiche durante il processo di vinificazione. L'utilizzo dei sensori permette di utilizzare delle tecniche non distruttive durante le analisi o che prevedono il prelievamento di quantità trascurabili di prodotto. Si è riscontrato che i maggiori avanzamenti nell'implementazione di queste tecniche di rilevamento e quantificazione per l'analisi dei principali composti del vino è principalmente dovuta all'utilizzo di nanomateriali e materiali compositi che hanno spinto la selettività e sensibilità dei sensori ma anche la stabilità nel tempo dei biosensori. In parallelo anche le tecniche chemometriche sono state implementate, giocando un ruolo essenziale nell'elaborazione dei dati grezzi derivanti dai sistemi sensoristici. Sebbene il potenziale di utilizzo di queste tecniche alternative, nel monitoraggio dei parametri chimici durante la vinificazione, sia alto, la maggior parte degli studi analizzati riportano prove effettuate su piccoli volumi di campioni di vino non adattati quindi a contesti industriali. In generale il panorama dei sensori fin qui analizzato non si presenta acerbo, è però necessario un numero maggiore di progetti focalizzati all'utilizzo dei sensori durante il processo di produzione, un maggior numero di studi sulla comparazione con i metodi correntemente usati per la determinazione degli analiti, in modo da costituire un numero rilevante di materiale di riferimento, per avere dati statisticamente rilevanti, al fine di provvedere alla validazione necessaria che porterebbe i concetti e prototipi

proposti verso la commercializzazione. Una valutazione dell'aspetto economico sull'uso dei sensori non è stato affrontato nella stesura di questa tesi, in quanto, la maggior parte dei sensori analizzati sono prototipi sperimentali.

SITOGRAFIA

- [a] <https://www.asitaly.it/libreria9.html>
- [b] https://www.vassanellilab.com/analisi_dettaglio.php?id=122&ext=0
- [c] <https://www.coldiretti.it/salute-e-sicurezza-alimentare/vino-30-anni-fa-lo-scandalo-del-metanolo-23-vittime>

BIBLIOGRAFIA

- [1] D'Ascenzo F., Maddaloni L., Rapa M., Rocchi A., Ruggieri R. and Vinci G. "Sensor for Beverage Analysis a Review"; International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering (IJITEE)
- [2] Usher, M. J., e D. A. Keating. "Sensors and Transducers". London: Macmillan Education UK, 1996
- [3] Gionata Battistini, dottorato in scienze chimiche; 2008, "SENSORI CHIMICI BASATI SU MOLECOLE E NANOPARTICELLE"
- [4] S.F. D'Souza, "Microbial biosensors", Nuclear Agriculture and Biotechnology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Mumbai 400085, India
- [5] Thevenot, Daniel R, Klara Toth, Richard A Durst, e George S Wilson. "Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification", 2001
- [6] Kaushal, Avinash, e Dr Pallavi Gupta. «Electronic Nose Evolution for Food Adulteration: A Review» 5, n. 3 (2017): 5
- [7] Muhammad Arslan a, Haroon Elrasheid Tahir a, Muhammad Zareef a, Jiyong Shi a, Allah Rakha b, Muhammad Bilal a, Huang Xiaowei a, Li Zhihua a, Zou Xiaobo a, "Recent trends in quality control, discrimination and authentication of alcoholic beverages using nondestructive instrumental techniques", Trends in Food Science & Technology 107 (2021) 80–113
- [8] Liu, Huixiang, Qing Li, Bin Yan, Lei Zhang, e Yu Gu. «Bionic Electronic Nose Based on MOS Sensors Array and Machine Learning Algorithms Used for Wine Properties Detection». Sensors 19, n. 1 (22 dicembre 2018)
- [9] Buratti, S., S. Benedetti, M. Scampicchio, e E.C. Pangerod. «Characterization and Classification of Italian Barbera Wines by Using an Electronic Nose and an Amperometric Electronic Tongue». Analytica Chimica Acta 525, n. 1 (novembre 2004): 133–39

- [10] María Luz Rodríguez Méndez, “Electronic Noses and Tongues in Food Science” Book • 2016 Lvova, Larisa. «Chapter 15 - Electronic Tongue Principles and Applications in the Food Industry», s.d., 10
- [11] Méndez, María Luz Rodríguez, José A. De Saja, C. Medina-Plaza, C. García-Hernández, “Electronic Noses and Tongues in Food Science” Book • 2016, «Chapter 26 - Electronic Tongues for the Organoleptic Characterization of Wines», s.d., 9
- [12] Xiao-wei, Huang, Zou Xiao-bo, Shi Ji-yong, Li Zhi-hua, e Zhao Jie-wen. «Colorimetric Sensor Arrays Based on Chemo-Responsive Dyes for Food Odor Visualization». *Trends in Food Science & Technology* 81 (novembre 2018): 90–107
- [13] P. Ribéreau-Gayo, Y. Glories, A Maujean, D. Dubourdieu “Trattato di enologia vol. 2. Chimica del vino-stabilizzazione e trattamenti”
- [14] Dordevic, Nikola. «Chemometrics and Stable Isotope Ratios of Wine», s.d., 122
- [15] Lvova, Larisa, Roberto Paolesse, Corrado Di Natale, e Arnaldo D’Amico. «Detection of Alcohols in Beverages: An Application of Porphyrin-Based Electronic Tongue». *Sensors and Actuators B: Chemical* 118, n. 1–2 (ottobre 2006)
- [16] International Organsiation of Vine and Wine, “Compendium of international methods of wine and must analysis”, edition 2021, VOL.1
- [17] Rotariu, Lucian, Camelia Bala, e Vasile Magearu. «New Potentiometric Microbial Biosensor for Ethanol Determination in Alcoholic Beverages». *Analytica Chimica Acta* 513, n. 1 (giugno 2004): 119–23
- [18] Lachenmeier, Dirk W, Rolf Godelmann, Markus Steiner, Bob Ansay, Jürgen Weigel, e Gunther Krieg. «Rapid Mobile Determination of Alcoholic Strength in Wine, Beer and Spirits Using a Flow-through Infrared Sensor», 2010, 10.
- [19] Islam, Md. Saiful, Jakeya Sultana, Alex Dinovitser, Kawsar Ahmed, Mohammad Rakibul Islam, Mohammad Faisal, Brian W.-H. Ng, e Derek Abbott. «A Novel Zeonex Based Photonic Sensor for Alcohol Detection in Beverages». In 2017 IEEE International Conference on Telecommunications and Photonics (ICTP), 114–18. Dhaka: IEEE, 2017
- [20] Smutok, Oleh, Bertrand Ngounou, Halyna Pavlishko, Galyna Gayda, Mykhailo Gonchar, e Wolfgang Schuhmann. «A Reagentless Bienzyme Amperometric Biosensor Based on Alcohol Oxidase/Peroxidase and an Os-Complex Modified Electrodeposition Paint». *Sensors and Actuators B: Chemical* 113, n. 2 (febbraio 2006): 590–98

- [21] Niculescu, Mihaela, Thomas Erichsen, Valentin Sukharev, Zoltan Kerényi, Elisabeth Csöregi, e Wolfgang Schuhmann. «Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase-Based Reagentless Amperometric Biosensor for Ethanol Monitoring during Wine Fermentation». *Analytica Chimica Acta* 463, n. 1 (luglio 2002): 39–51
- [22] Wen, Guangming, Zhongping Li, e Martin M.F. Choi. «Detection of Ethanol in Food: A New Biosensor Based on Bacteria». *Journal of Food Engineering* 118, n. 1 (settembre 2013): 56–61
- [23] Islam, Md. Saiful, Jakeya Sultana, Alex Dinovitser, Kawsar Ahmed, Mohammad Rakibul Islam, Mohammad Faisal, Brian W.-H. Ng, e Derek Abbott. «A Novel Zeonex Based Photonic (Sensor for Alcohol Detection in Beverages)». In *2017 IEEE International Conference on Telecommunications and Photonics (ICTP)*, 114–18. Dhaka: IEEE, 2017
- [24] Erfkamp, Jan, Margarita Guenther, e Gerald Gerlach. «Hydrogel-Based Piezoresistive Sensor for the Detection of Ethanol». *Journal of Sensors and Sensor Systems* 7, n. 1 (4 aprile 2018): 219–26
- [25] Abegg, Sebastian, Leandro Magro, Jan van den Broek, Sotiris E. Pratsinis, e Andreas T. Güntner. «A Pocket-Sized Device Enables Detection of Methanol Adulteration in Alcoholic Beverages». *Nature Food* 1, n. 6 (giugno 2020): 351–54
- [26] Mariano, Thiago, Máisa Beluomini, e Nelson Stradiotto. «Molecularly Imprinted Polypyrrole on Glassy Carbon Electrode Modified with Reduced Graphene Oxide and Gold Nanoparticles for Isoamyl Alcohol Analysis in Fusel Oil». *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2021
- [27] Monošík, Rastislav, Dana Ukropcová, Miroslav Stred'anský, e Ernest Šturdík. «Multienzymatic Amperometric Biosensor Based on Gold and Nanocomposite Planar Electrodes for Glycerol Determination in Wine». *Analytical Biochemistry* 421, n. 1 (febbraio 2012): 256–61
- [28] Pascal Ribereau-Gayon, Denis Dubourdieu, Bernard Don'eche, Aline Lonvaud, *Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications*
- [29] Zeravik, Jiri, Zdenka Fohlerova, Miodrag Milovanovic, Ondrej Kubesa, Marta Zeisbergerova, Karel Lacina, Aleksandar Petrovic, Zdenek Glatz, e Petr Skladal. «Various Instrumental Approaches for Determination of Organic Acids in Wines». *Food Chemistry* 194 (marzo 2016): 432–40

- [30] Rodriguez Gamboa, Juan C., Eva Susana Albarracin E, Adenilton J. da Silva, Luciana L. de Andrade Lima, e Tiago A. E. Ferreira. «Wine Quality Rapid Detection Using a Compact Electronic Nose System: Application Focused on Spoilage Thresholds by Acetic Acid». *LWT* 108 (luglio 2019)
- [31] Mieliauskiene, Rasa, Mihaela Nistor, Valdas Laurinavicius, e Elisabeth Csöregi. «Amperometric Determination of Acetate with a Tri-Enzyme Based Sensor». *Sensors and Actuators B: Chemical* 113, n. 2 (febbraio 2006): 671–76.
- [32] Shumeiko, Vlad, Einav Malach, Yael Helman, Yossi Paltiel, Gili Bisker, Zvi Hayouka, e Oded Shoseyov. «A Nanoscale Optical Biosensor Based on Peptide Encapsulated SWCNTs for Detection of Acetic Acid in the Gaseous Phase». *Sensors and Actuators B: Chemical* 327 (gennaio 2021)
- [33] Macías, Miguel, Antonio Manso, Carlos Orellana, Horacio Velasco, Ramón Caballero, e Juan Chamizo. «Acetic Acid Detection Threshold in Synthetic Wine Samples of a Portable Electronic Nose». *Sensors* 13, n. 1 (24 dicembre 2012): 208–20
- [34] Paredes-Doig, A. L., H. Cárcamo, M. Hurtado Cotillo, R. Sun-Kou, E. Doig-Camino, G. Picasso, G. Comina, e A. La Rosa-Toro Gómez. «Gas Sensors Modified with Zeolite Y for Assessing Wine Aroma Compounds». *Journal of Chemistry* 2019 (11 settembre 2019): 1–7.
- [35] Buratti, Susanna. «Chapter 28 - Alcoholic Fermentation Using Electronic Nose and Electronic Tongue», s.d., 9
- [36] Rodriguez Gamboa, Juan C., Eva Susana Albarracin E, Adenilton J. da Silva, Luciana L. de Andrade Lima, e Tiago A. E. Ferreira. «Wine Quality Rapid Detection Using a Compact Electronic Nose System: Application Focused on Spoilage Thresholds by Acetic Acid». *LWT* 108 (luglio 2019): 377–84
- [37] Matthews, Christopher J., Emma S.V. Andrews, e Wayne M. Patrick. «Enzyme-Based Amperometric Biosensors for Malic Acid – A Review». *Analytica Chimica Acta* 1156 (aprile 2021): 338218
- [38] Loaiza, Oscar A., Pedro J. Lamas-Ardisana, Larraitz Añorga, Elena Jubete, Virginia Ruiz, Maryam Borghei, Germán Cabañero, e Hans J. Grande. «Graphitized Carbon Nanofiber–Pt Nanoparticle Hybrids as Sensitive Tool for Preparation of Screen Printing Biosensors. Detection of Lactate in Wines and Ciders». *Bioelectrochemistry* 101 (febbraio 2015): 58–65

- [39] Giménez-Gómez, Pablo, Manuel Gutiérrez-Capitán, Fina Capdevila, Anna Puig-Pujol, César Fernández-Sánchez, e Cecilia Jiménez-Jorquera. «Monitoring of Malolactic Fermentation in Wine Using an Electrochemical Bionzymatic Biosensor for L-Lactate with Long Term Stability». *Analytica Chimica Acta* 905 (gennaio 2016): 126–33
- [40] Çelik, Derviş A., Miquel A. Amer, Daniel F. Novoa-Díaz, Juan A. Chávez, Antoni Turó, Miguel J. García-Hernández, e Jordi Salazar. «Design and Implementation of an Ultrasonic Sensor for Rapid Monitoring of Industrial Malolactic Fermentation of Wines». *Instrumentation Science & Technology* 46, n. 4 (4 luglio 2018): 387–407
- [41] Lourenço, Anabel S., Raphael F. Nascimento, Amanda C. Silva, Willame F. Ribeiro, Mario C.U. Araujo, Severino C.B. Oliveira, e Valberes B. Nascimento. «Voltammetric Determination of Tartaric Acid in Wines by Electrocatalytic Oxidation on a Cobalt(II)-Phthalocyanine-Modified Electrode Associated with Multiway Calibration». *Analytica Chimica Acta* 1008 (maggio 2018): 29–37
- [42] Kotani, Akira, Fumiyo Kusu, Kiyoko Takamura, e Hideki Hakamata. «Review—A Portable Voltammetric Sensor for Determining Titratable Acidity in Foods and Beverages». *Journal of The Electrochemical Society* 167, n. 3 (1° gennaio 2020)
- [43] Arribas, Alberto Sánchez, Marta Martínez-Fernández, e Manuel Chicharro. «The Role of Electroanalytical Techniques in Analysis of Polyphenols in Wine». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 34 (aprile 2012): 78–96
- [44] Vasilescu, Alina, Pablo Fanjul-Bolado, Ana-Maria Titoiu, Roxana Porumb, e Petru Epure. «Progress in Electrochemical (Bio)Sensors for Monitoring Wine Production». *Chemosensors* 7, n. 4 (16 dicembre 2019)
- [45] Moreno, Mónica, Alberto Sánchez Arribas, Laura González, Esperanza Bermejo, Antonio Zapardiel, e Manuel Chicharro. «Flow Injection Analysis with Amperometric Detection of Polyphenols at Carbon Nanotube/Polyvinylpyrrolidone-Modified Electrodes as Classification Tool for White Wine Varieties». *Microchemical Journal* 162 (marzo 2021)
- [46] Sánchez Arribas, Alberto, Marta Martínez-Fernández, Mónica Moreno, Esperanza Bermejo, Antonio Zapardiel, e Manuel Chicharro. «Analysis of Total Polyphenols in Wines by FIA with Highly Stable Amperometric Detection Using Carbon Nanotube-Modified Electrodes». *Food Chemistry* 136, n. 3–4 (febbraio 2013)

- [47] Zhang, Ji-Wei, Kai-Ping Wang, e Xuan Zhang. «Fabrication of SnO₂ Decorated Graphene Composite Material and Its Application in Electrochemical Detection of Caffeic Acid in Red Wine». *Materials Research Bulletin* 126 (giugno 2020)
- [48] Chawla, Sheetal, Rachna Rawal, e C.S. Pundir. «Fabrication of Polyphenol Biosensor Based on Laccase Immobilized on Copper Nanoparticles/Chitosan/Multiwalled Carbon Nanotubes/Polyaniline-Modified Gold Electrode». *Journal of Biotechnology* 156, n. 1 (ottobre 2011)
- [49] Zrinski, Ivana, Kingkan Pungjunun, Sanja Martinez, Janez Zavašnik, Dalibor Stanković, Kurt Kalcher, e Eda Mehmeti. «Evaluation of Phenolic Antioxidant Capacity in Beverages Based on Laccase Immobilized on Screen-Printed Carbon Electrode Modified with Graphene Nanoplatelets and Gold Nanoparticles». *Microchemical Journal* 152 (gennaio 2020)
- [50] Andrei, Veronica, Erica Sharpe, Alina Vasilescu, e Silvana Andreescu. «A Single Use Electrochemical Sensor Based on Biomimetic Nanoceria for the Detection of Wine Antioxidants». *Talanta* 156–157 (agosto 2016)
- [50] Andrei, Veronica, Erica Sharpe, Alina Vasilescu, e Silvana Andreescu. «A Single Use Electrochemical Sensor Based on Biomimetic Nanoceria for the Detection of Wine Antioxidants». *Talanta* 156–157 (agosto 2016)
- [51] Paup, Victoria D., Tara Cook-Barton, Charles Diako, Charles G. Edwards, e Carolyn F. Ross. «Detection of Red Wine Faults over Time with Flash Profiling and the Electronic Tongue». *Beverages* 7, n. 3 (21 luglio 2021)
- [52] Villalonga, María L., Boryana Borisova, Christian B. Arenas, Anabel Villalonga, María Arévalo-Villena, Alfredo Sánchez, José M. Pingarrón, Ana Briones-Pérez, e Reynaldo Villalonga. «Disposable Electrochemical Biosensors for *Brettanomyces Bruxellensis* and Total Yeast Content in Wine Based on Core-Shell Magnetic Nanoparticles». *Sensors and Actuators B: Chemical* 279 (gennaio 2019): 15–21
- [53] Torno-de Román, L. del, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, e M.J. Arcos-Martínez. «Gluconic Acid Determination in Wine by Electrochemical Biosensing». *Sensors and Actuators B: Chemical* 176 (gennaio 2013): 858–62

- [54] Li, Xiaoyan, Natashya Falcone, M. Nur Hossain, Heinz-Bernhard Kraatz, Xiaojun Chen, e He Huang. «Development of a Novel Label-Free Impedimetric Electrochemical Sensor Based on Hydrogel/Chitosan for the Detection of Ochratoxin A». *Talanta* 226 (maggio 2021)
- [55] Nekrasov, Nikita, Stefan Jaric, Dmitry Kireev, Aleksei V. Emelianov, Alexey V. Orlov, Ivana Gadjanski, Petr I. Nikitin, Deji Akinwande, e Ivan Bobrinetskiy. «Real-Time Detection of Ochratoxin A in Wine through Insight of Aptamer Conformation in Conjunction with Graphene Field-Effect Transistor». *Biosensors and Bioelectronics* 200 (marzo 2022)
- [56] Reynolds, A. G. *Managing Wine Quality*. Volume 2, 2022.
- [57] Draz, Mohammed E., Hany W. Darwish, Ibrahim A. Darwish, e Ahmed S. Saad. «Solid-State Potentiometric Sensor for the Rapid Assay of the Biologically Active Biogenic Amine (Tyramine) as a Marker of Food Spoilage». *Food Chemistry* 346 (giugno 2021)
- [58] Herrera-Chacón, Anna, Şule Dinç-Zor, e Manel del Valle. «Integrating Molecularly Imprinted Polymer Beads in Graphite-Epoxy Electrodes for the Voltammetric Biosensing of Histamine in Wines». *Talanta* 208 (febbraio 2020)
- [59] Begum, Parvin, Tatsuya Morozumi, Toshikazu Kawaguchi, e Teruo Sone. «Development of an Electrochemical Sensing System for Wine Component Analysis». *ACS Food Science & Technology* 1, n. 11 (17 dicembre 2021): 2030–40
- [60] Fukana, Nutnaree, Thitaporn Sonsa-ard, Nattapong Chantipmanee, Peter C. Hauser, Prapin Wilairat, e Duangjai Nacapricha. «Contactless Conductivity Sensor as Detector for Microfluidic Paper-Based Analytical Device with Application to Unique Rapid Method for Quantifying Sulfite Preservative». *Sensors and Actuators B: Chemical* 339 (luglio 2021)
- [61] Bener, Mustafa, Furkan Burak Şen, e Reşat Apak. «Novel Pararosaniline Based Optical Sensor for the Determination of Sulfite in Food Extracts». *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 226 (febbraio 2020)
- [62] P. Ribéreau-Gayo, Y. Glories, A Maujean, D. Dubourdieu “Trattato di enologia vol. 2. Microbiologia del vino e vinificazioni”

ISTRUZIONI PER L'USO DEL MODELLO

Salvare due copie di questo documento, la prima da conservare come modello, la seconda da utilizzare per il proprio elaborato curricolare.

Parametri di riferimento del presente documento

Margini del documento: sinistro 3 cm; destro 3 cm; rilegatura 0,5 cm; superiore 3 cm; inferiore 3,5 cm

Numeri di pagina: in basso a destra (frontespizio e dedica non sono numerate)

Principali stili adottati

la raccolta di stili completa è visibile cliccando su **Stili**

Stili di paragrafo (il testo)

Normale: da usare per il corpo del testo; carattere *Times New Roman*; corpo 11 pt; interlinea 1,5; rientro prima riga 0,5 cm; nessuna spaziatura prima e dopo; giustificato

Citazione: da usare per le citazioni lunghe (almeno 4-5 righe); carattere come il corpo del testo; corpo 11 pt; interlinea singola; rientro prima riga assente; rientro a sinistra e a destra 0,5 cm; spaziatura prima 6 pt, dopo 12 pt; giustificato

Abbreviazioni: da usare per le sigle e le abbreviazioni nella tavola iniziale; carattere come il corpo del testo; corpo 11 pt; interlinea 1,5; prima riga sporgente di 2 cm; spaziatura dopo 6 pt; giustificato; mantieni assieme le righe

Stili di paragrafo (i titoli)

Titolo 1: da usare per i titoli delle parti principali del testo (tavola delle sigle, introduzione, capitoli, conclusioni, bibliografia, indice); carattere come il corpo del testo; corpo 16 pt; interlinea singola; rientro prima riga assente; spaziatura dopo 96 pt; allineamento centrato; anteposti interruzione (affinché il titolo cominci con l'inizio di una pagina)

Titolo 2: da usare per i titoli dei paragrafi; carattere come il corpo del testo; corpo 12 pt; grassetto; interlinea singola; prima riga sporgente di 0,5 cm; spaziatura prima 24 pt, dopo 12 pt; allineamento a sinistra; mantieni con il successivo; mantieni assieme le righe

Titolo 3: da usare per i titoli dei sottoparagrafi; carattere come il corpo del testo; corpo 12 pt; corsivo; interlinea singola; prima riga sporgente di 0,5 cm; spaziatura prima 12 pt, dopo 12 pt; allineamento a sinistra; mantieni con il successivo; mantieni assieme le righe

Titolo 4: da usare per i titoli dei sotto-sottoparagrafi; carattere come il corpo del testo; corpo 12 pt; tondo; interlinea singola; prima riga sporgente di 0,5 cm; spaziatura prima 12 pt, dopo 6 pt; allineamento a sinistra; mantieni con il successivo; mantieni assieme le righe

NB: I titoli dei capitoli, dei paragrafi e dei sottoparagrafi sono numerati automaticamente in modo strutturato (1, 1.1, 1.1.1). La numerazione dei capitoli prevede la dicitura automatica "Capitolo 1", "Capitolo 2", ecc. Nella tavola delle sigle, introduzione, conclusioni, bibliografia, indice la numerazione è stata eliminata

Stili di carattere

Enfasi (corsivo): da usare per la parola o le parole *in corsivo*

Enfasi (grassetto): da usare per la parola o le parole **in grassetto**

Enfasi (maiuscoletto): da usare per la parola o le parole **IN MAIUSCOLETTO**

Sigla corsivo: da usare per le sigle in corsivo come ad es. *CCL*

Sigla tondo: da usare per le sigle in tondo come ad es. DH

NB: Gli stili di carattere consentono un maggiore controllo del testo e lo rendono più stabile.
Per rimuovere uno stile di carattere o una formattazione applicata a una o più parole il comando a tastiera è: CTRL+barra spaziatrice oppure CTRL+MAIUSC+Z

Bibliografia

La lista dei riferimenti bibliografici alla fine del documento è generata con il comando **Riferimenti > Bibliografia > Inserisci bibliografia**. È possibile aggiornare la lista dalla voce di menu contestuale (pulsante destro mouse) **Aggiorna campo**.

Lista delle tabelle

La lista delle tabelle è generata con il comando **Riferimenti > Inserisci indice delle figure**. Nella finestra di dialogo selezionare **Etichetta didascalia: Tabella**. È possibile aggiornare la lista dalla voce di menu contestuale (pulsante destro mouse) **Aggiorna campo**.

Lista delle figure

La lista delle figure è generata con il comando **Riferimenti > Inserisci indice delle figure**. Nella finestra di dialogo selezionare **Etichetta didascalia: Figura**. È possibile aggiornare la lista dalla voce di menu contestuale (pulsante destro mouse) **Aggiorna campo**.

Sommario

Il sommario è generato con il comando **Riferimenti > Sommario > Sommario personalizzato**. Nella finestra di dialogo selezionare **Formati: Da modello**. È possibile aggiornare la lista dalla voce di menu contestuale (pulsante destro mouse) **Aggiorna campo**.

SI RICORDI DI ELIMINARE LA VOCE “SOMMARIO” DAL SOMMARIO.