Borsa di studio attivata ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021

Titolo del progetto: CHIMICA VERDE PER BIOSENSORI ECOSOSTENIBILI

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo:
SCIENZE CHIMICHE

Responsabile scientifico: Antonella Cartoni
Area per la quale si presenta la richiesta: GREEN
Numero di mensilità da svolgere in azienda: 6
Numero di mensilità da svolgere all'estero: 6 presso Attosecond Science Group Center for Free-Electron Laser Science (CFEL) Deutsches Elektronen-Synchrotron (DESY), Germany (2 mesi) /Pasteur Institute, Pathogenesis of vascular infections lab, Paris, France 4 mesi.
Azienda: BIOSENSOR S.R.L, FORMELLO
Il Dipartimento è disponibile a cofinanziare per un importo pari a euro: 10000
Dipartimento finanziatore: DIPARTIMENTO DI CHIMICA con delibera del 20/09/2021

Progetto di ricerca:
Lo sviluppo di dispositivi per il rilevamento di molecole e biomolecole che siano altamente selettivi, ecocompatibili, a basso costo, riutilizzabili e riciclabili è fortemente richiesto in innumerevoli settori tra i quali l'industria alimentare, il settore dell'analisi atmosferica e quello medico-clinico. A questo proposito, c'è un enorme interesse per lo sviluppo di nuovi sensori e biosensori che siano strumenti semplici, miniaturizzati e maneggevoli complementari ai classici metodi analitici più costosi.
La pandemia da COVID-19 ha infatti evidenziato l'urgente richiesta di strumenti diagnostici rapidi, sensibili, economici e affidabili per lo screening di massa e non solo. Strettamente connessa alla questione c'è la forte necessità di processi di produzione di biosensori industriali che devono essere non solo rispettosi dell'ambiente ma anche più economici al fine di ridurre i costi di produzione di massa.
I biosensori [1] sono sensori chimici composti da due elementi, un biorecettore (es. enzima, anticorpo) che riconosce l'analita (es. antigene, proteina), e un trasduttore che converte il segnale biochimico in un altro tipo di segnale, la cui intensità è direttamente o inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita da rivelare.
Nel processo di fabbricazione di un biosensore, le strategie di immobilizzazione del biorecettore sul substrato del biosensore, risultano essere un fattore chiave per sviluppare uno strumento efficiente con prestazioni adeguate. La procedura di immobilizzazione deve infatti preservare la massima attività del biorecettore e massimizzare le prestazioni del dispositivo in termini di conservazione e riutilizzo, quest'ultimo obbligatorio al fine di ridurre l'inquinamento dovuto ai dispositivi monouso [2,3,4]. È noto che la procedura di immobilizzazione è in grado di facilitare il riciclo, consentendo una riduzione del costo del processo di produzione del biosensore fino al 50% [5].
Nel campo della Chimica Verde e della Biotecnologia Bianca per l'Ambiente, il nostro gruppo (Sapienza-CNR-ISM) ha di recente prodotto un nuovo tipo di biosensore a base di laccasi, privo di metalli, con capacità di riutilizzo e conservazione, grazie all'applicazione della metodologia ESD (ElectroSpray Deposition - ESD) per immobilizzare l'enzima su carbon black [6] e attualmente su elettrodi serigrafati a base di carbonio (quindi più sostenibili) per il rilevamento di catecolo nelle acque. Il processo di fabbricazione utilizza una chimica sostenibile [7]. Infatti l'intero processo sfrutta bassissime quantità di acqua ed etanolo (o metanolo) e l'enzima laccasi è utilizzato così come fornito dalla ditta produttrice, senza ulteriori processi di purificazione.
In letteratura sono presenti numerosi lavori che riportano la laccasi immobilizzata su superfici per la rimozione di

inquinanti, ma nella maggior parte dei casi sono utilizzate superfici pretrattate per favorire l'ancoraggio dell'enzima ed è utilizzata laccasi purificata. Gli autori sottolineano come l'utilizzo della laccasi allo stato grezzo sarebbe un processo molto più economico [8].

La degradazione enzimatica tramite enzimi ligninolitici, come appunto la laccasi, è un'altra potenziale applicazione verde per la rimozione di composti farmaceutici [8]. I campi della chimica verde e della biotecnologia bianca guardano perciò a questi biocatalizzatori (le laccasi) come tecnologie all'avanguardia grazie alla loro capacità di sfruttare la selettività e il basso fabbisogno energetico degli enzimi per creare dispositivi di biorilevamento non tossici.

Si deve però, tener conto del fatto che un enzima subisce cambiamenti nelle sue proprietà fisiche e chimiche se soggetto a immobilizzazione. Quindi la scelta del metodo di immobilizzazione è cruciale.[9-13]

In generale possono essere utilizzate diverse strategie di immobilizzazione: adsorbimento, legami covalenti, intrappolamento, reticolazione o affinità. [14] Tutti questi metodi presentano vantaggi e svantaggi e richiedono strategie e apparati differenti. Pertanto, negli ultimi anni è stato dedicato un enorme sforzo allo sviluppo di nuovi metodi di immobilizzazione [15].

Finora le tecniche che hanno portato alla costruzione di biosensori a base di laccasi sfruttano l'ancoragggio covalente o l'adsorbimento fisico come strategie di immobilizzazione. In entrambi i casi si sono ottenuti scarsi risultati in termini di stabilità e conservazione, che solitamente devono avvenire in condizioni asciutte e a 4°C [8].

Il nostro gruppo nel progetto "DESIR" finanziato dalla Regione Lazio (2018-2020) ha dimostrato come l'uso della tecnica ESD per eseguire immobilizzazioni a pressione e temperatura ambiente, possa essere impiegato per la produzione di un biosensore a base di laccasi a basso costo, durevole e riutilizzabile, che non necessita di stoccaggio in atmosfera controllata ma può essere mantenuto a temperatura e pressione ambiente ed esposto alla luce solare per un lungo periodo di tempo (fino a 3 mesi) mantenendo inalterate le sue prestazioni. Inoltre tale biosensore prodotto tramite ESD mostra possibilità di riutilizzo fino a 60 volte consecutive e un utilizzo per analisi singola fino ad oltre un anno se sottoposto a ricondizionamento tramite ESD, sottolineando la possibilità di un'applicazione industriale che miri a ridurre l'inquinamento legato ai dispositivi usa e getta.

Le prospettive future e l'idea alla base della presente proposta è quella di caratterizzare questi nuovi biosensori con tecniche diverse dalla consueta analisi elettrochimica, per comprendere le caratteristiche molecolari che rendono questi nuovi biosensori così promettenti.

Nel campo della Chimica Verde per la Salute il set-up ESD, nel progetto SENSOCARD, finanziato dalla Regione Lazio (2020-2022) è stato sfruttato per la fabbricazione di biosensori home-made per la rilevazione di marker cardiaci attraverso l'immobilizzazione di aptameri. La metodica ESD ha rivelato risultati performanti in termini di riproducibilità anche con questo diverso biorecettore. La possibilità di produrre biosensori innovativi, durevoli e di facile utilizzo per l'analisi clinica aprirà la strada a una nuova era della telemedicina e della terapia personalizzata accessibile a tutti.

Durante proprio lo svolgimento del progetto E-CROME finanziato dalla Regione Lazio (2021-2023) si tenterà di sviluppare una piattaforma biosensoristica specifica in grado di monitorare da remoto lo sato di salute dei pazienti oncologici sottoposti a terapia domiciliare. Inoltre nell'ulteriore ambito dello sviluppo di sensori per diagnosi clinica si collaborerà tramite il nuovo dottorando con il Pasteur Institute, Pathogenesis of vascular infections lab.

Il presente progetto mira proprio a indagare le ragioni dell'immobilizzazione, così efficiente del biorecettore che si è ottenuta sui diversi elettrodi serigrafati. L'obiettivo è di enorme interesse poiché a livello industriale la conservazione la stabilità e il riciclo del biosensore sono parametri fondamentali per una produzione massiva ecostostenibile ed econimica e strettamente connessi alle strategie di immobilizzazione.

La tecnologia ESD si basa sul "soft landing" di ioni su un substrato a pressione e temperatura ambiente[16]. Ciò che accade alle molecole durante l'intero processo è tuttora oggetto di discussione. Lo studio di questo processo di immobilizzazione a livello molecolare ha basi fondamentali nella fabbricazione di biosensori e potrebbe migliorare la conoscenza dei processi chimici che potrebbero essere utilizzati per la produzione di altri tipi di sensori e biosensori.

Grazie ad un team interdisciplinare, alle risorse presenti sia al CNR dove è collacata la sorgente ESD, che a quelle del dipartimento di chimica (SAXS, NMR) e all'interno del gruppo disciplinare CHIM03 (ATR, Porosimetro) l'obiettivo principale sarà quello di estendere la conoscenza di questi biosensori riciclabili e di lungo utilizzo a livello molecolare utilizzando diversi approcci: dalle microscopie (collaborazione con il

Laboratoire de Chimie Physique Université Paris Sud, Orsay) alle spettroscopie (collaborazione con il CFEL-DESY, dove il dottorando svolgerà un periodo di ricerca) e strumenti analitici (collaborazione con la Biosensor srl dove il dottorando eseguirà un percorso formativo nel settore) per validare come la tecnica di immobilizzazione ESD sia adatta a produrre dispositivi ad alte prestazioni in termine di conservazione e riutilizzo e quindi più green per una produzione più economica e ecosostenibile.

Referenze

[1] A. Turner et al.] Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford University Press, 1987, 1, 770.
[2]T. Itoh et al. ACS Sustainable Chem. Eng., 2021,9, 1443–1458.
[3] L. Alvarado-Ramírez et al. Int J of Bio. Macromol. 2021, 181 683–696.
[4] N.R. Mohamad et al. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2015, 29, 205–220
[5] N.A. Daronch et al. Chem. Eng. J., 2020, 397, 125506
[6] M.C. Castrovilli, P. Bolognesi, J. Chiarinelli, L. Avaldi, A. Cartoni et al. Biosens. Bioelectron. 2020, 163, 112299.
[7] M. C. Castrovilli, E. Tempesta, A. Cartoni et al. submitted at ACS Sustainable Chem. Eng.
[8] M. Taheran et al. ACS Sustainable Chem. Eng. 2017, 5, 10430-10438.
[9] M.C. Castrovilli et al. Trends Anal Chem, 2019, 119, 115615
[10] H. Virtanen et al. Technol Sci, 2014, 27, 819–830
[11] E. Touloupakis et al. Sens Actuators, B, 2014, 193, 301– 305
[12] L. Gonzalez-Macia et al. Analyst, 2010, 135, 845–867.
[13] S. Andreescu et al. Biomol. Eng. 2006, 23 , 1-15.
[14] S.K. Arya et al. Biosens. Bioelectron. 2008, 23, 1083-1100.
[15] A. Sassolas et al. Biotechnol. Adv 2012, 30, 489-511.
[16] A. K. Badu-Tawiah et al Anal. Chem. 2011, 83, 2648-2654

Titolo del progetto (inglese): GREEN CHEMISTRY FOR SUSTAINABLE BIOSENSORS

Progetto di ricerca (inglese):

The development of selective, eco-friendly, low cost, reusable and recycling tools for molecules and biomolecules detection in different fields such as atmosphere study, food industry or clinical analyses is strongly required. In this regard, there is a huge interest in the development of new sensors and biosensors that are simple, miniaturized, and handy tools complementary to classical more expensive analytical methods.

The COVID-19 pandemic has indeed highlighted the urgent demand of rapid, sensitive and reliable diagnostic tools for clinical analysis which in the current state of the art is too expensive and inaccessible to purchase by people with limited financial resources. Closely related to the matter there is the strong necessity of industrial biosensors production processes which have to be not only environmental-friendly but also cheaper in order to reduce the cost of mass production.

Biosensors [1] are chemical sensors composed of two elements, a bioreceptor (e.g. enzyme, antibody) that recognizes the analyte (e.g. enzyme substrate, antigen, protein), and the transducer that converts the bio-chemical signal resulting from the interaction of the analyte with the bio-receptor into another type of signal whose intensity is directly or inversely proportional to the analyte concentration.

In the fabrication process of a biosensor, immobilization strategies of the bioreceptor appear as a key factor to develop an efficient tool with appropriate performances. The immobilization procedure must preserve the maximum activity of the bioreceptor and maximize the performance of the device in terms of storage and reuse, the latter being mandatory in order to reduce the pollution due to disposable devices [2, 3,4]. The immobilization procedure is capable of facilitating the recycling, allowing a reduction in the cost of the biosensor production process by up to 50% [5].

In the field of Green Chemistry and White Biotechnology for Environment, our group (Sapienza and ISM-CNR) are currently manufacturing new promising amperometric laccase-based biosensors with unprecedented reuse and storage capabilities by using the ambient ElectroSpray Deposition (ESD) methodology as immobilization technique to anchor the enzyme on carbon black [6] and currently on more sustainable carbon screen printed electrode in order to

detect catechol molecules. The manufacturing process employs sustainable chemistry [7]. Indeed the entire production process exploits only very low quantities of water and ethanol (or methanol) and the enzyme laccase is used as it is supplied by the company, without any further purification processes.
In the literature there are numerous works that report laccase immobilized on surfaces for the removal of pollutants, but in most cases pretreated surfaces are used to facilitate the anchoring of the enzyme and
purified laccase is used. The authors point out that the use of raw laccase would be a much cheaper process [8]. Enzymatic degradation with ligninolytic enzyme, e.g., laccase, is also a potential green solution for removal of pharmaceutical compounds [8]. For all these reasons, the fields of green chemistry and white biotechnology look at biocatalysts as cutting-edge technology thanks to their ability to exploit the selectivity and low energy requirements of enzymes to create non-toxic biosensing devices.
It must be taken into account that an enzyme undergoes changes in its physical and chemical properties upon immobilization, depending on the choice of immobilization method. Thus the maintenance of the catalytically active tertiary structure is a key factor to maximize the stability and reactivity of the enzyme in its immobilized state [9-13].
In the case of enzymes immobilization on the surface of a screen printed electrode (SPE), an inappropriate immobilization process could influence the electron transfer between the enzyme and the working electrode, decreasing the performance of a third generation biosensor. Various immobilization strategies can be used: adsorption, covalence, entrapment, crosslinking or affinity. [14] All these methods have advantages and drawbacks and require different strategies and equipments. Hence, in the last years a huge effort has been devoted for the development of new immobilization methods.[15]
Up to now the techniques that have led to the construction of highly sensitive laccase based biosensors exploit covalent attachment or physical adsorption as immobilization strategies. In both cases poor results in terms of stability and storage, which usually must occur in dry conditions at 4°C [8], have been achieved.
During the recent DESIR project, funded by Lazio region (2018-2020), we have demonstrate how the use of the ElectroSpray Deposition (ESD) technique to perform ambient soft-landing immobilization can be employed for the production of a durable and reusable low cost laccase-based biosensor, which do not need storage in controlled atmosphere but can be maintained at room temperature and pressure and exposed to sunlight for a long period of time (up to 3 months) keeping its performance unchanged. Moreover such a biosensor produced by ESD shows the possibility of reuse up to 60 consecutive times and a use up to over one year if subjected to reconditioning via ESD, underlining the possibility of industrial application which aim to reduce pollution linked to disposable devices.
The future perspectives and the idea at the basis of the present proposal is to characterize these new biosensors with different techniques to understand the molecular basis that makes the new biosensors so promising.
In the field of Green Chemistry for Health the ESD set-up, in the project SENSOCARD, funded by Lazio region (2020-2022), has been exploited for the fabrication of homemade biosensors for the detection of cardiac markers through the immobilization of aptamers. The ESD method has revealed performing results in term of reproducibility also with different bio-receptors: aptamer instead of enzyme.
The possibility to produce innovative and user-friendly biosensors for clinical analysis will pave the way for a new age of telemedicine and personalized therapy. During the development of the E-CROME project funded by the Lazio Region (2021-2023), we will try to develop a specific biosensor platform for blood counts and electrolytes capable of remotely monitoring the state of cancer patients in home therapy. Moreover, in the further area of sensors development for the clinical diagnosis of infections, we will collaborate, through the PhD student, with the Pasteur Institute, Laboratory for the Pathogenesis of Vascular Infections (Paris).
The present project precisely aims to investigate the reasons of the very efficient immobilization of the bioreceptor on different screen printed electrodes. The goal is of huge interest since at industrial level the storage and stability of the biosensors are fundamental parameters and they are strictly connected to immobilization strategies. The ESD technology is based on ions soft landing on a surface at ambient pressure and temperature [16]. What happens to the molecules during the all process from ambient ESI to electrode is still a difficult task. The study of this immobilization process at the molecular level proposed in this project have fundamental basis in the fabrications of biosensors and could improve the knowledge of the chemical processes that could be used for the production of other type of sensors

and biosensors.

Thanks to an interdisciplinary team, the main goal will be to extend the knowledge of these high resistant biosensors at the molecular level by using different approaches, microscopies (collaboration with Laboratoire de Chimie Physique Université Paris Sud, Orsay), spectroscopies (collaboration with CFEL-DESY, where the PhD student will spend 4 months) and analytical tools (Biosensor SRL, where the PhD student will perform a training course in the field) to prove how the ESD immobilization technique is suited to manufacture high performance ecofriendly low cost devices in term of storage and reuse.

References

[1] A. Turner et al.] Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford University Press, 1987, 1, 770.

[2]T. Itoh et al. ACS Sustainable Chem. Eng., 2021,9, 1443–1458.

[3] L. Alvarado-Ramírez et al. Int J of Bio. Macromol. 2021, 181 683–696.

[4] N.R. Mohamad et al. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2015, 29, 205–220

[5] N.A. Daronch et al. Chem. Eng. J., 2020, 397, 125506

[6] M.C. Castrovilli, P. Bolognesi, J. Chiarinelli, L. Avaldi, A. Cartoni et al. Biosens. Bioelectron. 2020, 163, 112299.

[7] M. C. Castrovilli, E. Tempesta, A. Cartoni et al. submitted at ACS Sustainable Chem. Eng.

[8] M. Taheran et al. ACS Sustainable Chem. Eng. 2017, 5, 10430-10438.

[9] M.C. Castrovilli et al. Trends Anal Chem, 2019, 119, 115615

[10] H. Virtanen et al. Technol Sci, 2014, 27, 819–830

[11] E. Touloupakis et al. Sens Actuators, B, 2014, 193, 301– 305

[12] L. Gonzalez-Macia et al. Analyst, 2010, 135, 845–867.

[13] S. Andreescu et al. Biomol. Eng. 2006, 23 , 1-15.

[14] S.K. Arya et al. Biosens. Bioelectron. 2008, 23, 1083-1100.

[15] A. Sassolas et al. Biotechnol. Adv 2012, 30, 489-511.

[16] A. K. Badu-Tawiah et al Anal. Chem. 2011, 83, 2648-2654