



ENZIMI HI-TECH: IL FUTURO DEI BIOSENSORI

L'attività di ricerca legata al 'Premio Giovane Ricercatore' 2022, assegnato dalla Divisione di Chimica Analitica della Società Chimica Italiana, riguarda lo sviluppo di biosensori, con particolare riferimento agli studi che hanno portato all'individuazione di soluzioni innovative per il trasferimento elettronico diretto tra enzimi e superfici elettrodiche.

La ricerca per la quale ho ricevuto il Premio 'Giovane Ricercatore' 2022 riguarda il lavoro svolto nell'ultimo decennio presso diverse istituzioni sia nazionali, quali l'Università degli Studi di Bari Aldo Moro e l'Università degli Studi di Roma 'La Sapienza', che internazionali, quali Lund University (Svezia), Åbo Akademi University (Finlandia) e Clarkson University (New York, USA). Il lavoro svolto in questi anni, si inserisce all'interno di un contesto di ricerca che va dagli aspetti concettuali verso l'applicazione tecnologica dei biosensori enzimatici. In particolare, ci siamo occupati dello sviluppo di nanomateriali e strategie innovative per l'immobilizzazione di enzimi su superfici elettrodiche al fine di ottenere biosensori *Point-of-Care* (PoC) basati sul *direct electron transfer* (DET). Quest'ultimo ha il vantaggio di poter minimizzare i potenziali interferenti analitici, massimizzare la sensibilità, la stabilità e la robustezza del metodo di analisi. Sono stati prodotti elettrodi modificati con nanomateriali carboniosi (es. nanotubi di carbonio e grafene) e metallici (es. nanoparticelle di oro o argento e oro altamente poroso) che hanno reso più efficienti i processi di immobilizzazione degli enzimi, aumentando sia la ricopertura superficiale ($\sim 10^{12}$ molecole/cm²) che la velocità del trasferimento elettronico. L'aumento quantitativo di alcuni parametri chimico-fisici relativi all'interfacciamento enzima/elettrodo si traducono in un netto miglioramento delle figure di merito dei biosensori enzimatici con particolare riferimento alla sensibilità, robustezza, stabilità e riproducibilità.

La recente pandemia da Covid-19 ha evidenziato la necessità di sviluppare biosensori estremamente

sensibili e selettivi, affidabili e rapidi per consentire una diagnosi precoce di diverse malattie. L'altro aspetto importante riguarda il continuo monitoraggio di biomarker correlati a patologie croniche.

La ricerca nel campo dei sensori e biosensori ha avuto inizio a metà degli anni Cinquanta con l'elettrodo per la determinazione dell'O₂ disciolto nel sangue, sviluppato da Leland C. Clark Jr. (elettrodo di Clark). Successivamente, Clark e Lyons realizzarono il primo biosensore enzimatico presso il Children Hospital of Cincinnati partendo dall'immobilizzazione della glucosio ossidasi (GOx) all'interno di un sandwich di membrane idrofobiche che sono state depositate su un elettrodo di Clark in grado di misurare la variazione di ossigeno per effetto della reazione di ossidazione catalizzata dalla GOx. Successivamente, con l'introduzione degli elettrodi a stato solido, la ricerca è stata indirizzata verso lo sviluppo di nanomateriali cataliticamente attivi (es. nanoparticelle di Prussian Blue, mediatori elettrochimici a base di osmio o ferrocene) e strategie innovative per l'immobilizzazione di enzimi.

A questo punto, è necessario classificare i biosensori in quattro gruppi (Fig. 1): la prima generazione basata sul monitoraggio del consumo di O₂ o produzione di H₂O₂ (meccanismi di ossidazione/riduzione), la seconda generazione (gruppo A) basata su mediatori elettronici (es. polimeri a base di osmio, ferrocene ecc.) che trasportano gli elettroni da/verso l'elettrodo, la seconda generazione (gruppo B) basata su catalizzatori attivi verso l'ossidazione di nicotinammide adenina dinucleotide (NADH, forma ridotta) prodotto dalle ossidoreduttasi NAD dipendenti, e

A Paolo Bollella è stato assegnato Premio "Giovane Ricercatore" 2022 dalla Divisione di Chimica Analitica della SCI.

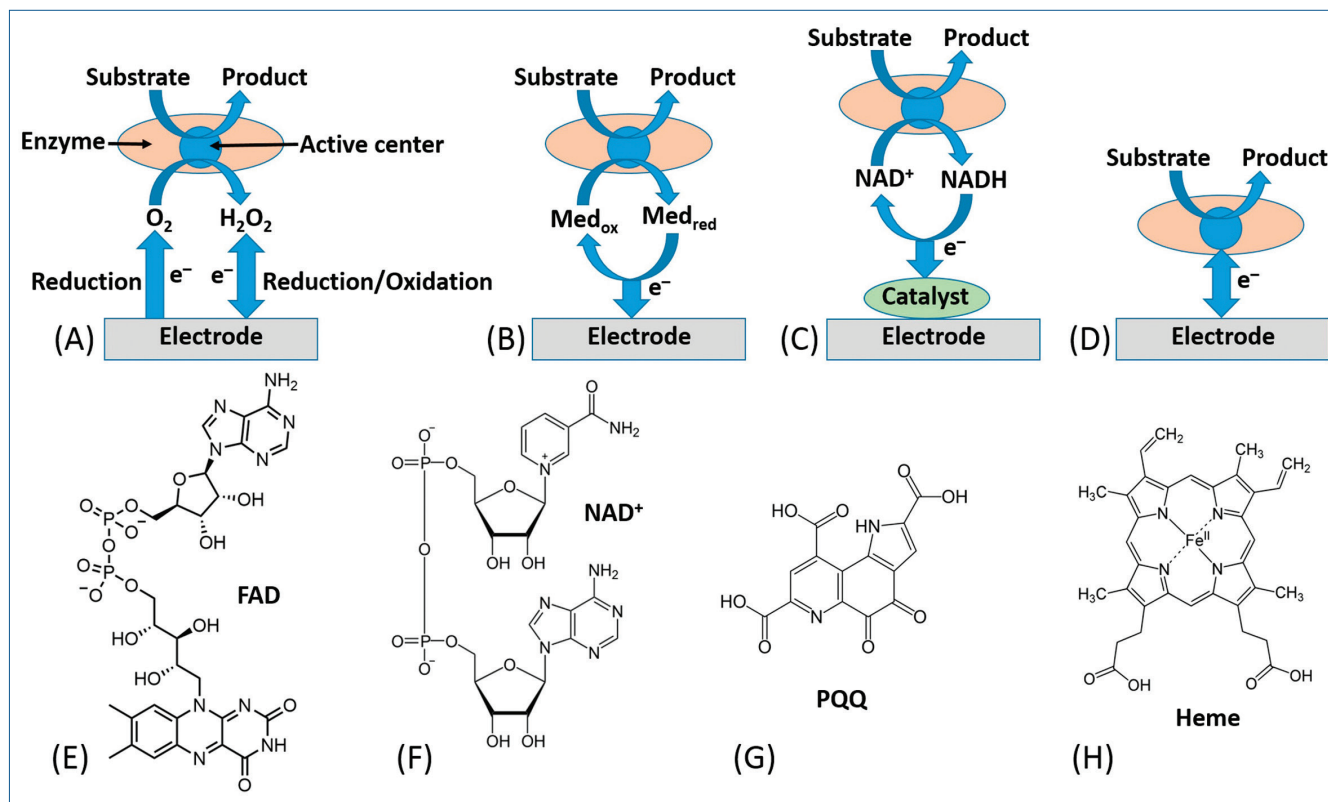


Fig. 1 - (A-D) Differenti meccanismi di trasferimento elettronico classificati come 1^a generazione, 2^a generazione (gruppo A), 2^a generazione (gruppo B) e 3^a generazione. (D-H) Strutture chimiche di alcuni gruppi prostetici contenuti negli enzimi redox. Immagine riprodotta in accordo con licenza Creative Commons Attribution (CC BY) (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) da P. Bollella, E. Katz, *Sensors*, 2020, 20, 3517.

la terza generazione basata sul trasferimento diretto di elettroni da/verso l'elettrodo. Sulla base di queste definizioni, si potrebbe pensare in maniera quasi ottimistica di poter 'facilmente' realizzare un biosensore di terza generazione. Tuttavia, solo 50 ossidoriduttasi su 3800 (ossia l'1,3%) sono in grado di trasferire elettroni direttamente da/verso l'elettrodo.

La continua ricerca di una soluzione a questo problema è stato il *leitmotiv* specialmente a inizio carriera, su cui ci siamo concentrati con i miei colleghi considerando aspetti più teorici e fondamentali in questo campo (es. determinazioni di costanti di trasferimento elettronico, parametri cinetici, energie di reazione ecc.), per poi *catalizzare* una evoluzione, durante il periodo post-dottorale, verso lo sviluppo di piattaforme applicative come biosensori indossabili, celle a biocombustibile, enzimi chimerici ed elettrodi 'sense-act-treat'.

Inizialmente, siamo stati in grado di ottenere il trasferimento elettronico diretto da *Corynascus thermophilus* cellobiosio deidrogenasi (CDH) attraverso

so elettrodi con una nanostrutturazione ordinata. Quest'ultima è stata realizzata attraverso l'utilizzo di nanoparticelle d'oro ottenute con un approccio green, legate attraverso un linker bifunzionale ad un elettrodo d'oro, quasi a svolgere la funzione di antenna per l'orientazione delle molecole di enzima sulla base di interazioni elettrostatiche. Ciò ha permesso di favorire un'immobilizzazione efficiente della CDH, incrementando il loading enzimatico, la sensibilità (10 volte rispetto all'elettrodo non modificato), la stabilità (76% di risposta dopo 20 giorni) e la riproducibilità (valori di deviazione standard relativa <3,7% nei campioni reali). La ricerca è stata successivamente indirizzata verso l'elettrosintesi di nanomateriali, dapprima microparticelle di oro, per poi ottenere oro altamente poroso. Quest'ultimo ha permesso di aumentare l'area reale superficiale degli elettrodi di 3 ordini di grandezza ($\times 10^3$), consentendo di aumentare illimitatamente il ricoprimento superficiale e stabilendo il record di densità di corrente estratta da un layer enzimatico su oro, ossia 1 mA/V

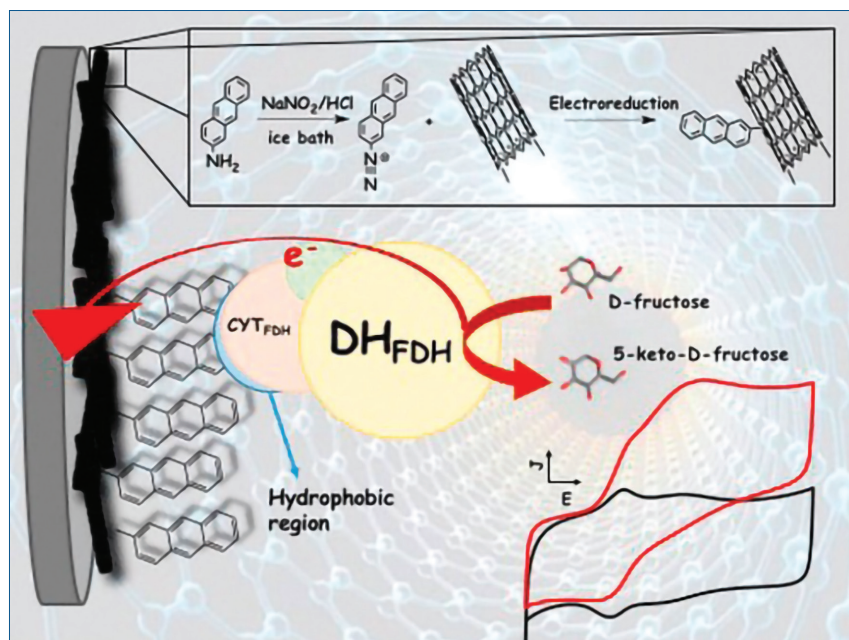


Fig. 2 - Meccanismo di elettrografting del sale di diazonio del 2-amminoantracene che ha permesso di isolare il contributo dei gruppi eme della FDH al DET. Immagine riprodotta con il permesso della American Chemical Society da P. Bollella *et al.*, *ACS Catalysis*, 2018, 8, 10279.

cm². Alternativamente, per isolare il contributo dei singoli gruppi prostetici all'interno di una macchina enzimatica è stato elettrodepositato il sale di diazonio del 2-amminoantracene generato *in situ*. Questa molecola ad anelli condensati ha permesso di accedere a una tasca idrofobica dell'enzima fruttosio deidrogenasi (FDH) vicina ai gruppi eme 1 e 2 responsabili del DET dell'enzima stesso (Fig. 2).

Durante il periodo post-dottorale, l'attività sperimentale è stata focalizzata sullo sviluppo di dispositivi per il monitoraggio del lattato e del glucosio in fluido interstiziale utilizzando elettrodi a base di *microneedles* (collaborazione con il Prof. Anthony E.G. Cass, Imperial College of London) che sono stati testati in sistemi modello che permettevano di riprodurre il sistema circolatorio periferico (in prossimità del derma). Questo approccio è stato considerato recentemente dal nostro gruppo di ricerca per lo sviluppo di elettrodi *sense-act-treat* in grado di rilevare parametri vitali del paziente (es. pO₂, pCO₂, pH, lattato) durante la fase di coma farmacologico che permettano di attivare in remoto un profilo terapeutico customizzato (collaborazione attiva con il Prof. Gaetano Perchiizzi, Uppsala University).

Per quanto riguarda lo sviluppo di celle a biocombustibile ci siamo concentrati sul miglioramento delle

loro prestazioni tecniche, riuscendo a raddoppiare in alcuni casi il potenziale erogato attraverso la combinazione in serie di celle a biocombustibile singole in cui il catodo veniva opportunamente ottimizzato applicando diversi protocolli di biofunzionalizzazione (Fig. 3). Per l'alimentazione di dispositivi elettronici (es. sensore di temperatura), la cella a biocombustibile è stata connessa a un supercapacitore in grado di accumulare l'energia prodotta.

Una parte interessante della ricerca ha, inoltre, riguardato la possibilità di ingegnerizzare *ad hoc* enzimi redox introducendo delle funzionalità allosteriche che fossero in grado di modulare l'attività redox attraverso l'interazione con specifici antigeni o biomarker proteici. Questi enzimi sono stati definiti chimerici ripren-

dendo la definizione mitologica di una chimera ('*mostro leggendario nella mitologia greca, in quella romana e in quella etrusca formato con parti del corpo di animali diversi*'), ossia sono composti da una parte in grado di catalizzare reazioni redox (es. PQQ-glucosio deidrogenasi, modello di enzima utilizzato nei nostri studi) e una parte in grado di riconoscere selettivamente degli antigeni e attuare un cambiamento conformazionale (es. calmoduline modificate). Gli enzimi chimerici sono stati immobilizzati sugli elettrodi per fare sensing di biomarker proteici e genomici utilizzando un'unica macchina enzimatica al fine di registrare un segnale amperometrico senza ricorrere ad un label esterno (es. il glucosio è contenuto nella maggior parte dei fluidi biologici) ed evitando la formazione di un sandwich di anticorpi tipo ELISA.

Oltre a queste caratteristiche peculiari, gli enzimi chimerici presentano il grande vantaggio di interagire reversibilmente con il biomarker, quindi consentendo l'utilizzo dell'elettrodo per molteplici analisi a differenza degli assay immunometrici.

In particolare, questi enzimi sono stati impiegati per lo sviluppo di piattaforme *sense-act-treat* basate su operazioni logiche controllate attraverso l'algebra Booleana applicata agli enzimi chimerici.

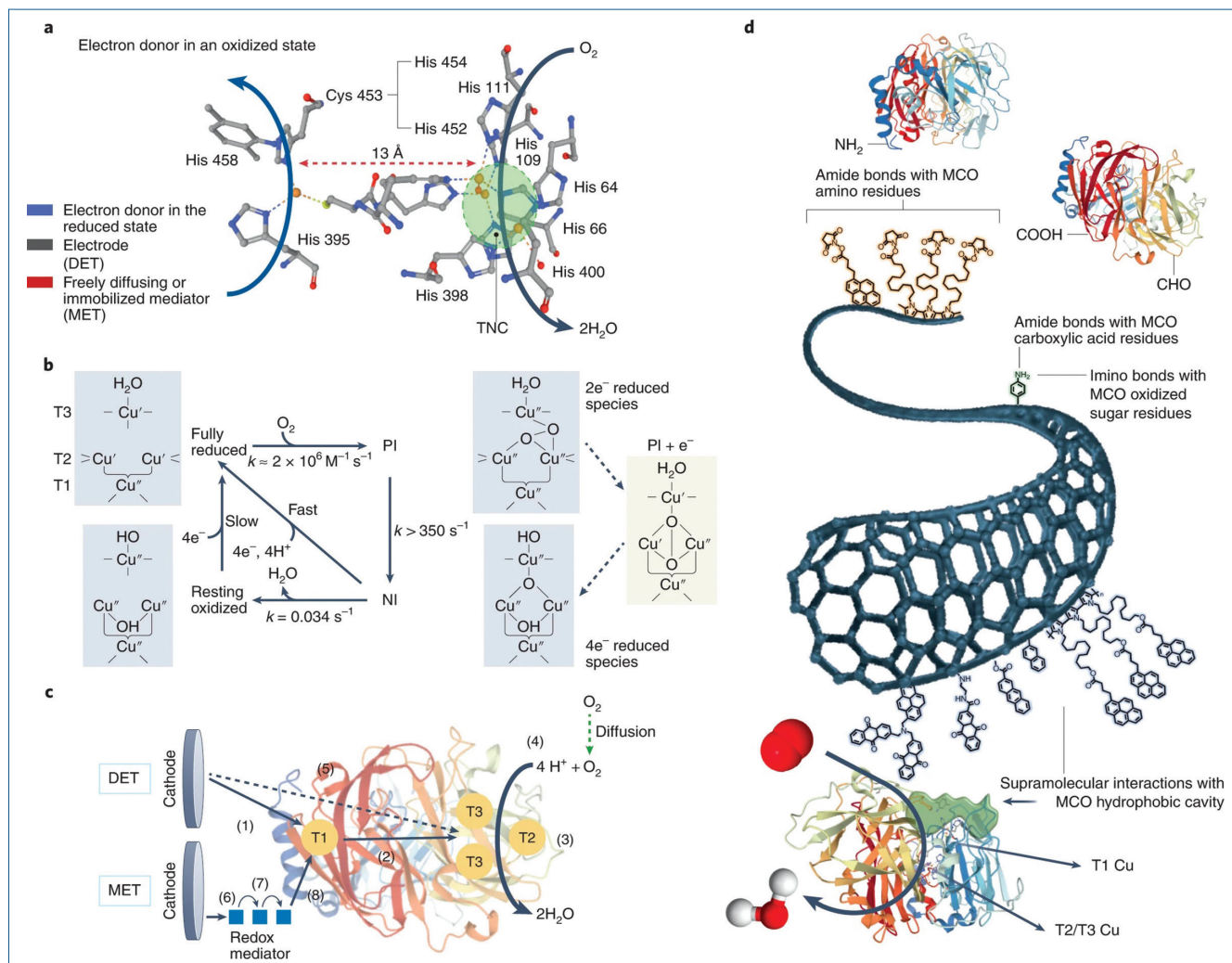


Fig. 3 - (A, B) Meccanismo di trasferimento elettronico in fase omogenea nelle Multi-Copper Oxidases (MCOs). (C) Meccanismo di trasferimento elettronico in fase eterogenea (enzima/elettrodo) nelle MCOs. (D) Differenti strategie di immobilizzazione delle MCOs. Immagine riprodotta con il permesso di SpringerNature da C. Santoro, P. Bollella *et al.*, *Nature Catalysis*, 2022, 5, 473.

Nell'ultima fase di contaminazione scientifica, insieme alla Prof.ssa Luisa Torsi, abbiamo pensato di estremizzare il concetto di sensibilità di un biosensore amperometrico, elaborando il concetto rivoluzionario di *wide-field single molecule electrochemistry* che consentirà di raggiungere il limite fisico di sensibilità, appunto la singola molecola, attraverso un doppio meccanismo di amplificazione basato sull'interfacciamento strumentale tra una cella a bicombustibile e un transistor a giunzione bipolare e il processo di *recycling* enzimatico. In conclusione, attraverso una ricerca multidisciplinare e la contaminazione trasversale sono state poste le basi per l'evoluzione futura dei biosensori enzimatici amperometrici.

Ringraziamenti

La ricerca di alto profilo sviluppata in questi anni è frutto della collaborazione con esperti che hanno avuto un ruolo fondamentale nello sviluppo delle tematiche promosse dalla Divisione di Chimica Analitica che ringrazio sentitamente per il riconoscimento assegnato.

Hi-Tech Enzymes: The Future of Biosensors

The research activity related to the 'Premio Giovane Ricercatore' 2022 of the Analytical Chemistry Division of the Italian Chemical Society refers to biosensors development particularly considering innovative approaches to investigate direct electron transfer mechanisms.