



BIOSENSORI OTTICI PER LA TRANSIZIONE ECOLOGICA

Il Green Deal Europeo promuove un modello di economia circolare e mira ad un'Europa climaticamente neutrale entro il 2050 con la creazione di sistemi di analisi avanzati e integrati per migliorare la gestione dei rifiuti, delle risorse naturali e valorizzare i sottoprodotti. I biosensori ottici sono un valido strumento per identificare tempestivamente rischi e relativi impatti sui sistemi naturali e industriali.

La Transizione Ecologica, finalizzata al miglioramento della sostenibilità del sistema economico per assicurare una transizione equa e inclusiva verso una società a impatto ambientale zero, rappresenta uno dei pilastri del Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza (PNRR). Per raggiungere tale obiettivo sono previsti ingenti investimenti in diversi settori quali l'agricoltura sostenibile, l'economia circolare, la transizione energetica, la mobilità sostenibile, l'efficienza energetica degli edifici e delle risorse idriche. In tutti questi settori è necessaria la disponibilità di metodi analitici e sistemi avanzati e integrati di analisi al fine di rendere più robuste le infrastrutture critiche e le reti energetiche, migliorare la gestione dei rifiuti, adottare soluzioni *smart* per l'agricoltura, la difesa della biodiversità e rafforzare la gestione delle risorse naturali [1].

Nel corso degli anni, sono state sviluppate numerose tecnologie di recupero con l'obiettivo di passare da un'economia lineare ad un nuovo modello di economia circolare. La European Environment Agency (EEA) e il Green Deal Europeo promuovono tale modello mirando ad un'Europa climaticamente neutrale entro il 2050, rilanciando l'economia attraverso la tecnologia *green*, creando industrie e trasporti sostenibili e riducendo l'inquinamento [2]. Ciò deriva dalla necessità di diminuire i forti livelli di stress a cui è sottoposto il nostro pianeta a causa dello squilibrio tra produzioni e consumi, l'uso sproporzionato delle risorse naturali con conseguenze devastanti anche sul clima.

In questo contesto, i sistemi di analisi, previsione e monitoraggio di tecnologia 4.0, come sensori e biosensori, droni anche basati su *Internet of Things (IoT)*, stanno assumendo un ruolo sempre più importante nella gestione in qualità e sicurezza delle imprese, poiché permettono di identificare tempestivamente minacce di rischio e relativi impatti sui sistemi naturali e industriali [1].

Secondo la definizione IUPAC i sensori chimici sono dispositivi in grado di trasformare un'informazione chimica, ad esempio la concentrazione di un singolo componente specifico del campione in analisi o le singole concentrazioni dei componenti, in un segnale analitico. I sensori sono costituiti principalmente da due componenti: un sistema di riconoscimento chimico molecolare e un elemento di trasduzione fisico-chimico, a diretto contatto l'uno con l'altro. I biosensori non sono altro che particolari sensori chimici, ovvero dispositivi analitici capaci di fornire specifiche informazioni analitiche semi-quantitative o quantitative utilizzando un elemento di riconoscimento biologico (recettore biochimico), il quale si trova a stretto contatto con l'elemento di trasduzione [3].

Le caratteristiche dei (bio)sensori li rendono strumenti analitici ottimali per una maggiore sostenibilità delle analisi e, grazie alla *green chemistry* e all'impiego di materiali ecosostenibili quali la carta, è possibile ridurre ulteriormente l'impatto ambientale. Sensori e biosensori sono largamente utilizzati in numerosi campi, quali diagnostica clinica, ambien-



tale, alimentare e forense, poiché permettono di ridurre al minimo gli sprechi di materiale, reagenti e/o energia, di analizzare in maniera quantitativa la presenza di contaminanti e valutare la bio-attività dei prodotti di scarto dalla filiera agro-alimentare al fine di valorizzarli nell'ottica dell'economia circolare. Inoltre, possono essere utilizzati sia in laboratorio che direttamente sul campo anche da personale non qualificato con tempistiche rapide di analisi, in genere da qualche minuto a un'ora, con prestazioni analitiche spesso simili a quelle ottenute con metodiche standard effettuate in laboratori di analisi.

Gli elementi di riconoscimento utilizzati nei biosensori, quali enzimi, anticorpi, oligonucleotidi e cellule viventi (ad es. batteri, lieviti e cellule di mammifero), conferiscono al dispositivo la specificità richiesta verso l'analita da determinare. Dall'interazione tra analita e l'elemento di riconoscimento biologico si genera un segnale quantificabile e proporzionale alla concentrazione dell'analita o correlato alla sua biodisponibilità. In base al tipo di segnale generato, l'elemento di trasduzione può essere di tipo elettrochimico, gravimetrico oppure ottico (Fig. 1).

I biosensori ottici maggiormente utilizzati per applicazioni nel settore agroalimentare si basano su misure di assorbanza, fluorescenza e bio-chemiluminescenza.

Questi biosensori sono generalmente accoppiati a rivelatori di luce portatili per l'acquisizione del segnale e l'analisi di analiti di interesse ambientale, clinico e forense. Recentemente, la disponibilità di smartphone con sensori di immagini digitali ad alte prestazioni, sistemi operativi e capacità di memoria elevate paragonabili a computer miniaturizzati ma più economici e dai comparabili livelli di accuratezza e sensibilità rispetto ai rivelatori portatili come i Charge Coupled Devices (CCDs) e Complementary

Metal Oxide Semiconductor (CMOS), ha completamente ridisegnato il panorama dell'analisi *point-of-need* [4].

Biosensori per la valorizzazione degli scarti agro-alimentari

Quando si parla di applicazioni nel dominio FEAST (Food, Environmental and Agricultural Sensing Technologies) di notevole importanza sono le piattaforme di biosensori ottici biodegradabili e biocompatibili [5].

I rifiuti agricoli e gli scarti dell'industria agro-alimentare derivanti dai processi produttivi possono rappresentare un'alternativa economicamente vantaggiosa alle comuni materie prime industriali o ai materiali per lo sviluppo di biosensori, poiché riutilizzabili come composti bio-attivi in ambito cosmetico, nutraceutico e alimentare o essere valorizzati come nuovi materiali per lo sviluppo di biosensori. La progettazione di un biosensore richiede la selezione di un opportuno substrato su cui possano essere immobilizzati gli elementi di riconoscimento biologico al fine di fornire una struttura portatile che utilizzi piccole quantità di materiale per eseguire un test. Per selezionare il substrato vengono considerate diverse caratteristiche, tra cui flessibilità, biocompatibilità, biodegradabilità, disponibilità, rapporto costo-efficacia, modifica della superficie, permeabilità. Vetro, polidimetilsilossano e silicone sono stati ampiamente utilizzati come substrati ma negli ultimi decenni la carta, grazie alla sua struttura fibrosa facilmente modificabile, con eccellenti proprietà ottiche, elevata resistenza e area superficiale specifica, è sicuramente il supporto maggiormente utilizzato [6].

La continua richiesta *green* ha aperto la strada allo sviluppo di diversi sensori *paper-based*, che sfruttano la natura capillare della carta non solo per lo

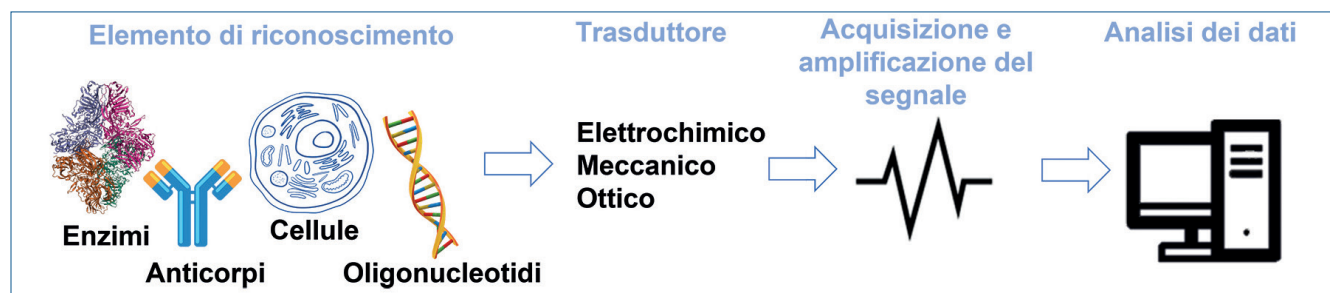


Fig. 1 - Struttura schematica di un biosensore

scorrimento di campioni liquidi ma anche per la penetrazione di campioni gassosi attraverso le sue trame e la sua flessibilità, caratteristiche che permettono la fabbricazione di sensori con specifici design tridimensionali (3D) e la possibilità di eseguire test rapidi e sul campo, spaziando da reazioni singole a reazioni multi-step.

Il metodo PMZ (Paper MicroZone) sfrutta fogli di carta con zone colorate create mediante fissaggio con fotoresistori, stampa a cera o colla al fine di formare delle barriere idrofobiche in cui gli elementi di riconoscimento biologico possono essere immobilizzati, delimitando l'area di test in cui reagenti e campioni possono essere aggiunti. La qualità dell'analisi che si ottiene con questa tecnica è paragonabile a quella ottenuta da sistemi sensoristici sofisticati e più costosi [7]. Grazie alla sua composizione idrofila la carta favorisce il trasporto passivo delle soluzioni senza l'utilizzo di pompe ed è compatibile con numerosi tipi di reazioni chimiche. Recentemente, substrati alternativi 'verdi' sono stati ottenuti utilizzando prodotti di scarto da bucce di semi soia e paglia di frumento, polpa di barbabietola da zucchero, polpa di patate e rape sono già considerate materiali riutilizzabili per la produzione della cellulosa, insieme a lolla di riso e bagassa di canna da zucchero. Inoltre, scarti della macinazione del riso e della spremitura dello zucchero possono essere utilizzati per la produzione a basso costo di grafene, materiale ampiamente utilizzato nello sviluppo di biosensori [8]. Sono stati progettati sensori su carta colorimetrici per misurare la presenza di polifenoli in matrici alimentari acquose e in olio extravergine d'oliva [9] e biosensori cellulari bioluminescenti per analisi di bio-attività di prodotti di scarto al fine di monitorare la presenza di molecole bioattive e valorizzare prodotti di scarto di processi alimentari [10].

Biosensori per il monitoraggio di inquinanti ambientali

Il monitoraggio di contaminanti, quali pesticidi e loro residui che possono contaminare tutta la catena alimentare, rappresenta una sfida per la chimica analitica e, recentemente, la ricerca si è focalizzata sullo sviluppo di sensori rapidi per la determinazione di pesticidi organofosforici e carbammati in prodotti agroalimentari. Sono stati sviluppati diversi

biosensori ottici basati sulla Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR) e biosensori enzimatici su carta in chemiluminescenza per rivelare fitofarmaci organofosforici tramite inibizione dell'enzima acetilcolinesterasi [4]. Recentemente è stato progettato un biosensore ottico su carta basato sull'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, organismo generalmente riconosciuto come sicuro (GRAS) per rivelare erbicidi fotosintetici. Variazioni dell'emissione di fluorescenza della clorofilla algale si verificano in presenza di composti tossici, a causa di una specifica interazione tra l'erbicida fotosintetico e la proteina D1 del Fotosistema II delle alghe. Tale sistema ha un limite di rivelabilità per l'atrazina di 80 ng/L, quindi al di sotto dei limiti di legge europei (0,6-2 µg/L in acque superficiali). Questo fornisce uno strumento analitico pionieristico per applicazioni nell'agricoltura intelligente, risultando anche biodegradabile e senza impatto sull'ambiente [11].

Per valutare la qualità del suolo e dell'acqua è necessario conoscere il pH, i nutrienti, il contenuto di umidità, metalli pesanti e tossine. Un esempio di impiego di materiale di scarto organico, è quello del guscio d'uovo, utilizzato come sensore colorimetrico per rivelare, attraverso il cambiamento dal bianco a diverse tonalità di colore, ioni metallici come V^{4+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e Ag^{+} (Fig. 2) [12].

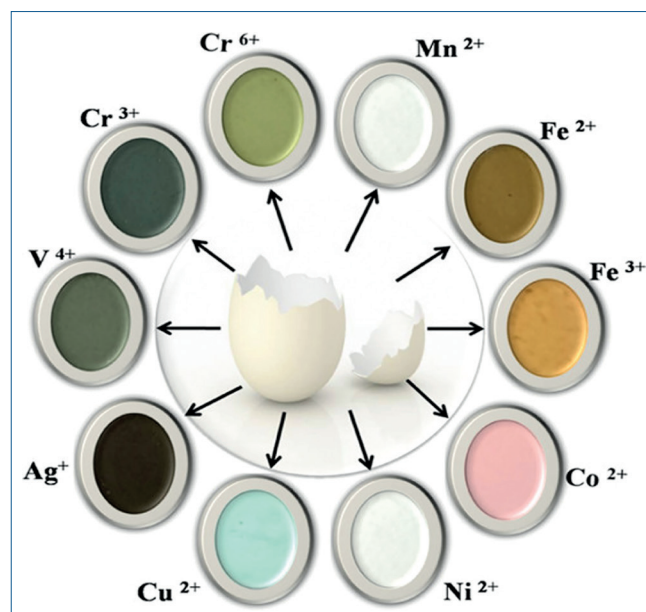


Fig. 2 - Sensore colorimetrico basato su polvere di guscio d'uovo. Riprodotto da [12], 2020 (Copyright ACS)

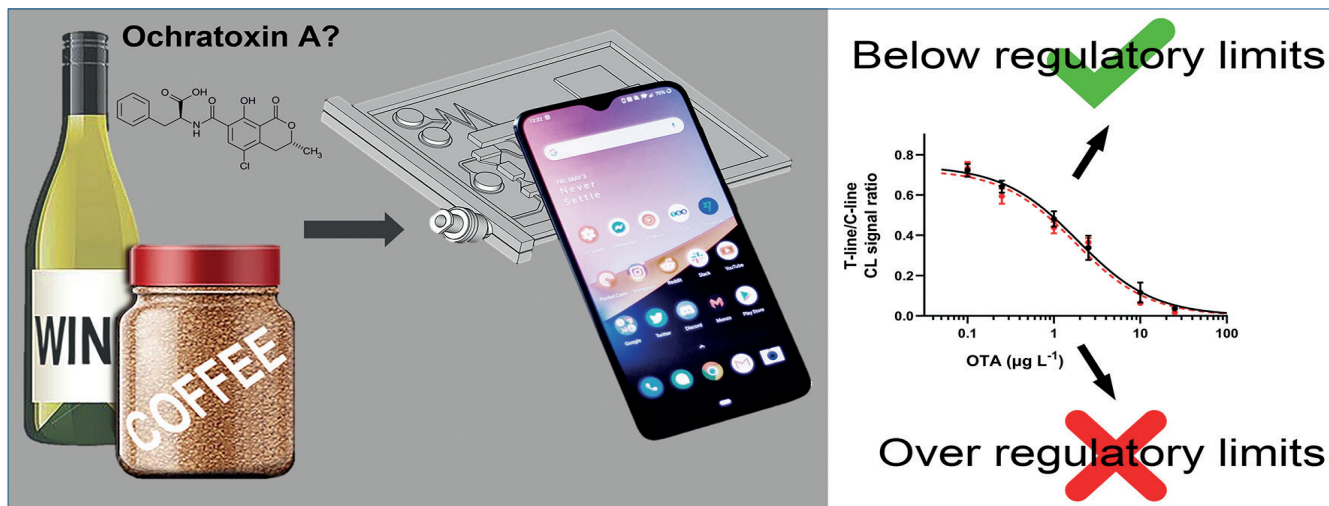


Fig. 3 - Biosensore LFIA per l'ocratossina A

Un'altra applicazione di sensore colorimetrico è stata sviluppata usando un film di cellulosa drogato di antocianine estratte da cavolo viola stampato a getto d'inchiostro per creare un sensore colorimetrico di pH utilizzabile nell'intervallo di pH 2-12 [5]. Piattaforme di *biosensing* costituite da cellule geneticamente modificate sono state proposte come uno strumento utile per poter eseguire test di screening iniziale di campioni ambientali [13] e per determinare, tramite una rivelazione ortogonale in bioluminescenza e riflettanza, la presenza di Hg^{2+} a livelli 0,6 ppb [14], quindi adatto all'analisi di acqua potabile, in cui i livelli massimi di $Hg(II)$ stabiliti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) sono fissati a 6 ppb.

L'esposizione alle micotossine rappresenta un grave rischio per la salute dei consumatori in quanto possono contaminare alimenti e mangimi. Diversi biosensori ottici basati su saggi immunologici a

flusso laterale (LFIA) con rivelazione in chemiluminescenza sono stati sviluppati per rivelare micotossine negli alimenti a concentrazioni sotto il limite di legge europeo, come ad esempio l'ocratossina A nel vino ($0,3 \mu g L^{-1}$) e nel caffè solubile ($0,1 \mu g L^{-1}$) (Fig. 3) [15].

Nell'ottica di eseguire analisi sul campo in zone remote e rurali, è stato proposto l'uso di *lab-on-a-drone*, utilizzando droni quadricotteri, come valida alternativa di piattaforma di analisi portatile (Fig. 4). È stato sviluppato un *lab-on-a-drone* che sfrutta la capacità di eseguire in modo isotermico la reazione a catena della polimerasi (PCR) con un singolo riscaldatore, consentendo al sistema di funzionare impiegando sorgenti USB standard da 5 V che alimentano dispositivi mobili (tramite batteria, solare o manovella). Rivelazione e quantificazione della fluorescenza vengono effettuate tramite la fotocamera

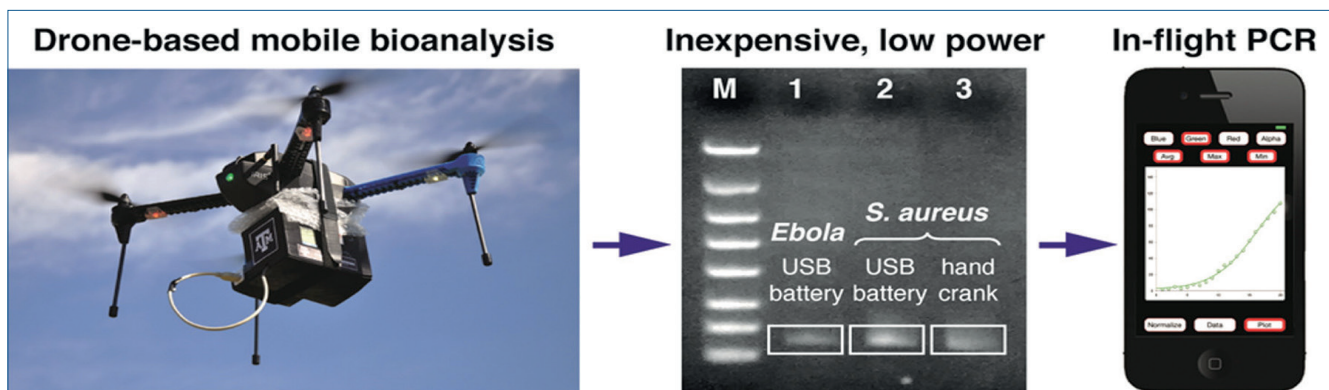


Fig. 4 - Lab-on-a-drone come piattaforma di analisi portatile. Riprodotto da [16], 2016 (Copyright ACS)

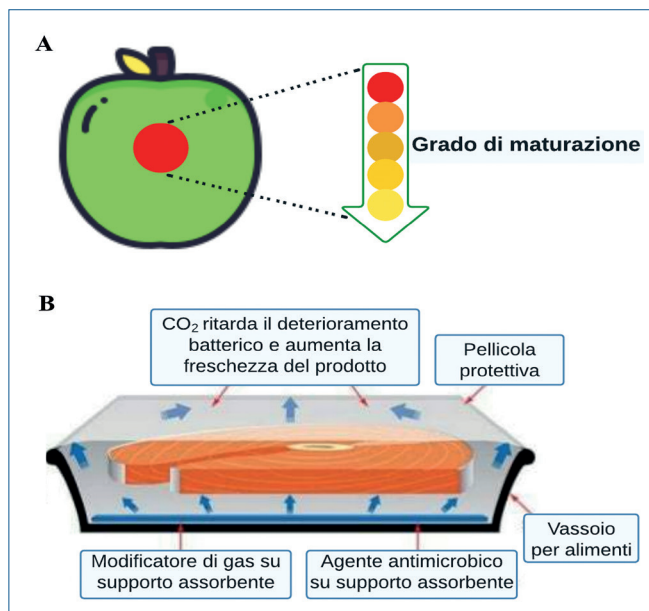


Fig. 5 - A) Sensori per la maturazione della frutta e B) per il packaging

dello smartphone e un'applicazione che permette l'analisi integrata delle immagini. Sfruttando i motori del drone come centrifughe tramite adattatori ottenuti con stampa 3D, è stata automatizzata la preparazione del campione, consentendo l'analisi di DNA/RNA in meno di 20 minuti con un costo totale del *lab-on-a-drone* pari a circa 50 USD [16].

Biosensori per imballaggi alimentari

La crescita dell'industria alimentare e l'aumento della domanda per la conservazione a lungo termine del cibo hanno creato la necessità di sviluppare metodi che possano facilmente tracciare e preservare la freschezza degli alimenti e la sicurezza per tutta la durata di conservazione del prodotto (produzione, conservazione, spedizione e consumo). Questo perché prima che i prodotti alimentari arrivino sulle nostre tavole trascorrono variabili periodi di giacenza in magazzini o supermercati in cui le condizioni ottimali di conservazione possono non essere sempre rispettate. Sensori ed etichette intelligenti possono essere integrati negli imballaggi per aiutare

a monitorare lo stato del prodotto. Questi imballaggi intelligenti possono essere progettati per misurare marcatori di freschezza, quali ammine biogene, e fornire un "indice di qualità" del prodotto in tempo reale, segnalare variazioni di ossigeno, temperatura o pH, così come identificare la presenza di componenti nocivi attraverso un cambiamento di colore (o intensità) o diffusione del colorante al fine di aiutare il produttore o il consumatore a prendere decisioni in merito a durata, sicurezza e qualità del prodotto. Sensori colorimetrici con ottime potenzialità di integrazione negli imballaggi sono stati recentemente sviluppati per valutare la freschezza del pesce [17], il deterioramento della carne [18] o lo stato di maturazione della frutta [19] (Fig. 5).

Un biosensore multicolore è stato sviluppato per rivelare l'ipoxantina come indicatore di freschezza del pesce, attraverso una reazione enzimatica catalizzata dalla xantina ossidasi con produzione di di H₂O₂, che viene ridotto a •OH attraverso la reazione di Fenton causando etching dei *nanorods* di oro e consentendo la visualizzazione dei colori anche ad occhio nudo [17].

La sfida maggiore è ora integrare tali sensori e biosensori all'interno dell'imballaggio, in modo da ottenere nuovi sistemi di *smart & active packaging*, che consentono sia di monitorare la freschezza o la presenza di contaminanti nell'alimento sia di garantirne la qualità tramite la presenza o il rilascio di sostanze utili a bloccare reazioni chimiche indesiderate e creare condizioni di conservazione ottimali.

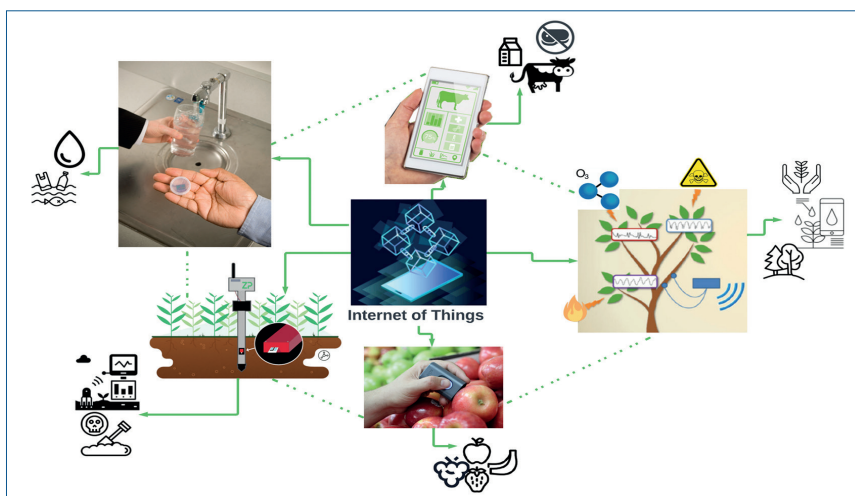
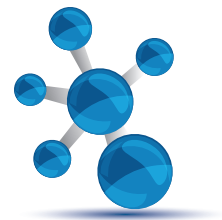


Fig. 6 - IoT applicata alla sensoristica



IoT applicata alla sensoristica

L'utilizzo di sensori e dispositivi nell'ambito di progetti IoT ha lo scopo di migliorare l'efficienza, rilevare e prevenire eventuali problemi e verificare lo stato dei prodotti da remoto. Monitorare lo stato di salute delle piante e del bestiame attraverso l'utilizzo di sensori indossabili, permette di ottenere numerose informazioni al fine di selezionare le strategie migliori da adottare per aumentare la produzione agricola-alimentare riducendo al minimo i consumi e l'impatto ambientale. La possibilità di archiviazione e condivisione dei dati derivante dall'evoluzione dell'IoT favorisce un migliore controllo della sicurezza alimentare e un'agricoltura più sostenibile. Infatti, una rete connessa di dispositivi che raccolgono e condividono informazioni sulle irregolarità dei prodotti all'interno della catena di produzione alimentare offre la possibilità di individuare eventuali rischi e attuare le più idonee misure di prevenzione, al fine anche di evitare frodi alimentari all'interno della catena industriale (Fig. 6). Inoltre, l'uso della tecnologia della *blockchain*, già sperimentata globalmente [20], combinata ai biosensori e all'IoT fornirà un potente strumento per garantire la sicurezza ambientale e un modello circolare di economia, migliorando la qualità di vita dell'uomo.

Conclusioni

I biosensori rivestono un ruolo considerevole per il Green Deal Europeo come sistemi di analisi avanzati, poiché in grado di soddisfare i requisiti analitici richiesti per le diverse applicazioni. Grazie alla loro semplicità di utilizzo e alla loro portabilità, i biosensori sono particolarmente sfruttati in ambito ambientale e agroalimentare e, accoppiati all'IoT, contribuiranno allo sviluppo di un avanzato sistema informativo per la sicurezza alimentare e ambientale e, di conseguenza, per la salute umana e animale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] <https://www.governo.it/sites/governo.it/files/PNRR.pdf>
- [2] Green Transition. Available online: https://ec.europa.eu/reform-support/what-we-do/green-transition_en (accessed on 15 April 2022).
- [3] <https://goldbook.iupac.org/terms/view/>

B00663 (accessed on 20 April 2022).

- [4] M.M. Calabretta, A. Lopreside *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2022, **1200**, 339583.
- [5] E.S. McLamore, E. Alocilja *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, 2021, **178**, 113011.
- [6] T. Nguyen, V.A. Chidambara *et al.*, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2020, **131**, 116004.
- [7] M. Kaljurand, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, 2019, **19**, 5.
- [8] L. Marchiol, *New visions in plant science*, 2018, **9**, 121.
- [9] D. Calabria, M. Mirasoli *et al.*, *Sens. Actuators B Chem.*, 2020, **305**, 127522.
- [10] L. Cevenini, M.M. Calabretta *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 8859.
- [11] V. Scognamiglio, A. Antonacci *et al.*, *J. Hazard. Mater.*, 2019, **373**, 483.
- [12] K. Dayanidhi, P. Vadivel *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, **12**, 1746.
- [13] E. Michelini, M.M. Calabretta *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, 2019, **123**, 269.
- [14] A. Lopreside, L. Montali *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, 2021, **194**, 113569.
- [15] M. Zangheri, F. Di Nardo *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2021, **1163**, 338515.
- [16] A. Priye, S. Wong *et al.*, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 4651.
- [17] Z. Chen, Y. Lin *et al.*, *Sens. Actuators B Chem.*, 2017, **252**, 201.
- [28] L.R. Magnaghi, F. Capone *et al.*, *Foods*, 2020, **9**, 684.
- [19] B. Kuswandi, C. Maryska *et al.*, *Food Measure*, 2013, **7**, 29.
- [20] R. Kamath, *J. Br. Blockchain Assoc.*, 2018, **1**, 47e53.

Optical Biosensors for a Green Transition

The European Green Deal aims to a circular economy model for a climate-neutral Europe by 2050, with the creation of advanced and integrated analysis systems to improve waste management, bioproduct recovery and enhance by-products. Optical biosensors represent a valid tool for promptly identifying risk threats and related impacts on natural and industrial systems.