

Biosensori per il monitoraggio ambientale: le innovazioni introdotte dalle biotecnologie

■ Livia Della Seta, Maria Rita Montereali, Walter Vastarella

I biosensori sono dispositivi integrati, in grado di fornire una risposta analitica quantitativa o semi-quantitativa, costituiti da un **elemento biologico** o *biomimico*, che riconosce il composto di interesse dando luogo ad un fenomeno chimico o chimico fisico e da un **trasduttore**, che permette la trasformazione di questo fenomeno in un segnale analogico o digitale. Possono pertanto essere intrinsecamente definiti come “apparati biotecnologici”. La loro classificazione avviene in base alla biomolecola di riconoscimento (biosensori enzimatici, ad anticorpo, a DNA, a cellula intera o tessuto ecc.) o, in alternativa, in base al trasduttore di segnale utilizzato (biosensori elettrochimici, ottici, piezoelettrici, calorimetrici ecc.) [1]. I biosensori offrono ampie potenzialità in campo analitico grazie, in generale, alla specificità della reazione di riconoscimento biorecettore-substrato, ai tempi di

risposta brevi (30''-2 min) ed alla semplicità e portabilità del sistema che può essere utilizzato in matrice reale o con minimo pre-trattamento. Tutte queste caratteristiche li rendono adatti per misure in continuo e direttamente in campo [2]. I biosensori, che hanno avuto prevalenti applicazioni pratiche in campo medico ed alimentare, si offrono principalmente, in campo ambientale, come sistemi analitici complementari alle tecniche classiche per analisi di *screening* e come sistemi di preallarme (*early warning systems*).

I sistemi elettrochimici, in particolare, utilizzano prevalentemente elettrodi stampati in serie con tecniche serigrafiche, a basso costo e grandi quantità: si prestano pertanto alla realizzazione di dispositivi monouso e sono facilmente adattabili ad usi specifici ed in continuo. Nel campo del monitoraggio ambientale sono stati proposti numerosi biosensori ottici o elettrochimici, basati su enzimi semplici (ad es. ossidasi, idrolasi, transferasi) per la determinazione analitica di sostanze inquinanti (in genere composti organici). In alcuni casi la misura è basata

sull'inibizione di un enzima o di una reazione chimica, provocata da uno o più composti aventi questo specifico effetto tossico [3].

Negli ultimi decenni i risultati ottenuti nel campo della biologia molecolare e dell'ingegneria genetica hanno stimolato la realizzazione di un numero crescente di biosensori basati su una varietà di sistemi biologici sempre più *target-specifici* (enzimi ingegnerizzati, anticorpi monoclonali, proteine, frammenti di DNA, **aptameri**, ma anche batteri, alghe, cellule intere o tessuti cellulari) [4]. Parallelamente, la scoperta di nuovi materiali e l'evolversi di tecniche di fabbricazione basate sull'utilizzo di micro e **nanomateriali** hanno permesso la realizzazione di una nuova classe di biosensori e di sistemi integrati micronizzati in grado di effettuare anche analisi multiparametriche, per applicazioni in campo ambientale, alimentare, farmaceutico e, più in generale, per la sicurezza e la salute dell'uomo e dell'ambiente. Nonostante l'elevata produzione di pubblicazioni scientifiche sui biosensori, il numero di dispositivi

■ Livia Della Seta,
Maria Rita Montereali,
Walter Vastarella

ENEA, Unità Tecnica Caratterizzazione,
Prevenzione e Risanamento Ambientale

commerciali basati su di essi resta ancora limitato e ancora più scarsa la loro diffusione. Il passaggio dalla scala di laboratorio alla produzione di questi dispositivi è spesso rallentato da problemi legati alla stabilità ed alla sintesi dei biorecettori, ai costi e ai tempi di *tayloring* molecolare, alla necessità della presenza di cofattori e ai metodi di immobilizzazione. Queste criticità rendono indispensabile la convergenza fra differenti competenze e tecnologie per ottimizzare i sistemi e migliorare la sensibilità dei metodi.

I limiti di legge oggi richiedono la determinazione, con alta specificità, di concentrazioni sub-nanomolari e quindi l'utilizzo di tecniche analitiche ad elevatissime prestazioni e specificità quali GC/MS ed LC/MS (LC-MS/MS/MS, U-HPLC, time-of-flight (ToF) e Orbitrap-based MS detection). Sulla base di queste considerazioni oggi l'attenzione dei ricercatori è anche, se non soprattutto, concentrata nello studio di biosensori in grado di rivelare classi di inquinanti, piuttosto che il singolo contaminante, sfruttando per la misura analitica gli effetti di tossicità (inibizione enzimatica o effetti genotossici) caratteristici delle differenti classi. Questi sistemi sono ancora più interessanti per l'inserimento nella catena dei test previsti nella metodologia definita "*Effect Directed Analysis*" (EDA) [6], che è oggi ritenuta l'approccio più valido nelle campagne esplorative di monitoraggio ambientale finalizzate all'individuazione degli **emerging**

pollutants. Tale approccio si basa infatti sul frazionamento del campione, sull'uso integrato di test tossicologici a diverso grado di specificità e sulle analisi chimiche; in questo caso, quindi, possono essere utili sistemi bioanalitici in grado di fornire un indice di tossicità specifica o genotossicità/mutagenicità totale [5].

In questa prospettiva, i biosensori a DNA o quelli basati su aptameri mostrano grandi potenzialità. I primi sono stati impiegati per la determinazione di rotture di catena o danni alle basi indotti da specie chimiche tossiche, i secondi possono essere selezionati per legarsi con elevata affinità alla molecola di interesse. Rispetto agli anticorpi, gli aptameri presentano il vantaggio di essere ottenuti impiegando una procedura totalmente *in vitro*: possono essere

manipolati per introdurre modifiche che ne aumentino stabilità, affinità e specificità verso la molecola target e possono essere impiegati anche per il riconoscimento di molecole non immunogeniche. Scienziati di differenti discipline dovranno lavorare in stretta collaborazione per:

- rendere la selezione e replica di aptameri, DNA, RNA più accessibile per costi e tempi;
- migliorare la stabilità e preservare la bioreattività dei biorecettori;
- studiare le proprietà chimico-fisiche e di adesione al fine di rendere più efficaci le tecniche di immobilizzazione e orientamento del biorecettore;
- studiare i limiti tecnologici correlati alla miniaturizzazione e all'automazione del sistema;
- sfruttare le proprietà elettriche e topologiche dei nanomateriali.

Bibliografia

- [1] D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson (2001), "*Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*", *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 121-131, Elsevier.
- [2] A. Rasooly, K. E. Herold Eds. (2008) *Biosensors and Biodection: Methods and Protocols*, Vol. 2, Humana Press, New York.
- [3] M.T. Giardi, E.V. Piliateska Eds, (2006), *Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices*, Landes Bioscience, Austin, TX.
- [4] I. Palchetti, M. Mascini, (2008), *Analyst*, 133, 846-854, RSC, London.
- [5] R. Renneberg, F. Lisdat, (2008) *Biosensing for the 21st Century*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [6] G.M. Hecker, H. Hollert, (2009), "*Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges*", *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 607-613, Springer-Verlag Berlin.