

# COupling Smart Molecules Into Chips<sup>1</sup> μ-Biochips per l'analisi chimica e biologica

IN BREVE

- **PROCESSI E STATO DELLE RICERCHE** - La crescente e motivata richiesta di razionalizzare ed affinare le tecniche di analisi chimica e biologica in tutti i settori produttivi (alimentare, farmaceutico, medico-diagnostico, ambientale) richiede una risposta complessa e multidisciplinare, poiché comporta lo sviluppo continuo di nuove tecnologie e sistemi affidabili in grado di fornire informazioni complementari alle tecniche tradizionali. La possibilità di disporre di metodologie innovative per l'analisi chimica e biologica con dispositivi portatili, rapidi, con adeguata selettività e sensibilità, riveste, ad esempio, grande importanza nei settori agro-alimentare, p.es. la rilevazione di contaminazione batterica negli alimenti causata da *Listeria monocytogenes*, e della sicurezza (biological warfare) per il monitoraggio di agenti contaminanti, p.es. B. antraci, per citare solo gli esempi più eclatanti. Le soluzioni proposte a livello internazionale sono orientate allo sviluppo di sistemi "Lab-on-a-Chip" e di biosensori dedicati. In Italia la collaborazione sinergica e multidisciplinare di centri di ricerca e dipartimenti universitari operanti nei settori della chimica, della scienza dei materiali, della fisica, dell'ingegneria elettronica e della biologia molecolare, risponde a precise esigenze di realtà industriali locali e nazionali nel settore biotecnologico, ambientale, alimentare e biomedicale. A questo proposito i risultati ottenuti nell'ambito di progetti di ricerca italiani e comunitari, hanno già avuto ricadute sulle PMI europee. La tecnologia dei biosensori è disponibile all'ENEA da diversi anni. COupling Smart Molecules Into Chips è un progetto strategico (P878) avviato pionieristicamente all'ENEA nel 2001 che oggi dà i suoi frutti con la realizzazione di dispositivi bioelettronici dimostrativi ed applicazioni in campo ambientale ed alimentare. In questa scheda sono illustrati i processi per ottenere μ-biochips e dispositivi elettrochimici usa e getta per la bioanalitica.
- **APPLICAZIONI E COSTI** - Nella scheda sono indicate le applicazioni bioanalitiche già realizzate e quelle in via di sviluppo che costituiscono solo qualche esempio delle potenzialità dei dispositivi tecnologici disponibili all'ENEA. L'interazione con il mercato, i *final users* e le PMI sarà in grado di suggerire applicazioni al momento non considerate come è stato nel recente passato (industria enologica, casearia, ambiente). Le applicazioni riguardano l'analisi multiparametrica e/o di screening in matrici cliniche, alimentari ed ambientali e i test per la selezione di enzimi ricombinanti nel settore della ricerca medica ed alimentare.
- **POTENZIALI DI SVILUPPO E BARRIERE** - Quelli illustrati nella scheda sono solo alcuni dei possibili esempi di applicazione della tecnologia ed altre applicazioni potrebbero essere possibili. Il μ-biochip appare come uno strumento di lettura immediata, facilmente customizzabile e flessibile a diverse esigenze, semplicemente sostituendo il chip di lettura. Questo è spesso quello che accade nei laboratori e che oggi trova risposta nell'acquisto di molta e differente strumentazione, spesso di costo elevato. Tale circostanza di fatto pone un forte limite alle potenzialità di sviluppo di molti laboratori di analisi e di ricerca. Le barriere per lo sviluppo di applicazioni in questo settore sono costituite dal mercato nel senso che gli oneri finanziari della ricerca devono essere compensati dall'ampiezza della domanda. Le applicazioni devono essere volte alla soluzione di problemi su scala nazionale o internazionale mentre può essere utile ai fini della ricerca un approccio locale sul territorio.

**KEYWORDS** - Sensori e Biosensori (in soluzione), Microsistemi, Materiali e Nanotecnologie, Biotecnologie, Chimica Analitica, BioAnalitica, applicazioni alimentari, agroindustriali, ambientali

<sup>1</sup> <http://www.biosensing.net>

**PROCESSI E STATO DELLE RICERCHE** - I biosensori utilizzano le proprietà funzionali delle molecole biologiche (affinità, specificità, stabilità, diversità, conduzione elettrica, catalisi ecc., in generale "smart properties") accoppiate con quelle offerte dai materiali tecnologici e dalle nanotecnologie. Questo è stato possibile grazie alla coesistenza di finanziamenti per la ricerca di base ed applicata che hanno consentito di studiare tutti gli elementi costitutivi dei dispositivi da sistemi semplici o semplificati per giungere via via a sistemi di complessità crescente fino all'applicazione reale. La tecnologia sviluppata all'ENEA richiede la disponibilità di biomolecole opportune ottenute per estrazione, per sintesi chimica o per ingegneria genetica e delle tecniche per interfacciarle con una circuitria microelettronica (immobilizzazione con mantenimento della attività funzionale e del trasferimento elettronico; 'patterning' con risoluzione micro o nanometrica). La ricerca di base affronta la comprensione dei meccanismi di riconoscimento e di trasduzione del segnale dei sistemi naturali, l'impiego di molecole utili e le tecniche per la loro immobilizzazione orientata o il loro indirizzamento su μ-array di elettrodi. La ricerca applicata trasferisce questi elementi per realizzare biosensori stampati o μ-array litografati di biosensori utilizzando tecnologie di produzione massiva su supporti a basso costo per la determinazione di sostanze, classi di composti o indici di interesse ambientale, agroalimentare, medico o farmaceutico (pesticidi, erbicidi, polifenoli, potere antiossidante, attività anticolinesterasica, inibizione enzimatica). Ricerca di base ed applicata procedono parallelamente costituendo alternativamente l'una lo stimolo e l'altra la verifica di idee, potenzialità e know how. Grazie a finanziamenti di ricerca e formazione<sup>2</sup>, comunitari e nazionali<sup>3</sup>, all'ENEA sono stati individuati e messi a punto

<sup>2</sup> <http://www.biosensing.net/ebla/corso/index.htm>

<sup>3</sup> **PROGETTI FINANZIATI:**

-ROSEPROMILK 2001-04 (RObust Chemical SEnsors and biosensor for raPid on-line identification of fReshly cOLlected MILK) UE/ENEA n° QLK1-CT2001-01617 "Programma quality of life and management of living resources"; R.Pilloton

-FIRB PNR 2004-07 "Development of μ-analytical systems for biomedical applications". NANOTECNOLOGIE, MICROTecnologie, SVILUPPO INTEGRATO DEI MATERIALI - Sviluppo di microsistemi multifunzionali per analisi in diagnostica clinica e nel settore alimentare. Fondo Integrativo Ricerca di base (Firb). R.Pilloton

-FISR 2003-205 "Optical and Electrooptical sensors for rapid control of water body pollutants, R.Pilloton

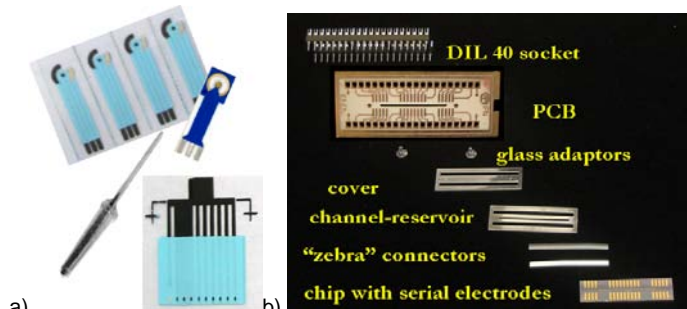
approcci differenti per le analisi in campo, il monitoraggio di processi, la rivelazione multi analitica con configurazioni fluidiche, lay out elettrodi appropriati (a,b) e dispositivi macro (elettrodi serigrafati usa e getta) e micro (μ-bio-chips). La distinzione tra dispositivi macro e micro riguarda certamente la particolare applicazione ma anche il percorso seguito dalla ricerca: certe applicazioni sono prima sperimentate sui sistemi macro singolarmente e successivamente, se è il caso, trasferite e integrate sui micro-array. La tecnologia messa a punto dall'ENEA è inoltre completata da numerosi elementi e studi collaterali<sup>4</sup> che riguardano le celle a flusso (c,d) che ospitano elettrodi o array, il sistema elettronico di controllo ed il software (e,f), con soluzioni circuitali ed informatiche all'avanguardia per la selezione del singolo elettrodo nell'array.

**-BIOSENSORI SU SCALA MACRO:** I dispositivi bio-elettronici su scala macro impiegano la serigrafia per stampare paste o inchiostri nei quali è disperso il materiale attivo e per realizzare strati spessi (decine di micron) planari sovrapposti di conduttori (argento, grafite, grafite drogata con platino, oro, nano tubi di carbonio o altri materiali nanostrutturati), isolanti, materiali funzionali (membrane semipermeabili) organici, inorganici o biologici. Si ottengono singoli biosensori stampati dotati di piste conduttive, elettrodi di lavoro, riferimento ed ausiliario su materiale plastico flessibile che, visto il costo di pochi centesimi, possono essere utilizzati una sola volta (disposable, usa e getta) o più volte (la durata media è di circa un mese considerando la denaturazione del componente biologico). Il costo di un biosensore prodotto con questa tecnologia matura, la serigrafia, è molto contenuto e di conseguenza il prezzo. Questi biosensori singoli, per distinguerli da quelli su scala micro che sono in forma di array, permettono analisi quali-quantitative molto rapide sul campo con procedure *drop-on* e sono adatti alle analisi di *screening*. Ad esempio può essere determinato un'indice di tossicità anticolinesterasica in acqua di falda conducendo campagne di misura in campo su un gran numero di campioni. In questo caso specifico il biosensore funge da EWS (*early warning system*) in grado di segnalare situazioni di pericolo per avviare i controlli analitici più dispendiosi in termini di tempo e danaro (apparecchiature, mano d'opera esperta, uso di solventi) solo su un ridotto numero di campioni.

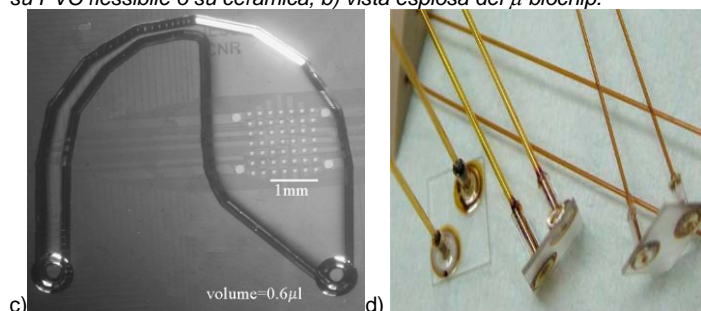
-CALPARK 2002 Corso di formazione su Sensori e Biosensori per studenti del Parco Scientifico e Tecnologico della Calabria (CALPARK), R.Pilloton.

<sup>4</sup>[http://www.biosensing.net/EBLA/COSMIC\\_file/Slides/COSMICfinal\\_file/fuIlIscreen.htm](http://www.biosensing.net/EBLA/COSMIC_file/Slides/COSMICfinal_file/fuIlIscreen.htm)

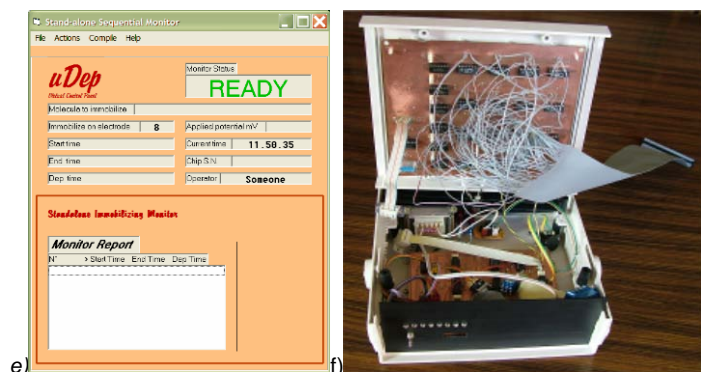
-ARRAY DI BIOSENSORI SU SCALA MICRO<sup>5</sup>: L'ENEA in collaborazione con l'IFN CNR ha sviluppato un dispositivo a  $\mu$ -chip flessibile, versatile e utilizzabile in diversi settori (il monitoraggio ambientale, le filiere agroindustriali, la diagnostica clinica) per la rivelazione di interazioni tra molecole biologiche.. I diversi settori d'impiego del  $\mu$ -chip sono resi possibili da kit e consumabili specifici realizzati a seguito della domanda di aziende interessate. Il componente biologico (enzimi, anticorpi, acidi nucleici) è il componente variabile del  $\mu$ -biochip, responsabile della diversa specificità e del possibile impiego in settori differenti.



a) esempi dei diversi layout dei dispositivi bioelettronici: disponibili all'ENEA: a) trasduttori su scala macro ottenuti per stampa serigrafica di film spessi su PVC flessibile o su ceramica, b) vista esplosa del  $\mu$ -biochip.



c) Esempio di microcella a flusso realizzata in collaborazione con IFN-CNR per ospitare un  $\mu$ -array di 49 elettrodi; d) fast capillary connections per le celle dell'array



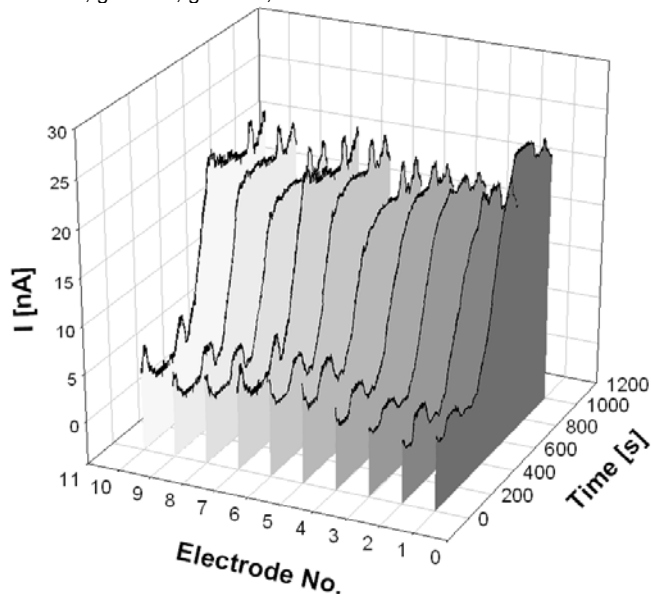
e) una schermata del software di controllo delle deposizioni delle biomolecole; f) l'hardware di controllo

-IMMOBILIZZAZIONE INDIRIZZATA, REVERSIBILE E ORIENTATA DELLE BIOMOLECOLE. L'ENEA ha messo a punto una procedura di immobilizzazione che consente di indirizzare su ciascun elettrodo biomolecole differenti semplicemente applicando un potenziale elettrochimico. Questo ha consentito di realizzare immobilizzazioni reversibili di biomolecole. La reversibilità dell'immobilizzazione è una tecnologia originale del  $\mu$ -biochip CNR-ENEA che consente il rinnovo della superficie elettrodica quando le biomolecole non sono più attive o quando s'intenda modificare il target della determinazione analitica. Inoltre, utilizzando biomolecole ingegnerizzate, l'immobilizzazione può essere orientata in modo da esporre il sito attivo della biomolecola alla soluzione contenente il campione ottenendo una migliore efficienza dello mostrato biologico (h).

#### APPLICAZIONI:

ARRAY ENZIMATICI: Per quanto riguarda gli array di sensori enzimatici è possibile immobilizzare diverse molecole biologiche su ciascun  $\mu$ -elettrodo per creare una finger print analitica del campione in esame. Un  $\mu$ -biochip enzimatico può rivelare diversi analiti contemporaneamente e realizzare analisi ridondanti (g) per ciascun analita in un campione.

Possono essere acquisiti molteplici segnali per ciascun analita. Nel caso del monitoraggio del processo di vinificazione, ad esempio, l'array di sensori può ospitare gli enzimi per la determinazione contemporanea di acido malico, glicerolo, glucosio,

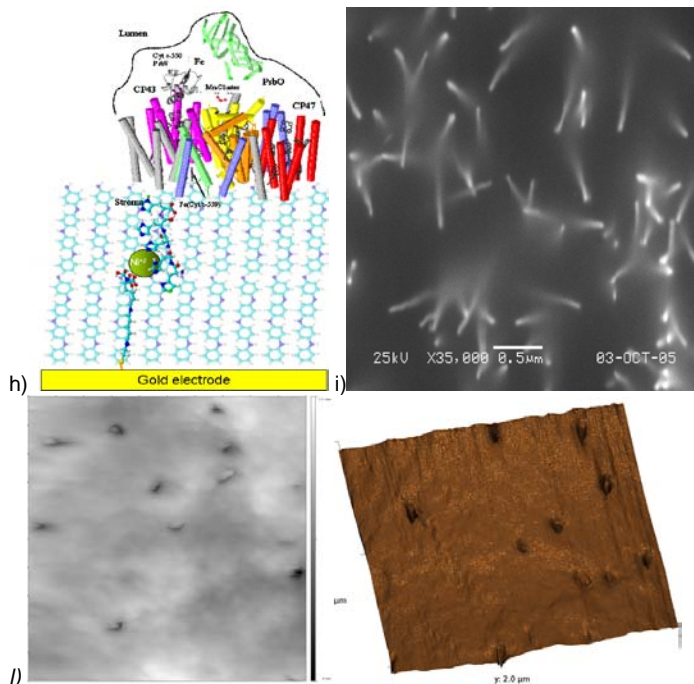


g)

Un esempio di acquisizione dati ridondante. In questo caso per lo stesso analita che scorre nella cella a flusso ( $H_2O_2$ ,  $18 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Sono acquisiti 10 segnali differenti da 10 elettrodi dell'array

Tab.1 Biomediatori già utilizzati all'ENEA per biosensori

Biomediatore	Analita	Applicazione
Cellule batteriche adattate ( <i>Pseudomonas putida</i> )	Polifenoli	Vinificazione, rifiuti industriali
Tirosinasi	"	"
Laccasi	"	"
Fotosistema II (PSII)	Erbicidi	Campioni ambientali
Centri di reazione foto sintetici	"	"
Alcalinofosfasi	"	"
Acetilcolina esterasi	Pesticidi	"
Lieviti ingegnerizzati ( <i>K. Lactis</i> )	"	"
Anticorpi mono, policlonali, scFv	Tossine	Mungitura automatica del latte



Soluzioni nanotecnologiche per incrementare la sensibilità dei biosensori negli array: h) strutture molecolari che consentono l'immobilizzazione di molecole ingegnerizzate [(His)<sub>6</sub>PSII, alcalinofosfasi] in modo reversibile ed orientato in un monolayer di polianilina che agisce da polimero conduttore di elettroni; i) Foto al SEM di gold nano wires del diametro di 30 nm per realizzare nano electrode ensembles (NEE). l) immagini AFM 2D e 3D di NEE

<sup>5</sup> <http://www.biosensing.net/hisdev/mi.htm>

fruttosio, etanolo, acido lattico, polifenoli e potere antiossidante, ciascuno con molteplicità 3 per acquisire un risultato mediato dotato di un deviazione standard come richiesto per un dato analitico quantitativo. Oltre agli enzimi è possibile utilizzare sistemi biologici più complessi come batteri, lieviti, tessuti vegetali o animali (tab.1). Per incrementare la sensibilità sono usati polimeri conduttori e nanoelettrodi (h,i, l)

**-ENZIMI RICOMBINANTI:** Una potenziale applicazione riguarda la possibilità di valutare l'efficienza di enzimi sintetici, ottenuti mediante tecniche di ingegneria genetica, rispetto ad enzimi wild type. Dato che lo strumento rileva fondamentalmente differenze nell'interazione molecolare tra le molecole immobilizzate e quelle circolanti, è possibile ipotizzare di immobilizzare sui diversi elettrodi enzimi ricombinanti diversi oltre all'enzima wild type (riferimento) ed effettuare un'analisi facendo circolare nel  $\mu$ -biochip lo stesso substrato di reazione. In questo modo sarebbe possibile studiare le cinetiche di di enzimi ricombinanti sotto le stesse condizioni sperimentali, senza ricorrere ai saggi biochimici classici che, per piccoli quantitativi di enzima ricombinate, quali quelli prodotti in vettori d'espressione, pongono grandi difficoltà e limitazioni.

**-ACIDI NUCLEICI:** L'applicazione più interessante del  $\mu$ -biochip potrebbe essere quella della repressione delle frodi alimentari consentendo la scoperta di alimenti contenenti derivati di Organismi Geneticamente Modificati (OGM). L'individuazione di OGM si basa sul fatto che nell'OGM viene inserita una sequenza di DNA (gene) di un altro organismo, oltre che sequenze di DNA che hanno il compito di attivare il gene inserito e di facilitare la selezione. Per molti OGM oggi in commercio tali sequenze di DNA sono note. Oggi, la ricerca di OGM in derrate alimentari richiede l'utilizzo di processi analitici (Real Time PCR<sup>6</sup>, Microarrays<sup>7</sup>) da eseguire in laboratori appositamente attrezzati.

**COSTI** - L'apparecchiatura completa basata sul  $\mu$ -biochip messa a punto ha un costo iniziale ridotto (si presume che una versione commerciale costi tra 10 e 20 k€), è facilmente trasportabile, le analisi richiedono tempi molto brevi. Con una piccola spesa è possibile aggiornarlo per nuovi OGM che si affacciano sul mercato. Il chip preparato può essere riutilizzato per diversi esperimenti e può consentire di misurare fino a 32 diversi tipi di OGM contemporaneamente, in un tempo di poche decine di secondi, con una risposta di tipo quantitativo e grande facilità di lettura dei risultati. Infatti, non necessita di un laboratorio appositamente attrezzato e può essere configurato come uno strumento portatile per operazioni sul campo. Inoltre, una volta addestrato, anche personale che non possiede un'apposita conoscenza delle tecniche di biologia molecolare, può ottenere validi risultati. Occorrono piccoli quantitativi di DNA che possono essere estratti da piante, farine o derivati alimentari, anche in condizioni non ideali, quali quelle presenti in un magazzino od un supermercato, mediante piccoli apparecchi, e appositi kit già in commercio. Oggi a causa dei tempi lunghi e del sovraccarico cui sono sottoposti i laboratori certificati, il numero di indagini compiute è piuttosto limitato. Con un laboratorio mobile attrezzato si potrebbero effettuare più controlli (ad esempio su soia Roundup Ready, Mais BT, ecc.) escludendo i campioni negativi, con un notevole risparmio dei costi degli stessi accertamenti. Lo sviluppo di nuove applicazioni richiede costi di ricerca in termini di personale multidisciplinare e consumabili che vanno da 0.1 a 1 M€.

**POTENZIALE DI SVILUPPO E BARRIERE** - Quelli illustrati sono solo alcuni dei possibili esempi di applicazione della tecnologia ed altre applicazioni potrebbero essere possibili. Il  $\mu$ -biochip appare come uno strumento di lettura immediata, facilmente customizzabile e flessibile a diverse esigenze, semplicemente sostituendo il chip di lettura. Questo è spesso quello che accade nei laboratori e che oggi trova risposta nell'acquisto di molta e differente strumentazione, spesso di costo

<sup>6</sup> La Real Time PCR è una tecnica che consente di amplificare un DNA partendo da un pool di RNA estratto da un campione di tessuto. Si tratta di una tecnica che dà risposte quantitative e quindi consente di quantificare l'espressione di un gene, o la presenza di un parassita, nel materiale di estrazione. La RT-PCR è applicabile ad un numero limitato di geni (una dozzina) ed ha tempi di analisi piuttosto lunghi (circa 3 ore). Il costo d'acquisto varia da poche decine di migliaia a poco meno di 100 k€, la customizzazione è facile e si basa sulla conoscenza della sequenza target.

<sup>7</sup> Nei Microarrays di oligonucleotidi, i probe (oligomeri sintetici nel range 25-60 basi depositati a spot e quindi con orientamento casuale) sono progettati per riconoscere parti di sequenze di mRNA conosciute o predette (fino ad alcune decine di migliaia). La detection si basa su una marcatura fluorescente e dà risultati essenzialmente qualitativi, non consentendo di quantificare l'espressione, ma solo di compararla a quella di un riferimento noto. Esistono gene-chips commerciali per i geni e le specie più diffusamente studiati, e per l'analisi è necessario uno scanner di costo decisamente superiore ai 100 k€. La customizzazione non è facile, e se è possibile progettare oligomeri per specifiche sequenze target, il costo dell'apparecchiatura completa per lo spotting e la detection supera attualmente i 300 k€.

elevato. Tale circostanza di fatto pone un forte limite alle potenzialità di sviluppo di molti laboratori di analisi e di ricerca. Le barriere per questa tecnologia sono rappresentate dalle dimensioni e dal numero degli elettrodi nell'array. Infatti l'impiego delle misure amperometriche come metodo di rivelazione se da una parte semplifica il sistema e lo rende economicamente vantaggioso, dall'altra risente della superficie dell'elettrodo che non può essere ulteriormente miniaturizzata in quanto la corrente misurata è direttamente proporzionale alla superficie elettrodica. Proprio per questo motivo sono state individuate applicazioni che non richiedono un gran numero di elettrodi (32, 49, comunque non superiore a 256). Per questo motivo il sistema a  $\mu$ -array non può considerarsi in competizione con strumentazioni più costose per la determinazione del genoma. Ma è anche utile puntualizzare che la strumentazione che abbraccia questa fascia di mercato è estremamente poco conveniente in termini di spese di esercizio in quei laboratori di analisi o di ricerca dove le problematiche sono di norma molto inferiori all'acquisizione di un intero genoma.

**STAFF<sup>8</sup>** - Per la durata di COSMiC (8 anni) si sono alternati 5 senior scientists, 5 scientists, 4 tecnici, 3 postdoc, 5 borsisti internazionali, 6 studenti per un ammontare complessivo di circa 26 anni uomo, cioè 3 anni uomo/anno. Lo staff contempla figure multidisciplinari in chimica, fisica, biochimica, biologia molecolare, ingegneria elettronica ed un apporto di personale atipico pari al 75% del personale.

**LINKS con TECNOLOGIE, PROGETTI E DISCIPLINE** Sensori chimici, Dispositivi ottici ed elettroottici, biologia molecolare, biologia vegetale.

#### PARTNERS

Dr.J.Masojidek, Czech Academy of Sciences, Trebon Czech Rep.;

Dr.Krejci, KreJci Engineering, Czech Republic;

Dr. Jan Maly -University .J.E.Purkyne (CZ)

Dr. Suna Timur Ege University, Bornova-Izmir/TURKEY

Prof.Antje J. Bäumner, Cornell University, Ithaca, NY

Dr. Mihaela Ilie Un.Politehnica of Bucharest, Romania;

Dr.Miwa Sugiura Osaka Prefecture Un (Japan);

Prof. Lo Gorton ,Lund University , Sweden

Dr. Ligia Maria Moretto, Università Ca' Foscari Venezia

Prof.G.Augusti-Tocco Un. Roma "La Sapienza";

Prof.C.Palleschi Un.Roma La Sapienza;

Prof.G.Palleschi Un.Roma Tor Vergata;

Dr. M. Zen ITC-irst Divisione Microsistemi (TN);

Prof..F.Mazzei, Un.Roma; Prof.L.Campanella, Un.Roma;

Dr.Vittorio Foglietti CNR-INF;

Prof.P. Dario MiTech Labs - Scuola Superiore S. Anna (PI);

Prof.G. Marletta Un.Catania;

Dr.G.De Bellis CNR-ITB (MI);

#### PUBBLICAZIONI (ultimi 5 anni)

1. [W.Vastarella, J.Maly, M.Ilie, R.Pilloton; Biosensing Using Nanomaterials, Chap.13 Integration between template-based nanostructured surfaces and biosensors; Ed. Arben Merkoci, Wiley ISBN 976-0-470-18309-0; 378-420; 2009](#)

2. [W.Vastarella; V.Rosa; C.Cremisini; L.Della Seta; M.R. Montereali; R.Pilloton A preliminary study on electrochemical biosensors for the determination of total cholinesterase inhibitors in strawberries; INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY Volume: 87 Issue: 10-11 689-699; 2007](#)

3. [W.Vastarella; L.Della Seta; A.Masci; J.Maly; M.De Leo; L.M. Moretto; R.Pilloton; Biosensors based on gold nanoelectrode ensembles and screen printed electrodes; INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY Volume: 87 Issue: 10-11 701-714; 2007](#)

4. [D.Odaci, S.Timur, N.Pazarlioglu, M.R.Montereali, W.Vastarella, R.Pilloton and A.Telefoncu; Determination of phenolic acids using Trametes versicolor laccase; TALANTA Volume: 71 Issue: 1 312-317; JAN 15 2007](#)

<sup>8</sup> Video: [http://www.biosensing.net/EBLA/labext\\_0001.wmv](http://www.biosensing.net/EBLA/labext_0001.wmv)

5. J.Maly; J.Masojidek; A.Masci; M.Ilie; E.Cianci; V.Foglietti; W.Vastarella; **R.Pilloton**; Direct mediatorless electron transport between the monolayer of photosystem II and poly (mercapto-p-benzoquinone) modified gold electrode-new design of biosensor for herbicide detection; *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS* Volume: 21 Issue: 6 923-932; DEC 15 2005

6. Ü.A.Kirgöz; H.Tural; S.Timur; N.Pazarlioglu; A.Telefoncu; **R.Pilloton**; Laccase biosensors based on mercury thin film electrode; *ARTIFICIAL CELLS BLOOD SUBSTITUTES AND BIOTECHNOLOGY* Volume: 33 Issue: 4 447-456; 2005

7. J.Maly; M.Ilie; V.Foglietti; E.Cianci; A.Minotti; L.Nardi; A.Masci; W.Vastarella; **R.Pilloton**; Continuous flow micro-cell for electrochemical addressing of engineered bio-molecules; *SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL* Volume: 111 Special Issue: Sp. Iss. SI 317-322; NOV 11 2005

8. **R.Pilloton**; Proceedings of the 6th Workshop on Biosensors and BioAnalytical  $\mu$ -Techniques in Environmental and Clinical Analysis, October 8-12, 2004, ENEA, Rome, Italy. Preface: *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY* Volume: 85 Issue: 9-11 585-587; AUG-SEP 2005

9. M.R.Montareali; W.Vastarella; L.Della Seta; **R.Pilloton**; Tyrosinase biosensor based on modified screen printed electrodes: measurements of total phenol content; *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY* Volume: 85 Issue: 9-11 795-806; AUG-SEP 2005

10. J.Maly; J.Krejci; M.Ilie; L.Jakubka; J.Masojidek; K.Sameh; P.Steffan; Z.Stryhal; **R.Pilloton**; Monolayers of photosystem II on gold electrodes with enhanced sensor response - effect of porosity and protein layer arrangement *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY* Volume: 381 Issue: 8 1558-1567; APR 2005

11. F.Mazzei; F.Boirè; S.Montilla; **R.Pilloton**; E.Podestà; C.Boirè; Alkaline phosphatase inhibition based electrochemical sensors for the detection of pesticides; *JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY* Volume: 574 Issue: 1 95-100; DEC 15 2004

12. S.Timur; L. Della Seta, N.Pazarlioglu, **R.Pilloton**; A.Telefoncu; Screen printed graphite biosensors based on bacterial cells; *PROCESS BIOCHEMISTRY* Volume: 39 Issue: 11 1325-1329; JUL 30 2004;

13. J.Maly; A.Masci; J.Masojidek; M.Sugiura; **R.Pilloton**; Monolayers of natural and recombinant photosystem II on gold electrodes - Potentials for use as biosensors for detection of herbicides; *ANALYTICAL LETTERS* Volume: 37 Issue: 8 1645-1656; 2004

14. A. Boni; C. Cremisini; E. Magarò; M. Tosi; W. Vastarella; **R.Pilloton**; Optimized biosensors based on purified enzymes and engineered yeasts: Detection of inhibitors of cholinesterases on grapes; *ANALYTICAL LETTERS* Volume: 37 Issue: 8 1683-1699; 2004

15. J. Maly; C. Di Meo; M. De Francesco; A. Masci; J. Masojidek; M. Sugiura; A. Volpe; **R.Pilloton**; Reversible immobilization of engineered molecules by Ni-NTA chelators; *BIOELECTROCHEMISTRY* Volume: 63 Issue: 1-2 271-275; JUN 2004

16. S.Timur; N.Pazarlioglu, **R.Pilloton** and A.Telefoncu; Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix; *SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL* Volume: 97 Issue: 1 132-136; JAN 1 2004

17) D.Odaci; M.K. Sezginturk; S.Timur; N.Pazarlioglu; **R.Pilloton**; E.Dinkaya; A.Telefoncu.; Pseudomonas putida Based Amperometric Biosensors for 2,4-D Detection; *PREPARATIVE BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY* Volume: 39 Issue: 1 11-19; 2009

## Roberto Pilloton<sup>9</sup>



Laureatosi in chimica nel 1986 (110 e lode) con una tesi sui Biosensori elettrochimici per gli alimenti, si è formato con i massimi esperti italiani e stranieri sin dal 1983 (Prof.Mascini – Un.Firenze, Prof.Palleschi – Un.Roma Tor Vergata, Prof. R.Schmidt – Un.Stoccarda, Prof. Mossbach – Un.Lund - Svezia, Prof.U.Bilitevsky – GBF – Germania, Dr.J.L. Lipskier – Thomson – Francia).

L'immobilizzazione enzimatica, la rivelazione elettrochimica, i sistemi fluidici, le tecnologie di deposizione a film spesso e i materiali polimerici finalizzati alle analisi in campo ambientale, alimentare e biomedico con sensori e biosensori, rappresentano la sua attività scientifica. Nel 1999 ha organizzato il 2° congresso nazionale sui Sensori Chimici e Biosensori<sup>10</sup> con 130 partecipanti da tutte le maggiori università Italiane. Nell'anno accademico 1999-2000 è risultato vincitore di un concorso per Professore a contratto presso l'università di Pavia tenendo un corso dal titolo "I Biosensori in chimica analitica ambientale". Presso l'ENEA, dal 1992, è stato relatore di 17 tesi di laurea, 4 tesi di specializzazione, tutor di 2 borse di studio, 2 assegni di ricerca, 4 borsisti internazionali per un totale di circa 35 anni uomo. Ha tenuto lezioni sui Biosensori a laureandi e specializzandi nelle università di Roma, Torino, Milano. Nel 2002 ha tenuto un corso di alta formazione sui Biosensori per postdocs dell'Università della Calabria. Nell'ottobre 2004, su richiesta della IAEAC (International Association on Environmental Analytical Chemistry) di cui è socio, ha organizzato e presieduto in qualità di chairman il congresso internazionale "The 6th International Workshop on Biosensors and Bioanalytical  $\mu$ -Techniques in Environmental and Analytical Chemistry"<sup>11</sup> con più di 150 partecipanti da tutto il mondo. Nel 2005 ha curato l'edizione di due volumi della rivista "International Journal of Environmental Analytical Chemistry" in qualità di Guest Editor (in corso di pubblicazione, Luglio 2005). E' referee di riviste scientifiche internazionali, ed e' autore di circa 60 lavori e 70 partecipazioni a congresso. Dal 2001 al 2008 è responsabile di un progetto complesso dell'ENEA (finanziato dalla comunità europea, dal MIUR-FIRB e da POR-Lazio), sui Biosensori e la Bioelettronica (aggregato progettuale COSMIC: coupling smart molecules into chips<sup>12</sup>) con numerosi partners accademici e industriali internazionali e competenze multidisciplinari sulla sintesi di materiali organici o inorganici per sensori, la purificazione di materiali biologici, l'ingegneria genetica, la microelettronica, l'elaborazione dei dati e delle immagini, la microfluidica. Dal Luglio 2006 al Giugno 2010 è membro eletto del comitato esecutivo dell'associazione scientifica internazionale (no profit) IAEAC<sup>13</sup>

<sup>9</sup><http://www.biosensing.net/vcard.html>

[http://www.biomedexperts.com/Profile.bme/1118654/Roberto\\_Pilloton](http://www.biomedexperts.com/Profile.bme/1118654/Roberto_Pilloton)

<sup>10</sup><http://www.biosensing.net/EBLA/workshop/autostart.htm>

<sup>11</sup><http://www.biosensing.net/iaeac/workshop.html>

<sup>12</sup>[http://www.biosensing.net/EBLA/cosmic\\_file/papers/COSMICReportIntro.pdf](http://www.biosensing.net/EBLA/cosmic_file/papers/COSMICReportIntro.pdf)

<sup>13</sup>[http://www.iaeac.ch/iaeac\\_pages/executive.html](http://www.iaeac.ch/iaeac_pages/executive.html)