

Ph.D. COURSE IN INDUSTRIAL ENGINEERING – XXX CYCLE

Development and Optimization of Electrochemical Affinity Biosensors for the Control of Food Safety

Student: Francesca Malvano

Tutor: Donatella Albanese

Abstract of the thesis

The guarantee of food safety requires a fast and accurate control for all chemicals and bacteria, which are harmful for human health. In the food industry, the safety of a product is evaluated through periodic chemical and microbiological analysis; these procedures use techniques as chromatography, spectrophotometry, and electrophoresis that are expensive, time consuming, require highly trained personnel and require steps of sample pretreatment, increasing the time of analysis. Therefore, the demand for developing simple, rapid, accurate, low-cost and portable analytical instruments is growing and detection of chemical and microbiological contaminants (mycotoxins, pathogenic microorganisms, pesticides and allergens) that endanger the food safety.

Biosensors, analytical devices composed of a biological recognition element (such as enzyme, antibody, receptor) coupled to a chemical or physical transducer (electrochemical, mass, optical), offer a possible alternative to common approaches, by allowing rapid on site analysis, and providing real-time information during the food production process. Biosensor literature in the field of food safety is focused mainly on affinity biosensors, which are considered as a further subset of biosensors that use an antibody, sequence of DNA or protein interfaced to a signal transducer to measure a binding event; most of them are based on the very high-affinity interaction between antigen and specific antibodies, but novel specific ligands (e.g. aptamers) are emerging.

However, the affinity biosensors described in literature belong to the “labelled affinity biosensors” which require the use of labels (commonly enzymes), linked to the target biomolecule, able to detect the immune-complex thanks to the production of substances easily detected by electrochemical or optical transducer systems. The drawback of immunosensors labelled is due to extra costs and time for labelling step and the impossibility of real time detection

For these reasons, my interest has been focused on the development and optimization of label-free affinity biosensors, based on *Electrochemical Impedance Spectroscopy* (EIS) transduction system, able to detect the immune-complex formation. In fact, recent studies have shown that EIS is particularly well-suited to the detection of binding events on the transducer surface. The application of EIS as a detection analytical technique, based on the direct monitoring of the interaction between the bioreceptor and its target, enables the production of label-free affinity biosensors for food analysis with significant advantages over labelled ones.

Thanks to EIS transduction technique, the detection of analyte of interest, is performed in real – time by studying the change in electrical properties of the electrode surface, which depends only on the binding interaction between the analyte and its receptor.

On the basis of the above considerations, my research project has been focused on the development of high sensitive impedimetric biosensors for the quantitative determination of for the quantitative determination of Ochratoxin A, *Escherichia Coli* O157:H7, Gluten and Pesticides.

In particular, two immunosensors for Ochratoxin A detection has been developed: the first one on gold electrode and the second one on screen-printed carbon electrode. In the first case, the comparison between the two immobilization procedures (oriented and not oriented antibody) underlined the advantages of the oriented immobilization, which showed a more uniform and homogenous antibody layer that favours higher antigen-binding capacity and sensitivity of the immunosensor. The results obtained with AFM analysis were in good agreement with those obtained from impedimetric studies, underlining that in case of oriented antibody a more ordered surface guarantees a higher number of molecules effectively exposed to antigen interaction. The linear range (0.01-5 ng/mL), the very low detection limit (5 pg/mL) and high sensitivity showed the potential of the proposed immunosensor as a highly capable analytical device for a fast OTA measurement in food matrices.

In the second case, a novel label-free impedimetric immunosensor for OTA detection based on EIS with AuNPs - modified SPCE has been developed: the carbon electrode surface has been modified with electrochemical gold deposition, which has demonstrated a very cheap way to obtain gold-like behaving electrodes using a very small quantity of the metal (122 pg per electrode). Capacitance has been chosen as the best parameter that describes the electrical changes of the electrode surface due to the immunoreaction between anti-OTA and OTA at different concentrations. The developed immunosensor, with its very low detection limit (0.25 ng/mL) and high sensitivity, exploits the advantages of cheapness, simplicity, and versatility of the SPCE and its results are suitable for fast OTA measurement in food matrices.

As regard pathogenic bacteria, different anti-E.Coli immobilization procedures were tested, in order to develop a selective label – free impedimetric immunosensor for *Escherichia Coli* O157:H7 detection in food products. The comparison between the immobilization procedures analysed underlined the advantage of the oriented procedure and the use of PAMAM dendrimer, which allow to immobilize an higher number of antibodies, reaching a very high sensitivity, but also the use of activated ferrocene as electron-transferring mediators, which improve the electrical properties of the system, resulting in a better impedimetric response. The lowest limit of detection of 3 cfu/mL was reached in the immunosensor developed on cysteamine/ferrocene-modified electrode, where AFM results confirmed the correct antibody immobilization. Moreover a good agreement between ELISA official methods and this immunosensor was obtained in *E.Coli* cells analyzed in food samples.

With the aim to guarantee food safety for celiac patients, a label-free impedimetric aptasensor for gluten detection, based on the immobilization of aptamer (Gli1) on the gold electrode modified with PAMAM, has been developed. PAMAM has been proven to increase the sensitivity of the aptasensor with a high binding affinity to gliadin, reaching a very low detection limit of 5 ppm. It is worth noting that this aptasensor is the first one based on the immobilization of aptamer on the modified electrode and all the others were based on competitive assays: this condition makes the analysis of gliadin very fast and easier than aptamer competitive assays that required addition of an enzyme labelled aptamer to the food sample and then the enzymatic substrate.

Finally, a very innovative impedimetric enzyme inhibition-based biosensor for carbamate and organophosphate compounds has been developed. The high affinity interaction between pesticides and Acetylcholinesterase active site was monitored by EIS, and the impedimetric changes obtained at different pesticide concentrations allow to go up very fast to the presence of the toxic compounds in different food matrices.

Abstract

La garanzia della sicurezza alimentare richiede un controllo rapido e accurato di sostanze chimiche e batteri patogeni dannosi per la salute umana. Nell'industria alimentare la sicurezza di un prodotto è valutata attraverso analisi chimiche e microbiologiche periodiche; tali procedure utilizzano tecniche quali cromatografia, spettrofotometria, elettroforesi estremamente, che richiedono lunghi tempi di analisi, personale altamente qualificato e complesse fasi di pretrattamento dei campioni. Pertanto, è in crescita la richiesta di strumenti analitici portatili semplici, rapidi, precisi e a basso costo per la rilevazione di contaminanti chimici e microbiologici (micotossine, microrganismi patogeni, pesticidi e allergeni) che mettono in pericolo la sicurezza alimentare.

I biosensori, dispositivi analitici composti da un elemento di riconoscimento biologico (enzima, anticorpo, recettore) accoppiato a un trasduttore chimico o fisico (elettrochimico, massa, ottico), offrono una possibile alternativa agli approcci comuni, consentendo un'analisi rapida in loco e fornendo informazioni in tempo reale durante un qualsiasi processo di produzione alimentare.

La letteratura sui biosensori nel campo della sicurezza alimentare si concentra principalmente sui biosensori ad affinità, considerati un ulteriore sottoinsieme di biosensori, che utilizzano un anticorpo, una sequenza di DNA o una proteina interfacciata a un trasduttore di segnale per misurare un evento di legame; la maggior parte di essi si basa sull'interazione ad altissima affinità tra antigeni e anticorpi specifici, ma stanno emergendo nuovi ligandi specifici (ad esempio aptameri). Tuttavia, i biosensori ad affinità presenti in letteratura appartengono a biosensori di affinità "labeled" che richiedono l'uso di marcatori (comunemente enzimi), legati alla biomolecola, in grado di rilevare l'immunocomplesso grazie alla produzione di sostanze facilmente rilevabili elettrochimicamente o attraverso sistemi di trasduzione ottica. Lo svantaggio degli immunosensori "labeled" è dovuto a costi aggiuntivi e lunghi tempi per la fase di etichettatura, nonché l'impossibilità di rilevamento in tempo reale.

Per tali motivi, l'interesse per il progetto di Dottorato è stato focalizzato sullo sviluppo e l'ottimizzazione di biosensori ad affinità "label-free", basati sulla Spettroscopia di Impedenza Elettrochimica (EIS) quale sistema di trasduzione in grado di rilevare la formazione di immunocomplessi. Infatti, studi recenti hanno dimostrato che l'EIS è particolarmente adatto per il rilevamento di eventi di legame sulla superficie di un trasduttore. L'applicazione della spettroscopia di impedenza come tecnica analitica di rilevamento, basata sul monitoraggio diretto dell'interazione tra il biorecettore e il suo bersaglio, consente la produzione di biosensori ad affinità "label-free", per l'analisi dei prodotti alimentari, con vantaggi significativi rispetto a quelli "labeled".

Grazie alla tecnica di trasduzione impedimetrica, la rilevazione di analiti d'interesse, viene realizzata in tempo reale studiando il cambiamento delle proprietà elettriche della superficie dell'elettrodo, che dipende solo dall'interazione tra l'analita e il suo recettore.

Sulla base delle considerazioni sopra esposte, il mio progetto di ricerca si è concentrato sullo sviluppo di biosensori impedimetrici ad alta sensibilità per la determinazione quantitativa di Ocratossina A, *Escherichia Coli* O157: H7, Glutine e Pesticidi.

In particolare, sono stati sviluppati due immunosensori per la rilevazione dell'Ocratossina A: il primo su elettrodi ad oro e il secondo su elettrodi di grafite. Nel primo caso, il confronto tra le due procedure di immobilizzazione (anticorpo orientato e non orientato) ha sottolineato i vantaggi dell'immobilizzazione orientata, la quale ha mostrato uno strato di anticorpi più uniforme e omogeneo, favorendo una maggiore capacità di legare con l'antigene e aumentando la sensibilità dell'immunosensore. I risultati ottenuti con l'analisi AFM risultano in buon accordo con quelli ottenuti da studi impedimetrici, sottolineando che in caso di anticorpi orientati una superficie più ordinata garantisce un numero maggiore di molecole esposte efficacemente all'interazione con l'antigene. L'intervallo lineare (0.01-5 ng/mL), il limite di rivelabilità molto basso (5pg/mL) e l'alta sensibilità hanno mostrato il potenziale dell'immunosensore proposto come dispositivo analitico altamente capace per una rapida misurazione di Ocratossina A nelle matrici alimentari.

Nel secondo caso è stato sviluppato un immunosensore impedimetrico per il rilevamento di Ocratossina A “*label-free*” su elettrodo stampato a grafite modificato con nanoparticelle di oro: la superficie dell'elettrodo è stata modificata con la deposizione elettrochimica dell'oro, che è risultato essere un modo molto economico per ottenere oro, utilizzando una quantità molto piccola del metallo (122 pg per elettrodo). La capacità è stata scelta come il parametro elettrico migliore per descrivere le variazioni elettriche della superficie in seguito alla immunoreattività tra anti-OTA e OTA a diverse concentrazioni. L'immunosensore sviluppato, con il suo limite di rilevazione molto basso (0.25 ng/mL) e l'elevata sensibilità, sfrutta i vantaggi di economicità, semplicità e versatilità degli elettrodi stampati a grafite e i suoi risultati sono adatti per la misurazione rapida dell'Ocratossina A nelle matrici alimentari.

Per quanto riguarda i batteri patogeni, sono state testate diverse procedure di immobilizzazione dell'anticorpo, al fine di sviluppare un immunosensore selettivo “*label-free*” per il rilevamento di *Escherichia Coli* O157:H7 nei prodotti alimentari. Il confronto tra le tecniche di immobilizzazione analizzate ha sottolineato il vantaggio della procedura orientata e l'uso del dendrimero PAMAM, che consente di immobilizzare un numero più elevato di anticorpi, di raggiungere una sensibilità molto elevata; tuttavia anche l'uso del ferrocene come mediatore di trasferimento di elettroni ha migliorato le proprietà elettriche del sistema, determinando una buona risposta impedimetrica.

Il limite inferiore di rilevamento di 3cfu/mL è stato raggiunto dall'immunosensore sviluppato su elettrodo modificato con cisteamina/ferrocene, per il quale i risultati dell'AFM hanno confermato la corretta immobilizzazione anticorpale. Inoltre un buon accordo tra i metodi ufficiali ELISA e tale immunosensore è stato ottenuto nell'analisi di cellule di *E. Coli* in campioni alimentari.

Con l'obiettivo di garantire la sicurezza alimentare per i pazienti affetti da celiachia, è stato sviluppato un aptasensore impedimetrico “*label-free*” per il rilevamento del glutine, basato sull'immobilizzazione di un aptamero (Gli1) sull'elettrodo ad oro modificato con un dendrimero. È stato dimostrato che tale dendrimero aumenta la sensibilità dell'aptasensore, raggiungendo un limite di rilevamento molto basso di 5ppm. Vale la pena notare che questo aptasensore è il primo basato sull'immobilizzazione di un aptamero sull'elettrodo modificato: gli altri presenti in letteratura sono basati su saggi competitivi; questa condizione rende l'analisi della gliadina molto veloce e più facile rispetto ai test competitivi che richiedono l'aggiunta di un aptamero marcato con enzima e quindi il substrato enzimatico.

Infine, è stato sviluppato un biosensore impedimetrico molto innovativo basato sull'inibizione enzimatica ad opera di carbammati e organofosfati. L'interazione ad alta affinità tra pesticidi e sito attivo dell'acetilcolinesterasi è stata monitorata dall'EIS e le variazioni impedimetriche ottenute con diverse concentrazioni di pesticidi consentono di risalire molto velocemente alla presenza dei composti tossici in diverse matrici alimentari.