



AII.1 - SCHEMA DI RELAZIONE TECNICO-SCIENTIFICA

1. Descrizione delle attività del progetto (principali attività svolte che hanno qualificato il progetto di ricerca, fasi, finalità, obiettivi e risultati finali raggiunti, metodologia di implementazione del Progetto ecc.)

Il progetto è articolato in tre workpackage (WP) :

WP1 : Realizzazione ed ottimizzazione di un sistema di deposizione per electropray ionization (ESD) di enzimi in aria

WP2 : Studio computazionale dell'interazione enzima-solvente ed enzima-supperto

WP3: Sviluppo di un apparato prototipo per la deposizione in vuoto e ultra-alto vuoto di specie selezionate in massa/carica

WP1 : Realizzazione ed ottimizzazione di un sistema di deposizione per electropray ionization (ESD) di enzimi in aria

Responsabile : A. Cartoni (Sapienza Università di Roma). Partecipanti : P. Bolognesi , M.C. Castrovilli , M.A. Parracino (assegnista di ricerca , unità di personale incrementale in servizio dal 1/1/2020 al 26/2/2021 [Milestone 5 e Milestone 8]) e P. Calandra (CNR). Collaborazione con PMI : Biosensor S.r.l.

Collaborazione con OdR esterni alla regione : CNR-IMAA.

Questa attività ha beneficiato di un'attiva collaborazione con le Dr.sse V. Scognamiglio e A. Antonacci dell'Istituto di Cristallografia del CNR (CNR-IC), esperte di biosensoristica e della Sig.ra E. Tempesta dell'Istituto di Geologia Ambientale e Geoingegneria del CNR (CNR-IGAG), tecnico di laboratorio chimico.

In questo WP sono stati posti i fondamenti sperimentali del progetto, con la finalità di:

- definire le condizioni sperimentali per effettuare una deposizione per electropray di enzimi attivi
- ottimizzare le tecniche di analisi chimico-fisica e di caratterizzazione morfologica per valutare l'efficacia della tecnica e la preservata attività del materiale biologico depositato
- valutare l'applicabilità della tecnica ESD "in aria", cioè in condizione di temperatura e pressione ambiente, per la fabbricazione di biosensori.

Il WP si articola in 2 attività:

Attività 1.1. Studio dell'effetto di solventi e additivi utilizzati nella soluzione dell'analita da depositare

Attività 1.2. Misura quantitativa del materiale depositato e analisi morfologica.

Attività 1.1 Studio dell'effetto di solventi e additivi utilizzati nella soluzione dell'analita da depositare.

E' stato costruito il prototipo di un apparato versatile per realizzare una ESD a pressione atmosferica ("in aria") in condizioni controllate (Milestone Mi4). Questo apparato è descritto brevemente nella sezione 4 di questa relazione e più ampiamente nel report (All.1), che costituisce il Deliverable D3 del progetto. Una rappresentazione schematica dell'apparato è riportata in figura 1. L'analita di riferimento per lo sviluppo del sistema di deposizione ESD è stato l'enzima laccasi estratto dal fungo *Trametes versicolor*. Questo enzima è stato scelto per la sua versatilità e uso diffuso sia in applicazioni ambientali che alimentari. L'enzima, attraverso un processo di ossidoriduzione reagisce con molti composti fenolici, inquinanti con un certo impatto sull'ambiente e sulla salute umana. Solventi e additivi (acidi, basi e sali) della soluzione giocano un ruolo fondamentale nell'efficienza del processo ESI, ma possono influenzare anche l'attività enzimatica della biomolecola da depositare. Pertanto i solventi sono stati scelti sulla base della loro capacità di solubilizzare la biomolecola senza inficiarne l'attività e permettere un'efficiente nebulizzazione durante il processo di electropray.

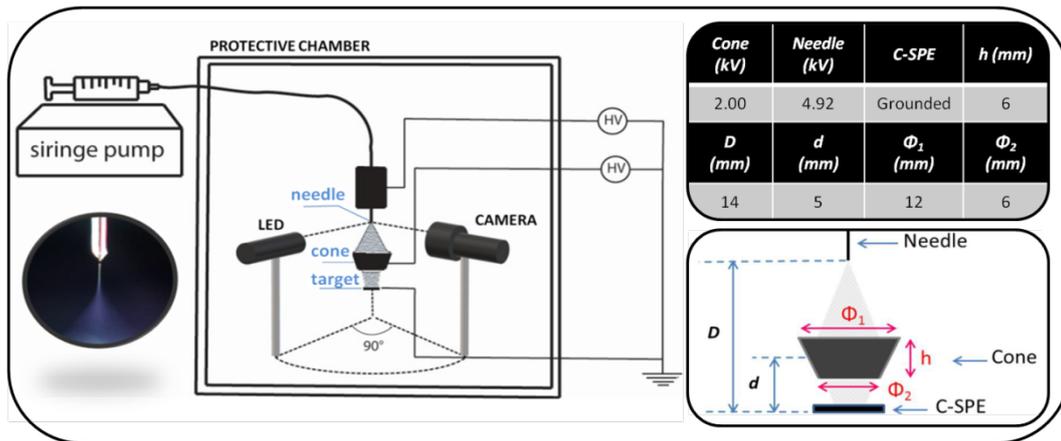


Figura 1: Schema del setup per ESD in aria e immagine del cono di Taylor generato durante la deposizione (pannello di sinistra); tabella delle tensioni e dei parametri geometrici nel processo di deposizione per electrospray e una rappresentazione espansa della regione di deposizione (pannello in basso a destra) con i relativi parametri operativi.

A seguito dei test descritti nel report allegato (All.1) si è osservato che etanolo e metanolo presentano entrambi una buona compatibilità con l'attività enzimatica della laccasi, e considerando la migliore performance del metanolo come agente protonante in soluzioni ESI, è stata individuata come composizione ideale per la soluzione da utilizzare nella deposizione quella con una concentrazione all'80 % di H₂O, 20% di metanolo e una concentrazione di 2 μ g/ μ l di laccasi. Inoltre un pH 4.5 è risultato ottimale per preservare l'attività della laccasi. Sono state anche definite le procedure e le condizioni ottimali per i test spettrofotometrici e amperometrici con siringaldazina per verificare la preservata attività dopo la deposizione.

I risultati di questa attività possono essere così riassunti :

- l'ESD in aria consente di depositare enzimi preservandone l'attività almeno al 75%, un valore competitivo con tutte le altre tecniche attualmente utilizzate per l'immobilizzazione dell'enzima su supporti al fine di realizzare biosensori
- l'ESD può essere utilizzata per depositare l'enzima su elettrodi commerciali usati in sensoristica
- è stata dimostrata una buona riproducibilità della deposizione sia all'interno di uno stesso set che in set diversi di elettrodi, realizzati a partire da diverse soluzioni stock e in giorni diversi
- gli elettrodi realizzati attraverso ESD presentano una buona stabilità nel tempo, sia relativamente alla 'riusabilità' che alla conservazione in condizioni di umidità, temperatura e pressione ambiente .

La performance sensoristica degli elettrodi è stata valutata attraverso misure di amperometria che sono state svolte in collaborazione con la PMI Biosensor S.r.l., di Formello (Roma) a cui è stato assegnato come da progetto un contratto di consulenza.

Attività 1.2. Misura quantitativa del materiale depositato e analisi morfologica.

Per poter standardizzare la procedura per la realizzazione dei biosensori si è dovuto procedere ad una definizione del tempo di deposizione e conseguentemente della quantità di materiale depositato. Nell'ambito di questa attività è stata instaurata una collaborazione con il gruppo del Dr. Andrea Bearzotti, CNR-IIA, che sviluppa microbilance al quarzo "custom" per diverse applicazioni. Dopo alcuni test preliminari per valutare le frequenze dell'oscillatore più adatte per le quantità di materiale depositato per ESD e l'elettronica di acquisizione del segnale della microbilancia, è stato realizzata una QCM composta da due elettrodi d'oro di diametro 6 mm ottenuti per vapour deposition su un disco di quarzo di 14 mm di diametro e con una frequenza di risonanza di 10MHz. La calibrazione della risposta della microbilancia è stata fatta depositando quantità note di laccasi per dropcasting. Si è quindi proceduto alla misura della linearità del rate di deposizione dell'ESD utilizzando le differenti configurazioni del set-up a seconda della dimensione del deposito da ottenere (vd. sezione 4 e Deliverable D3 All.1). Come si evince dalla figura 2, si osserva un'ottima linearità del rate di deposizione in funzione del tempo. Considerando la concentrazione della soluzione dello spray e lo spray rate si deduce che a seconda delle dimensioni del cono di foceggiamento la frazione del materiale depositato varia dal 45 al 21%, con il materiale perso principalmente intercettato e depositato sul cono di foceggiamento. Per valutare questo risultato, e in particolare l'utilità del cono di foceggiamento è stata calcolata la quantità di materiale depositata su una maschera con un foro di dimensione pari al diametro del deposito ottenuto con il cono di foceggiamento in una configurazione del set-up in cui si mantengono fissi la distanza tra ago e superficie di deposizione e tutti gli altri parametri di operazione della sorgente. Questo confronto, illustrato in dettaglio nel report del Deliverable D8 (All.2), ha mostrato che l'uso del cono di foceggiamento produce un guadagno nel materiale depositato rispetto all'uso di una maschera che varia a seconda delle dimensioni del cono da un fattore 3 ad un fattore 5, rendendo quindi l'utilizzo di un cono polarizzato un metodo efficace per il foceggiamento e controllo delle dimensioni del deposito .

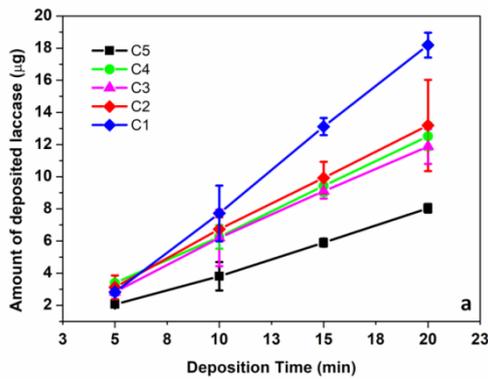


Figura 2: Quantità di laccasi depositata sull'elettrodo della QCM utilizzando diversi elettrodi conici per focalizzare lo spray. I valori di tensione e i parametri geometrici utilizzati per la deposizione sono quelli illustrati nello schema di Figura 1.

I parametri geometrici (in mm) dei coni di foceggiamento sono invece riportati nella tabella sottostante

	h	Φ_1	Φ_2	Φ_{deposit}
C1	6	12	6	4.5
C2	6	13	6	4.5
C3	8	12	5	3.5
C4	6	9	5	3.5
C5	6	12	5	3.5

Nella figura 3 sono mostrate alcune immagini raccolte con il microscopio Olympus IX53 e quello integrato nello strumento Morphologi 4-ID della Malvern Panalytical relative ai depositi di laccasi su elettrodi screen printed della Metrohm DropSens con elettrodo di lavoro in grafite di diametro 4 mm. Il contro-elettrodo è anch'esso di grafite, mentre l'elettrodo di riferimento è in Ag/AgCl. Il confronto delle immagini dell'elettrodo prima della deposizione e dopo la deposizione mostra come attraverso l'uso del cono di foceggiamento si riesce ad ottenere una deposizione ben centrata sull'elettrodo e che, alla scala di ingrandimento utilizzato, la deposizione appare abbastanza uniforme.

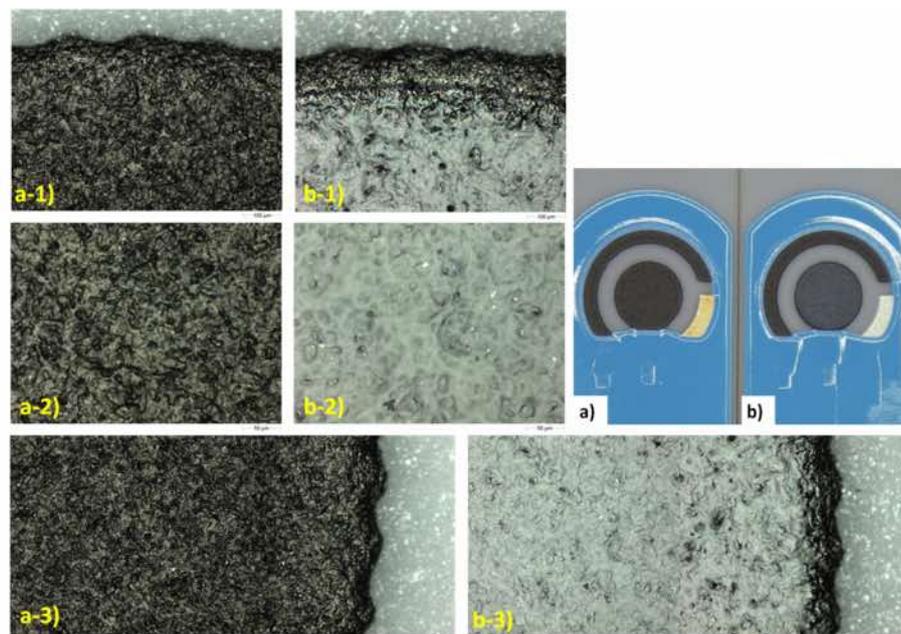


Figura 3 : Le immagini dell'elettrodo screen printed originale (a) e modificato dopo la deposizione (b) mostrano che l'area coperta dall' enzima è ben centrata sull'elettrodo di lavoro. La diversa luminosità dell'elettrodo di riferimento in (b) è dovuta al diverso angolo di illuminazione scelto per evidenziare la variazione sull'elettrodo. Le figure a-1), a-2) e a-3) sono l'ingrandimento della parte superiore, centrale e laterale dell'elettrodo di lavoro originale, mentre le immagini b-1), b-2) e b-3) sono l'ingrandimento della parte superiore, centrale e laterale dell'elettrodo di lavoro modificato con la deposizione di laccasi.

Avendo quindi ottimizzato le condizioni per la deposizione della laccasi, preservandone attività e stabilità, la capacità di realizzare deposizioni quantitative su elettrodi commerciali attraverso la tecnica ESD è stata utilizzata per produrre dei biosensori per la rivelazione di polifenoli utilizzando due tipi di elettrodi, uno con l'elettrodo di lavoro in grafite ed un altro con l'elettrodo di lavoro funzionalizzato con carbon black. Inoltre per provare l'esportabilità della tecnica su altri sistemi in collaborazione con la PMI Biosensor srl sono stati realizzati dei biosensori basati sulla deposizione per elettrospray di lattato ossidasi per la rivelazione del lattato in fluidi biologici. Allo scopo, la deposizione è stata realizzata anche su sensori wearable. La deposizione del lattato ossidasi ha sostituito la deposizione dell'enzima tirosinasi indicata inizialmente nel progetto, in quanto la produzione di sensori per rivelare il lattato durante l'esercizio fisico è una priorità per la PMI partner.

I risultati con le performance dei sensori sono illustrate brevemente nella sezione 2 di questa relazione ed in modo più dettagliato nei report (All. 2 e 3) che costituiscono i Deliverable D8 e D10, e una pubblicazione.

WP2 : Studio computazionale dell'interazione enzima-solvente ed enzima-supporto.

Responsabile : S. Borocci (Università della Toscana). Partecipanti : A. Casavola (CNR-ISM) e A. Cartoni (Sapienza Università di Roma)

Le finalità di questo WP sono

- mettere a punto una metodologia teorica computazionale predittiva per lo studio dell' interazione enzima-solvente
- indirizzare la scelta delle coppie enzima/supporto più promettenti con particolare attenzione ai materiali valutati idonei per lo sviluppo di biosensori.

Il WP si articola in 3 attività:

Attività 2.1 Scelta e sviluppo delle metodologie computazionali

Attività 2.2 Studio dell' interazione enzima-solvente e confronto della struttura molecolare dell'enzima in fase liquida e gassosa

Attività 2.3 Studio dell' interfaccia enzima/supporto nei sistemi di interesse del progetto.

Attività 2.1 Scelta e sviluppo delle metodologie computazionali

Il lavoro preliminare di questa attività è consistito nell'installazione della Workstation HP Z6 con 1 CPU da 96 GB (3x32GB) e GPU NVIDIA Quadro P5000 16 GB acquisita nell'ambito del progetto e installata presso il Dipartimento per l'Innovazione dei sistemi biologici, agroalimentari e forestali dell'Università della Toscana, Viterbo.

Sono state realizzate le seguenti attività:

- installazione e configurazione del sistema operativo Ubuntu 16.0.4
- installazione del software Open MPI da parallelizzare
- installazione del driver Nvidia per la scheda grafica Quadro P5000
- scrittura di script per utilizzare il software GROMACS
- installazione e configurazione di GROMACS (versione 5.1.5 e 2016.6) e VMD (v 1.9.3).

A seguito della continua crescita della potenza di calcolo dei supercomputer, lo sviluppo di modelli molecolari e le simulazioni stanno giocando un ruolo sempre più prezioso sia per fornire risultati in condizioni ideali o estreme inaccessibili in esperimenti reali sia per guidare la sperimentazione evitando dispendiosi processi di trial/error. Il settore della dinamica molecolare (DM) ha molto beneficiato di questi sviluppi utilizzando descrizioni semiclassiche dei "campi di forza (force field)" che determinano la struttura ed evoluzione di sistemi molecolari.

GROMOS è un "force field" ampiamente utilizzato per simulare sistemi biomolecolari per un lungo periodo di tempo. Esso si basa principalmente sulla riproduzione delle energie libere di idratazione e solvatazione non polare per una gamma di composti tra cui aminoacidi e piccoli peptidi. La versione più recente, gromos54a7, è ottimizzata utilizzando cariche parziali e procedure di fit per riprodurre le proprietà termodinamiche dei liquidi puri di una gamma di piccole molecole polari e le energie libere di aminoacidi in acqua. Per questo GROMOS è stato scelto come strumento computazionale per questo progetto. Le caratteristiche del force field sono descritte nel report (Deliverable D6) allegato (All.4) a questa relazione.

Attività 2.2 Studio dell' interazione enzima-solvente e confronto della struttura molecolare dell'enzima in fase liquida e gassosa

La metodologia computazionale individuata nell'Attività 2.1 è stata applicata allo studio della struttura, stabilità e flessibilità del citocromo C (CytC), in soluzione acquosa di metanolo. Il CytC è costituito da 104 aminoacidi e un gruppo eme responsabile della sua attività catalitica. La scelta di questo sistema è dovuta alla sua dimensione che facilita la scelta dei parametri ottimali per condurre le simulazioni di DM. Per eseguire la simulazione di dinamica molecolare, per prima cosa è stata selezionata la struttura della proteina dal Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>) e quindi definita la topologia per la simulazione, in cui la proteina è inserita in un box virtuale di acqua o di una soluzione acqua/metanolo al 20%. La dinamica dell'evoluzione del citocromo C sia in acqua che nella soluzione acqua/metanolo è stata seguita per circa 300 ns dopo un periodo di equilibratura di 200 ns. Questo ha permesso di studiare gli effetti del solvente sulla struttura della proteina, valutando il raggio di girazione, la struttura secondaria e i legami proteina-H e solvente-proteina.

Uno studio analogo è stato svolto anche sull'enzima laccasi, una proteina che con i suoi 499 residui è decisamente più grande del citocromo C ed impegnativa dal punto di vista della simulazione. Questo enzima contiene quattro ioni Cu in tre siti differenti (il sito T1 con uno ione coordinato all'aminoacido cisteina, un secondo ione nel sito T2 responsabile della risposta paramagnetica dell'enzima ed una coppia di ioni nel sito T3). Nel sito T1 si estraggono gli elettroni dal composto da analizzare che vengono trasferiti verso i siti T2/T3 dove avviene la riduzione dell'ossigeno molecolare. Come nel caso del citocromo C la proteina è stata inserita in un box virtuale di acqua o di una soluzione

acqua/metanolo e sono state considerate fino a circa 20000 molecole d'acqua in ciascuna simulazione. I risultati indicano che la proteina assume una struttura meno compatta nel caso di una soluzione acquosa, mentre pur mantenendo una struttura compatta impiega più tempo a termalizzare nel caso di soluzione acqua/metanolo.

La simulazione in fase gas che riproduca le condizioni sperimentali di spray con l'ESI è stata particolarmente impegnativa, in quanto la mancanza di condizioni al contorno determina tempi di simulazioni che scalano con N^2 , dove N è il numero di atomi nel sistema in studio. Questo problema è parzialmente mitigato dall'uso dell'acceleratore GPU presente nel server. Utilizzando opportuni artifici numerici, come spezzare le simulazioni in intervalli di 250ps per rimuovere i portatori di carica che hanno lasciato la 'goccia' in ogni segmento, è stato possibile studiare il processo di evaporazione del solvente. Il risultato più saliente è che dopo circa 400 ns alcune molecole di acqua permangono all'interno della proteina.

Anche per questa simulazione è stata analizzata la variazione della struttura secondaria della laccasi, perché questo è il parametro chiave che determina l'attività dell'enzima. I risultati ottenuti al variare dei solventi, illustrati nel report Deliverable D11 (all.5), indicano che la composizione del solvente non altera la struttura secondaria (figura 4a). Questo è un risultato molto importante per quanto riguarda l'utilizzo dell'ESI per l'immobilizzazione dell'enzima e la realizzazione di un biosensore. Infatti questo risultato indica che dal punto di vista sperimentale si può scegliere il solvente più adatto a produrre una buona nebulizzazione senza alterare l'attività dell'enzima stesso.

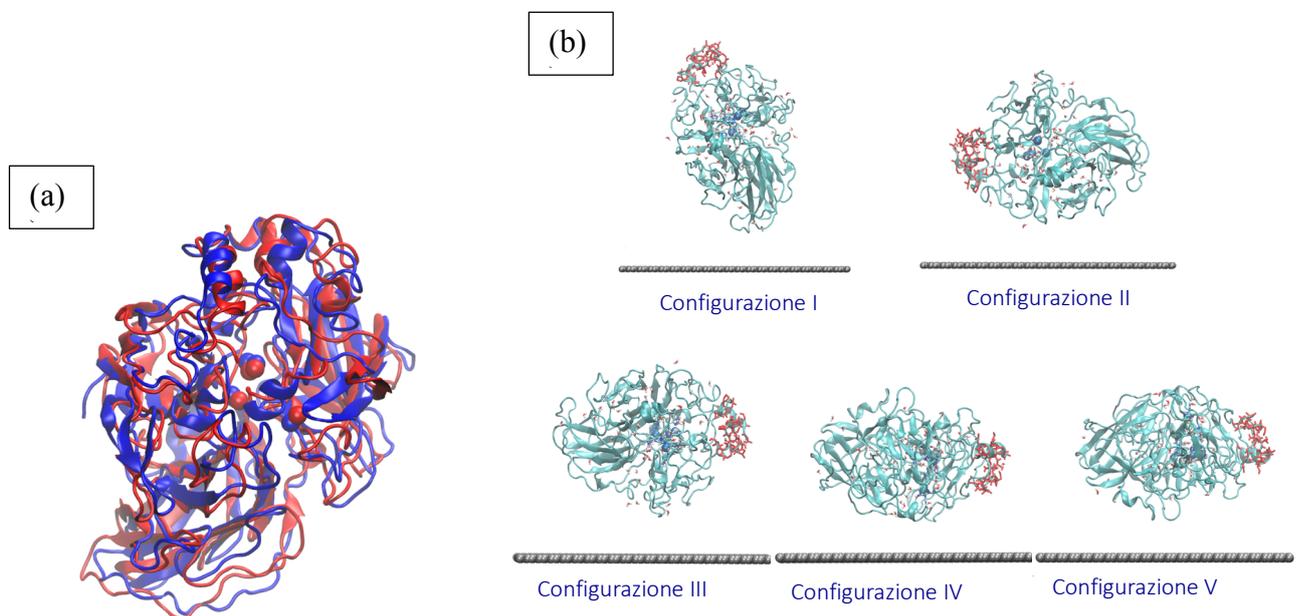


Figura 4 : (a) Struttura della laccasi in soluzione di sola H₂O (struttura rossa) e CH₃OH/H₂O (struttura blu) dopo 400 ns di simulazione di dinamica molecolare; (b) Configurazioni della laccasi utilizzate nelle simulazioni dell'interazione con la superficie di grafene.

Attività 2.3 Studio dell' interfaccia enzima/supporto nei sistemi di interesse del progetto.

Come attività propedeutica a questo studio è stato analizzato l'effetto del campo elettrico che si stabilisce tra l'ago, che genera la nebulizzazione, e il controlettrodo, cioè la superficie su cui verrà depositata la molecola, sull'orientamento della singola molecola nello spray. Come prevedibile, le simulazioni hanno mostrato come il campo elettrico tende ad orientare il momento di dipolo della molecola lungo la sua direzione.

Per simulare l'interazione con la superficie è stata considerato un monolayer di grafene con 2940 atomi di carbonio interagente con un sistema formato da una molecola di laccasi, 63 molecole d'acqua e 11 molecole di metanolo. Cinque diverse configurazioni del sistema rispetto alla superficie sono state considerate (figura 4b). I risultati, illustrati nel report Deliverable D11 (all.5), indicano che la regione della laccasi che interagisce con il supporto subisce una notevole variazione della struttura secondaria. Inoltre, nelle configurazioni in cui il centro T1 è molto vicino alla superficie l'accesso del composto da analizzare alla tasca catalitica potrebbe essere precluso. Questo chiaramente induce una diminuzione dell'attività dell'enzima.

WP3: Apparato prototipo per la deposizione in vuoto e ultra-alto vuoto di specie selezionate in massa/carica.

Responsabile : P. Bolognesi. Partecipanti: L. Avaldi, P. Calandra, A. Cartoni, L. Carlini (unità di personale TD incrementale in servizio dal 2/5/2019 al 2/10/2020 [Milestone 2 e Milestone 6]), J. Chiarinelli (Dottorando Dip. Scienze Università Roma Tre in cotutela con CNR-ISM). Collaborazione con PMI : Ionvac Process S.r.l. Collaborazione con Odr esterni regione : CNRS-CIMAP (France)

Questa attività ha beneficiato del contributo del Sig. A. Morabito (CNR-ISM), tecnico elettronico, per lo sviluppo degli alimentatori per i vari elementi del sistema di trasporto ionico.

Nella ESD a pressione atmosferica la deposizione avviene in un ambiente in cui il fascio ionico può inglobare e trasportare pulviscolo, impurezze e molecole del solvente. Questi elementi inquinanti possono influenzare la funzionalità e l'efficienza del biosensore. L'obiettivo del WP3 è la realizzazione e caratterizzazione di un set-up in cui ESD avviene in condizioni di alto o ultra-alto vuoto. Il WP3 beneficia dei risultati relativi alla preparazione delle soluzioni e alle tecniche di caratterizzazione del WP1.

Questo WP si articola in 3 attività :

Attività 3.1. Costruzione di un set-up modulare per ESD in alto e ultra-alto vuoto.

Attività 3.2. Progettazione e realizzazione di una camera di deposizione in alto e ultra-alto vuoto

Attività 3.3. Deposizione di enzimi in condizioni di alto vuoto e di proteine selezionate in massa/carica in ultra-alto vuoto.

Attività 3.1. Costruzione di un set-up modulare per ESD in alto e ultra-alto vuoto.

Per realizzare un set-up di ESD in vuoto bisogna accoppiare la sorgente ESI con un sistema di immissione del fascio in vuoto e il suo trasporto verso la camera di deposizione. L'apparato costruito al CNR-ISM consiste in una sorgente ESI non commerciale accoppiata ad una camera da vuoto in cui un capillare riscaldabile, con il ruolo di controlettrodo, trasporta il fascio ionico in vuoto. Uno skimmer, lenti elettrostatiche e una guida ionica ottupolare garantiscono un primo stadio di pompaggio differenziale fino ad un vuoto dell'ordine $10^{-5}/10^{-6}$ mbar. Il set-up quindi contiene uno stadio di selezione in massa/carica della specie ionica attraverso un quadrupolo ed un sistema di lenti elettrostatiche per variare l'energia cinetica degli ioni nella deposizione (tecnica di 'soft-landing'). Le varie componenti meccaniche del sistema fino al deflettore elettrostatico a valle del quadrupolo sono state realizzate in collaborazione con CNRS-CIMAP (France). La consegna ritardata di alcuni componenti da parte dei fornitori ha fatto sì che l'insieme di tutte le parti meccaniche da assemblare fosse disponibile solo alla fine di Dicembre 2018. La prima parte in vuoto è stata completamente caratterizzata combinando simulazioni con il software di ottica

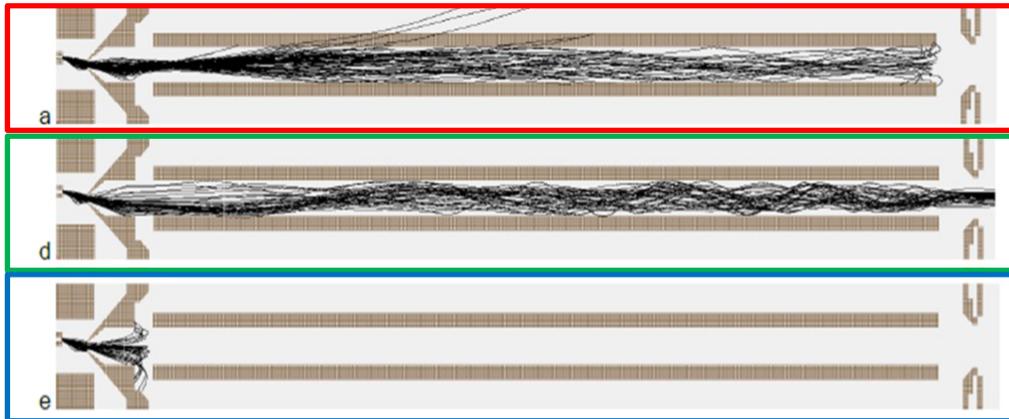


Figura 5 : Simulazione del trasporto del fascio ionico dal capillare riscaldabile all'uscita della guida ottupolare in varie modalità operative dello strumento. La situazione ideale di trasporto si realizza nelle condizioni del pannello centrale. Nel pannello superiore l'ottupolo si comporta come una trappola ionica lineare mentre nel pannello inferiore il fascio non riesce neppure ad entrare nella guida ottupolare.

elettrostatica SIMION 8.0 (<https://simion.com>) e misure sperimentali. Un esempio è mostrato in figura 5 dove sono riportate le simulazioni del moto del fascio di ioni dal capillare riscaldato all'uscita della guida ottupolare per varie condizioni di operazione degli elementi in questa sezione dell'apparato. L'intensità del fascio predetta dalla simulazione (figura 6) è in buon accordo con la misura realizzata ponendo un rivelatore di ioni dopo l'ottupolo.

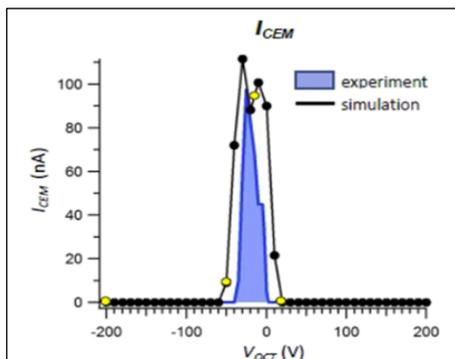


Figura 6 : Confronto tra la corrente del fascio ionico misurato all'uscita della guida ottupolare e risultato della simulazione con il software SIMION 8.0.

I risultati della simulazione di questa sezione dell'apparato sono oggetto di un report, Deliverable D1, allegato a questa relazione (All. 6), e hanno dato origine ad una pubblicazione su Review of Scientific Instruments (Chiarinelli et al. *Rev. Sci. Inst.* **91**, 2020, 073203).

Dopo aver caratterizzato la prima sezione, il set-up è stato completato con la parte contenente l'elemento quadrupolare per la selezione in massa-su-carica, m/z , (spettrometro commerciale Extrel QMS 4000, 19 mm, alimentato da radiofrequenza a 440 kHz), il cubo deflettore (Extrel 3" quad deflector) che ha il ruolo di guidare il fascio selezionato in m/z o verso la camera di deposizione (Attività 3.2) o verso un sistema di diagnostica consistente in un rivelatore di ioni.

Tutto il sistema è controllato da un software realizzato in linguaggio LabView (National Instruments), sviluppato in collaborazione con il sig. A Ranieri (CNR-IC) che permette di indirizzare tutti gli elementi di ottica elettrostatica dell'apparato, assegnare le tensioni e la radiofrequenza opportuna al quadrupolo, operare la scansione m/z e raccogliere il segnale dal rivelatore mostrando i risultati dell'acquisizione in real-time. Questo software permette anche di ottimizzare e monitorare il trasporto del fascio ionico durante l'esperimento attraverso una misura di corrente, in alcuni punti prefissati dell'apparato.

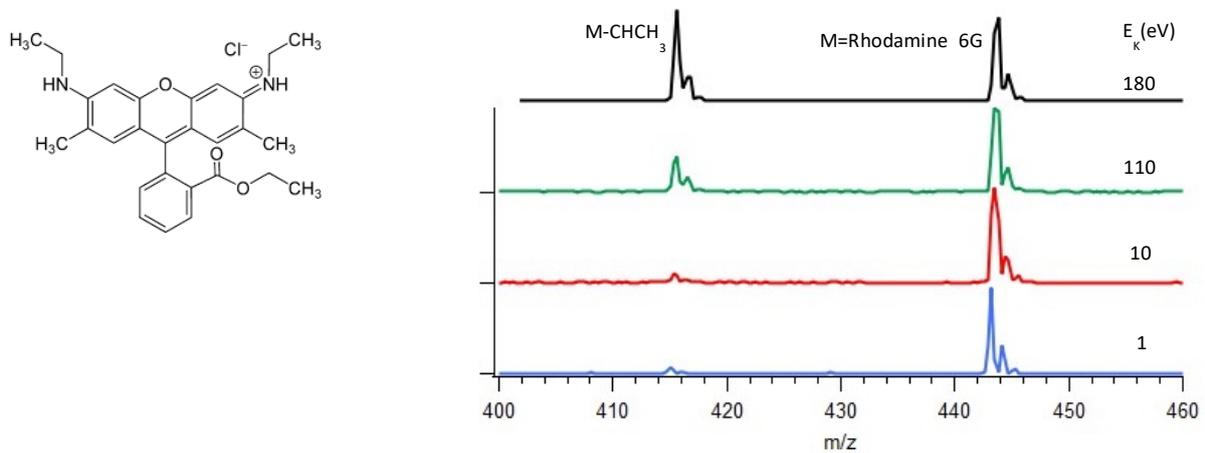


Figura 7 : Spettri di massa della Rodamina 6G, la cui struttura è mostrata nel pannello laterale, ottenuti utilizzando il filtro quadrupolare e variando l'energia cinetica, E_k , degli ioni nella regione tra il capillare e la guida ottupolare.

Per caratterizzare la seconda parte dell'apparato è stata utilizzata una soluzione in acqua:etanolo (1:1) di Rodamina 6G ($C_{28}H_{31}N_2O_3$), un colorante di massa $m = 443,23$ Da, il cui spettro di massa è noto in letteratura. Dalla letteratura inoltre si evince anche che nel processo ESI raramente questo composto subisce protonazione multipla, per cui l'assegnazione delle strutture nello spettro di massa è diretta. La trasmissione in termini di intensità e risoluzione in m/z del sistema è stata caratterizzata verificando che la molecola ed i suoi frammenti sono trasmessi fino al rivelatore di ioni variando le condizioni di operazione del sistema (alta tensione sull'ago, distanza ago-capillare, temperatura del capillare, energia cinetica degli ioni all'ingresso dell'ottupolo). I risultati di questi test sono oggetto del report, Deliverable D4 del progetto, allegato a questa relazione (All. 7). I risultati sono molto soddisfacenti e, come si può vedere chiaramente nella figura 7, lo strumento trasmette lo ione molecolare con buona efficienza (tempo di misura 3 minuti) e risoluzione.

Allo scopo di caratterizzare ulteriori sistemi di interesse per la produzione in fascio con la tecnica ESI, nell'estate 2020 sono state svolte misure di spettrometria di massa presso la sorgente di radiazione di sincrotrone Elettra su dipeptidi in cui almeno uno dei due aminoacidi contiene un sistema aromatico. I tre sistemi studiati (glicina-fenilalanina, triptofano-triptofano e triptofano-tirosina) hanno mostrato nella loro configurazione ciclica una buona stabilità ed uno spettro di massa con strutture caratteristiche ben definite, che li rendono buoni candidati per la produzione in fascio.

Attività 3.2. Progettazione e realizzazione di una camera di deposizione in alto e ultra-alto vuoto

L'altro elemento chiave del prototipo è la camera di deposizione degli ioni selezionati in m/z in ultra alto vuoto. La progettazione di questa camera nonché delle strumentazioni di diagnostica è stata svolta in collaborazione con la PMI Ionvac Process, S.r.l. Pomezia (Roma), partner del progetto. La camera di deposizione è formata da due parti: una dedicata all'inserimento/estrazione dei campioni (camera di load/lock) e una dove avverrà la deposizione vera e propria. Le due parti sono separate da una valvola per non perturbare la qualità del vuoto nella camera di deposizione durante la fase di inserimento/estrazione del campione. A causa della consegna ritardata degli elementi dell'apparato fino al deflettore il progetto definitivo del prototipo del sistema di deposizioni (Deliverable D2, All.8) è stata realizzato solo in Novembre 2019, come illustrato nella sezione 4 della relazione. La camera di deposizione contiene un portacampioni per ospitare i diversi tipi di target di deposizione o direttamente gli elettrodi usati nella fabbricazione di sensori (per esempio Screen Printed Electrode) e i sistemi di diagnostica del fascio montati su un manipolatore. Questi sistemi consisteranno in un rivelatore di ioni per l'ottimizzazione dell'intensità del fascio ionico e per caratterizzarne

l'energia cinetica e una microbilancia al quarzo per la valutazione quantitativa del rate di deposizione. La realizzazione del prototipo è stata assegnata alla PMI Ionvac Process S.r.l., partner del progetto (Milestone Mi7). A causa del periodo di lock-down imposto dalla pandemia la realizzazione della camera di deposizione ha subito un forte ritardo, come illustrato in dettaglio nella sezione 4 della relazione. La realizzazione del sistema di deposizione è stata completata da Ionvac Process solo in Febbraio 2021 (figura 8a) e il suo accoppiamento con l'apparato nei laboratori di CNR-ISM (figura 8b) è stato realizzato solo alle fine dello stesso mese.



Figura 8: (a) Il sistema completo con camera di deposizione e camera di load/lock presso Ionvac Process S.r.l. (b) Vista di insieme del sistema completo dalla sorgente ESI alla camera di deposizione assemblato presso i laboratori del CNR-ISM a Montelibretti.

Attualmente l'intero sistema è in funzione con valori di vuoto compatibili con il resto del prototipo ed è stato fatto il commissioning del sistema di inserimento dei campioni con aggancio/sgancio sul porta campioni.

Attività 3.3. Deposizione di enzimi in condizioni di alto vuoto e di proteine selezionate in massa/carica in ultra-alto vuoto.

Anche per quest'attività è stato usato per i test di deposizione l'enzima laccasi sfruttando le condizioni di nebulizzazione (solventi/tensioni) della sorgente ESI identificati nel WP1 e gli stessi supporti.

La descrizione accurata dell'attività svolta per caratterizzare e quantificare la deposizione in vuoto (Milestone Mi9) è raccolta nel report, Deliverable D9, allegato a questa relazione (All.9). I primi test sono stati fatti realizzando un opportuno set-up collegato direttamente alla camera del capillare (vedi figura 17 con lo schema completo del prototipo) dove il livello di vuoto è circa 1mb. Questo set-up può alloggiare alternativamente una microbilancia al quarzo, QCM, per misurare il rate di deposizione o un portacampioni equipaggiato con una maschera per permettere l'installazione di un elettrodo commerciale screen printed su cui realizzare la deposizione (figura 9).

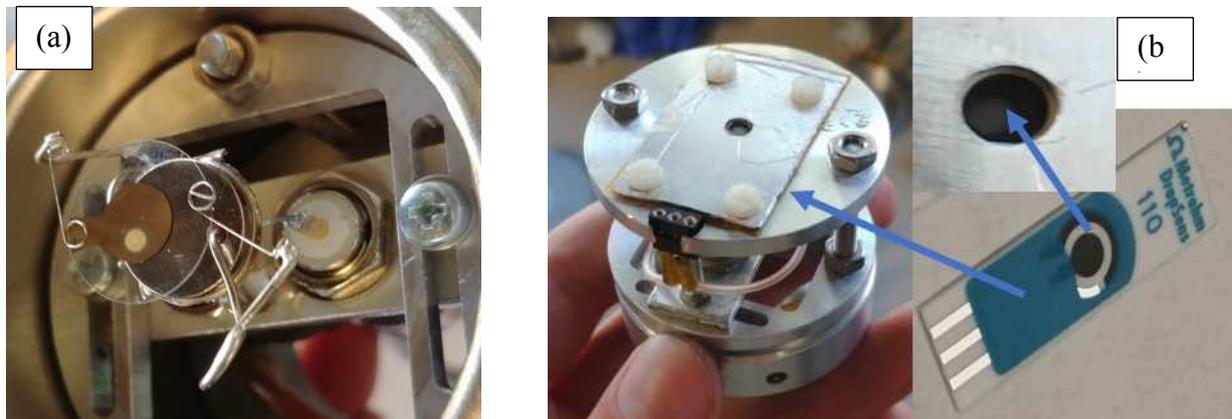


Figura 9 : (a) Set-up per l'alloggiamento della microbilancia al quarzo per le misure di rate di deposizione in vuoto. (b) Set-up per l'alloggiamento di elettrodi commerciali in vuoto per la deposizione dell'enzima laccasi.

Usando la QCM si possono realizzare due diversi tipi di misura per quantificare il rate di deposizione. Nel primo tipo si misura la variazione di frequenza (e quindi la massa depositata) in funzione del tempo, mentre nella seconda si misura la variazione di frequenza in funzione della corrente letta sull'elettrodo della bilancia (e quindi la carica depositata). Quest'ultimo metodo ha il vantaggio di tenere in conto eventuali instabilità della sorgente durante la deposizione, ma implica l'assunzione che la corrente misurata sia dovuta solo agli ioni dell'enzima che incidono sulla bilancia. Entrambi i metodi sono stati utilizzati per stimare il rate di deposizione nelle condizioni sperimentali indicate in Tabella 1 e al variare della tensione applicata all'ago per formare lo spray.

Soluzione spray	Concentrazione laccasi	Flusso soluzione	Distanza ago-capillare	Tensione capillare	Tensione tube-lens
H ₂ O:MetOH 80%:20%	2 µg/µL	1 µL/min	4 mm	200 V	180 V

Tabella 1: Condizioni di lavoro utilizzate nelle misure svolte per determinare il rate di deposizione in vuoto.

L'analisi dei risultati indica che le misure fatte monitorando la corrente sono più affidabili, sebbene affette dall'approssimazione menzionata precedentemente, e che il rate di deposizione in vuoto per correnti del fascio ionico di qualche nA sono inferiori ai 10 μ g/ora. Considerando il flusso della soluzione si determina che solo circa il 5% della soluzione è trasmessa dal capillare.

In queste condizioni di lavoro è stato prodotto un set di sensori depositando l'enzima laccasi su elettrodi commerciali della Metrohm DropSense con elettrodi in grafite. Le misure elettrochimiche sugli elettrodi su cui è stata depositata una quantità pari a circa 28 μ g di enzima danno una risposta elettrica di circa 250nA con una soluzione 50 μ M di catecolo. Questo valore è comparabile con quello ottenuto nel caso di deposizioni in aria. Misure ripetute dopo alcuni lavaggi dell'elettrodo riportano una risposta costante entro il 5% , indicando una buona adesione dell'enzima sull'elettrodo. Test di stabilità del sensore nel tempo hanno indicato che la sua risposta decade fino al 20% di quella iniziale dopo una settimana.

Per valutare le proprietà morfologiche della deposizione in vuoto, sono state realizzate deposizioni su vetrini conduttivi F-TiO₂ (Fluorine doped tin oxide). Questi depositi sono stati confrontati con analoghi depositi sullo stesso materiale, ma realizzati in aria. L'analisi è stata compiuta con il microscopio ottico integrato nello strumento Morphologi 4-ID della Malvern Panalytical. Le immagini in figura 10(a-d) mostrano come all'aumentare del tempo di deposizione il diametro del deposito cresce, mostrando un strato compatto al centro, e uno strato a densità decrescente andando dal centro al bordo. Il bordo del deposito non risulta ben definito. Nella stessa figura sono

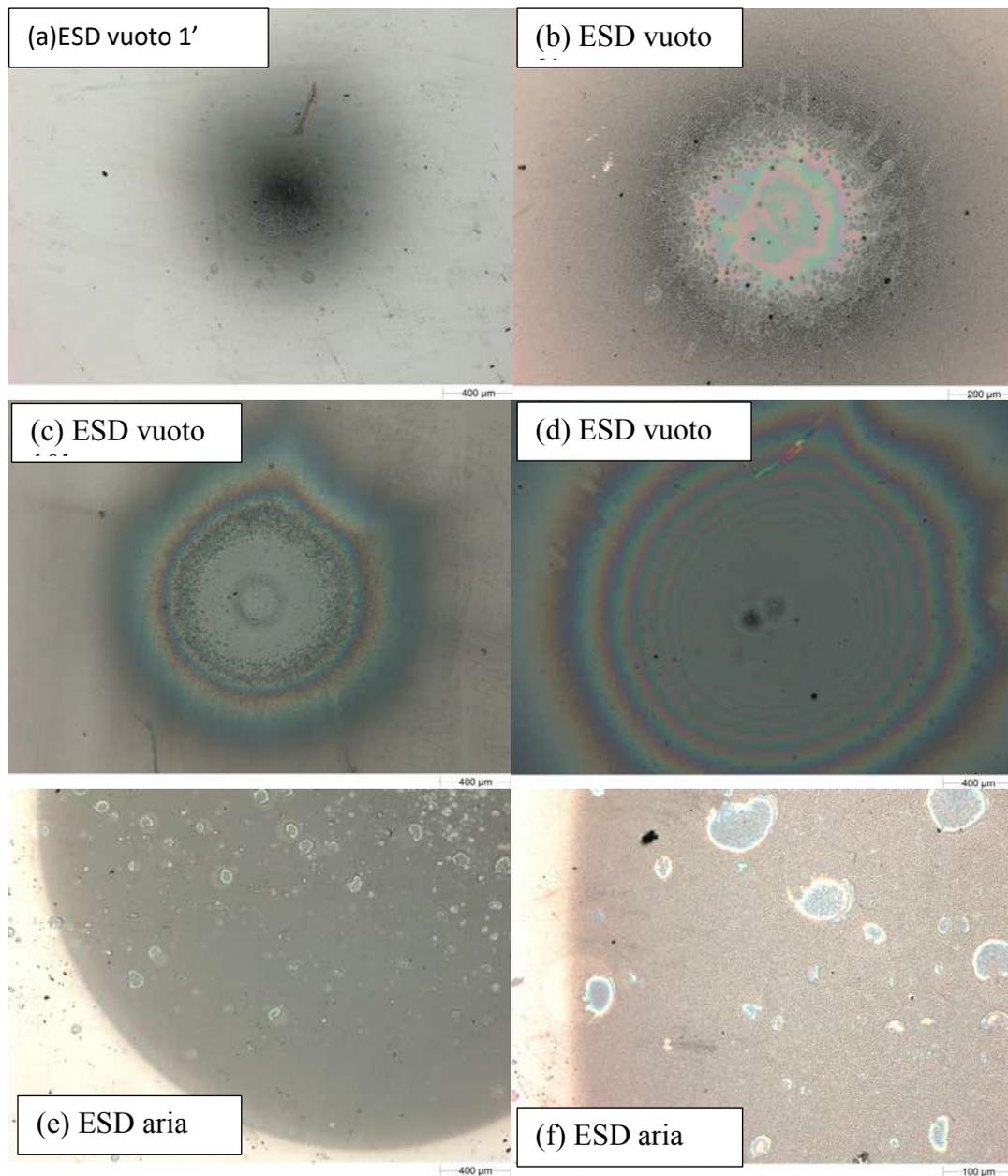


Figura 10 : Immagini della morfologia delle deposizioni in vuoto (a-d) e in aria (e-f) dell'enzima laccasi su un vetro conduttore a vari tempi di deposizione .

riportate per confronto anche due immagini (figure 10 (e-f)) di deposizioni ottenute con ESD in aria. A causa della presenza del cono di focheggiamento nel set-up delle deposizioni in aria, la dimensione dello spot non varia al crescere del tempo di deposizione (non mostrato in figura) ed esiste un bordo ben definito. Però al contrario del caso di ESD in vuoto, si può vedere chiaramente l'effetto di gocce macroscopiche di solvente, generate dall'instabilità della sorgente.

Un'analisi della trasmissione del fascio ionico dopo lo skimmer e la guida ottupolare ha portato alla conclusione che il rate di deposizione dopo la guida ottupolare si riduce di due ordini di grandezza rispetto a quello ottenuto nelle misure descritte nei precedenti paragrafi. Quindi nelle condizioni attuali non è ragionevole pensare di fare delle deposizioni su elettrodi commerciali per realizzare un biosensore dopo la guida ottupolare.

Riassumendo i risultati descritti si può concludere che, considerato il ridotto rate di deposizione, la grande perdita di materiale all'interfaccia aria vuoto, le performance del sensore comparabili con i sensori prodotti in aria nonostante le migliori condizioni ambientali della deposizione in vuoto, la ridotta efficienza del processo con tempi di deposizione più lunghi rispetto al setup in aria non permetta, allo stato attuale, un trasferimento diretto di questa tecnologia in un ambito di produzione di massa.

Ci si aspetta una situazione differente per la deposizione dopo la selezione in massa/carica operata dal filtro quadrupolare. Infatti la letteratura indica che sistemi molecolari con diversi rapporti massa/carica mostrano diverse conformazioni. Un esempio è rappresentato dall'emoproteina *Citocromo C* (Deng et. Nano Lett. 2012, 12, 2452) mostrato in figura 11.

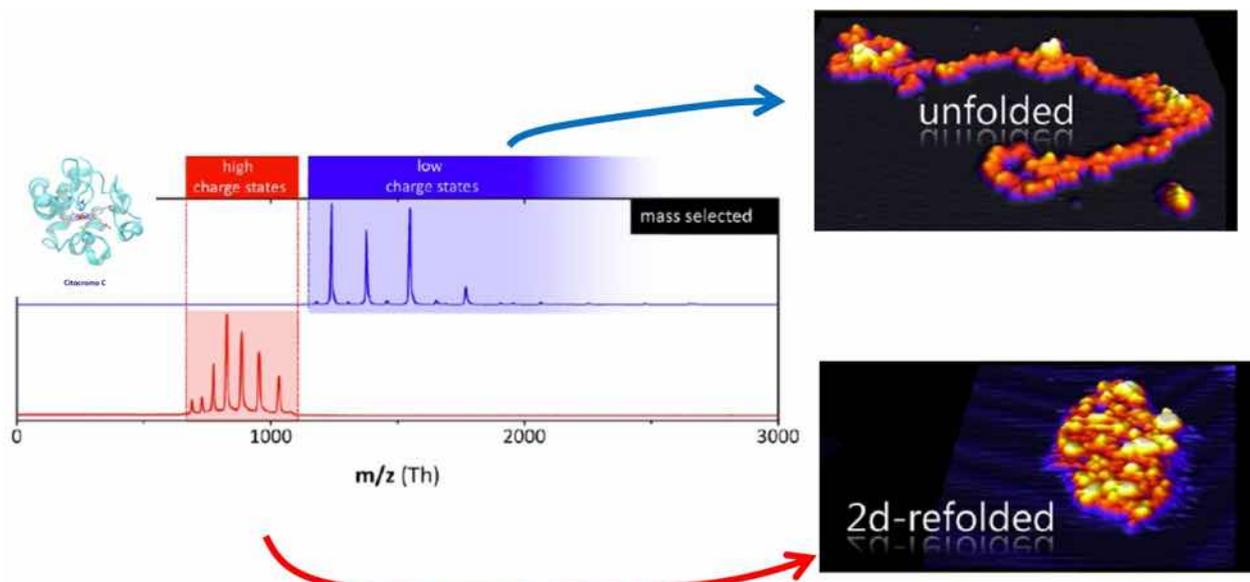


Figura 11 : Spettri di massa dell'emoproteina Citocromo C e immagini al microscopio a scansione dei depositi ottenuti selezionando stati di carica elevati ($m/z > 10$) che corrispondono a strutture ripiegate su se stesse o alternativamente stati di carica bassi ($m/z < 10$) che corrispondono a strutture "elongate".

Chiaramente una diversa conformazione implica anche diverse funzioni. Nel caso particolare dell'enzima laccasi, che reagisce attraverso un processo di ossidoriduzione con molti composti fenolici, i sensori prodotti sia con tecniche convenzionali come il dropcasting che con l'ESD in aria mostrano un'alta specificità ai composti polifenolici, ma una scarsa selettività all'interno di questa famiglia di composti. Un recente lavoro (R. Mehra et al. Sci.Rep. 8 (2018) 17285) in cui si combinano misure sperimentali dell'attività dell'enzima con un modeling basato su simulazioni di dinamica molecolare della struttura della proteina, ha evidenziato il ruolo della conformazione nel determinare l'attività dell'enzima rispetto a diversi substrati. Nella figura 12 è illustrato come una diversa conformazione del sito catalitico attivo possa portare a legare preferenzialmente un composto rispetto ad un altro.

L'applicazione del modello alle misure di un'attività selettiva della laccasi rispetto ai diversi composti fenolici ha mostrato che l'andamento osservato sperimentalmente è descritto sufficientemente bene dalla simulazione (figura 12). La sfida sperimentale da affrontare ora è quella di realizzare deposizioni di laccasi selezionando ioni con rapporti di massa/carica in intervalli ben definiti, verificare con misure morfologiche la conformazione degli ioni molecolari depositati e poi misurare la loro attività selettiva rispetto a differenti composti fenolici.

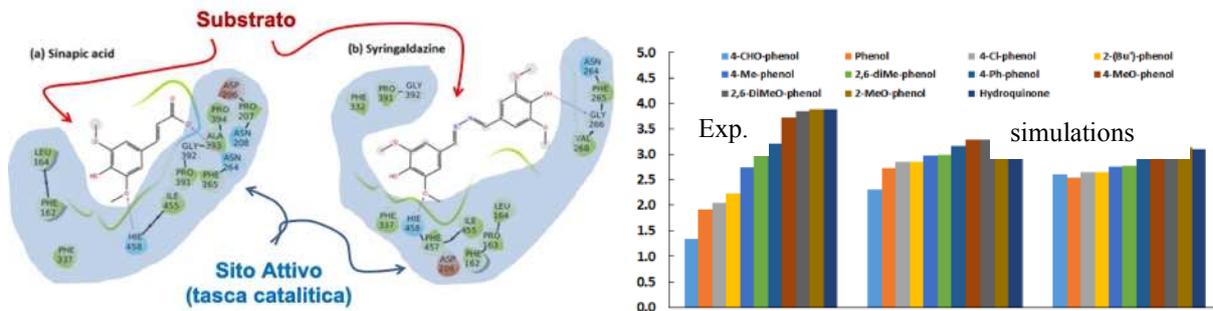


Figura 12 : (a) Esempi della dipendenza del legame laccasi-substrato dalla conformazione dell'enzima nel caso di due diversi composti. (b) Confronto tra le misure di attività per i diversi composti fenolici e i risultati di due diverse simulazioni di dinamica molecolare (R. Mehra et al. Sci.Rep. 8 (2018) 17285)

In caso di successo questo porterà alla realizzazione di una nuova generazione di sensori che avendo alla base del loro funzionamento la conformazione dell'enzima aggiungeranno alla specificità ai composti fenolici anche la selettività sul particolare composto fenolico. Questa peculiarità può rendere la tecnica di deposizione in ultra alto vuoto estremamente valida, e controbilancerebbe i limiti osservati precedentemente nel caso di deposizioni in vuoto del basso rate di deposizione e scarsa efficienza nell'uso del materiale, nonché un costo totale del processo più elevato necessitando di un set-up complesso operante in ultra alto vuoto.

A causa dei ritardi nella consegna della camera di deposizione (Deliverable 5, Milestone Mi9) non è stato possibile realizzare entro il periodo del progetto la caratterizzazione completa del processo di deposizione con selezione di massa/carica in ultra alto vuoto.

2. Innovazioni/avanzamenti tecnologici prodotti dal progetto in relazione allo stato dell'arte dello specifico settore (con riferimento ai risultati finora ottenuti, trasferibilità dei risultati e impatto della ricerca sul contesto socio economico regionale)

Il mercato dei biosensori è una frontiera in espansione, un settore da analizzare e comprendere. La continua crescita delle applicazioni e diffusione dei dispositivi in nuovi settori sono due elementi centrali nel percorso di espansione di tale segmento di mercato. Una recente analisi di Frost & Sullivan, intitolata "Analysis of the Global Biosensors Market", rileva che il mercato ha prodotto entrate per 11,53 miliardi di dollari nel 2014 e stima che tale cifra raddoppierà, raggiungendo quota 28,78 miliardi di dollari nel 2021. Nella medesima analisi si afferma che "Diverse aziende stanno investendo in ricerca e sviluppo per innovare e migliorare la tecnologia dei biosensori, renderla altamente sensibile e sviluppare piattaforme tecnologiche per ridurre sensibilmente i tempi di rilevamento considerando che il lungo ciclo di sviluppo dei dispositivi che utilizzano biosensori rappresenta un'ulteriore sfida."

La deposizione di materiali organici (dai sali molecolari alle proteine ed enzimi) sottoforma di film sottili o nanostrutture sta riscuotendo un grande interesse perché questi materiali sono relativamente a buon mercato e molto flessibili, con proprietà che possono essere manipolate attraverso la progettazione molecolare. Molecole biologiche complesse come gli enzimi e le proteine sono costruite dalla combinazione dei 20 aminoacidi standard e hanno una dimensione che varia dal nanometro al micron. Sono sistemi molecolari complessi altamente funzionali, nanostrutturati di per sé, che svolgono i loro compiti più e più volte, cioè sono delle vere e proprie "macchine molecolari". Per questa ragione sono di grande interesse per l'integrazione nei dispositivi. Per progettare dispositivi innovativi basati su materiali organici, è fondamentale da un lato individuare tecniche di immobilizzazione che preservino le condizioni della loro funzionalità e dall'altro sfruttare la disposizione e conformazione molecolare per realizzare funzioni particolari.

I risultati ottenuti dal progetto, soprattutto connessi alle attività del WP1 dedicate alla caratterizzazione della tecnica ESD in aria, hanno mostrato che la deposizione per electrospray ionization è una tecnica di immobilizzazione competitiva. Infatti nel caso test dell'enzima laccasi si è dimostrato che l'enzima depositato preserva il 75% della sua attività contro valori decisamente inferiori ottenuti con deposizioni via laser. L'implementazione della tecnica nel set-up sviluppato ad-hoc (vd. Sezione 4 di questa relazione) permette inoltre di ridurre la quantità di materiale utilizzato per la deposizione, con un chiaro vantaggio economico nel suo trasferimento nel mercato. Inoltre i biosensori ottenuti depositando l'enzima su elettrodi screen printed commerciali (Metrohm DropSens Screen-printed Carbon Electrode DRP-110) mostrano non solo una risposta lineare su concentrazioni del composto da rivelare che coprono due ordini di grandezza, una risposta in pochi decine di secondi e un buon limite di rivelabilità ($2 \mu\text{M}$), ma soprattutto caratteristiche eccellenti per quanto riguarda il riutilizzo del sensore e la sua stabilità nel tempo. Come mostrato nella figura 13 lo stesso sensore mantiene una risposta inalterata fino a 65 misure consecutive e la stessa risposta è ottenuta fino ad almeno 20 giorni dopo la deposizione dell'analita per ESD pur essendo stato conservato a temperatura ambiente senza alcuna particolare condizione di conservazione. Sempre nella stessa figura si mostra come lo stesso sensore ricondizionato dopo un anno, e anche in questo caso conservato senza particolari condizioni a temperatura

ambiente, mostra una risposta analoga al sensore appena preparato e conserva la sua operatività per almeno 20 misure consecutive.

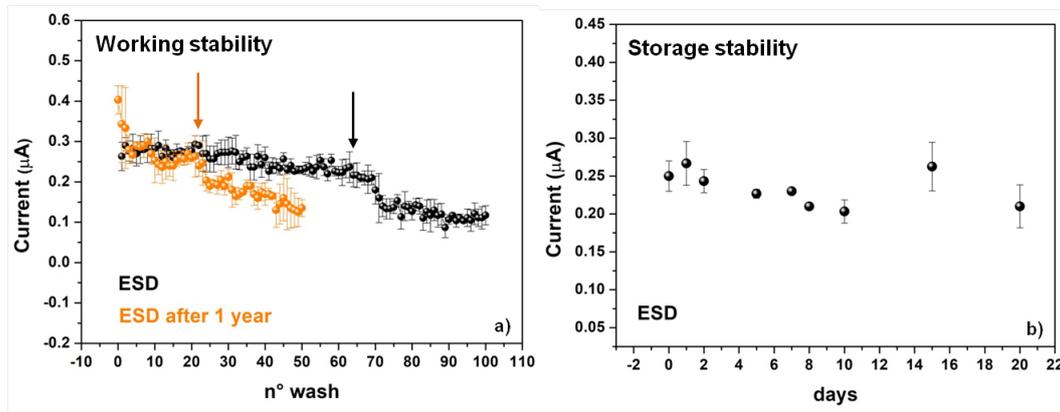


Figura 13 : (a) Stabilità degli elettrodi depositati con ESD (nero) e ridepositati dopo un anno (arancione) rispetto a misure consecutive. (b) Stabilità temporale degli elettrodi. Il potenziale applicato è $-0,03$ V. Volume di misurazione: $100 \mu\text{L}$ di tampone e $50 \mu\text{M}$ di catecolo. Dopo ogni misura l'elettrodo viene lavato con 0.1 M di acido citrico / citrato di sodio a pH 4.5.

Queste performance non trovano corrispondenza in altri biosensori basati sull'enzima laccasi in cui l'immobilizzazione è realizzata con altre tecniche. La descrizione dettagliata delle performance del sensore depositato per ESD e il confronto con altre tecniche di immobilizzazione è discusso in dettaglio nel report del Deliverable D8, allegato a questa relazione (All.2) e in una pubblicazione in via di sottomissione a Biosensors and Bioelectronics. Le performance in termini di riuso, stabilità nel tempo e possibilità di ricondizionamento di sensori inutilizzati rendono i sensori ottenuti per ESD estremamente interessanti nella prospettiva di produrre sensori riusabili ed ecocompatibili riducendo il contributo all'inquinamento prodotto dai sensori monouso.

Inoltre la combinazione di questa tecnica di immobilizzazione con le nanotecnologie per la produzione di opportuni elettrodi può ulteriormente migliorare le performance del sensore e ridurre la quantità di analita da immobilizzare, con grande risparmio di materiali. Un esempio di questo è rappresentato dalla deposizione di laccasi su elettrodi modificati con carbon black, preparati dalla PMI SENS4MED, Spin off dell'Università di Tor Vergata Roma, riportato nel lavoro di Castrovilli et. al. pubblicato su Biosensors and Bioelectronics 163 (2020) 112299 (All.10).

Per validare l'applicazione della tecnica di immobilizzazione in collaborazione con la PMI Biosensor S.r.l., partner del progetto, la tecnica ESD è stata utilizzata per la deposizione dell'enzima lattato ossidasi (LOx) allo scopo di realizzare un biosensore "wearable" per monitorare la concentrazione di lattato in fluidi biologici, come per esempio il sudore. L'enzima LOx catalizza la trasformazione del lattato in piruvato mediante una reazione di ossidoriduzione, ed è usato per funzionalizzare le superfici di biosensori e monitorare la concentrazione di lattato in fluidi biologici come indicatore della soglia anaerobica durante l'esercizio fisico o in altre patologie come per esempio l'infezione da patogeni inclusa quella da Sar-Cov2 [Shabnam et al. IDCases, 21, 2020, e00829]. Inoltre, la determinazione del lattato è di notevole importanza nell'industria del vino e della fermentazione dell'acido lattico. Pertanto, lo sviluppo di un biosensore capace di misurare la concentrazione di lattato in modo continuo nel tempo è di notevole interesse. L'attività si è dapprima focalizzata sull'analisi delle caratteristiche chimico-fisiche dell'enzima, prendendo in considerazione studi precedenti e analizzando la sequenza amminoacidica, e la struttura molecolare dell'enzima utilizzando tool di bioinformatica disponibili sul web. Tale studio è stato finalizzato a migliorare le condizioni di immobilizzazione per sviluppare un biosensore amperometrico, utilizzando elettrodi in grafene modificati con blue di prussia e cercando di incrementare notevolmente la stabilità dell'enzima utilizzando la tecnica di bio-funzionalizzazione ESD. Più nello specifico sono state cercate e applicate le condizioni sperimentali per la funzionalizzazione degli elettrodi di grafene con la LOx, tali da garantire la stabilità i) della nebulizzazione per tutto il tempo di deposizione e ii) dell'enzima, consentendo di conservare la sua attività enzimatica su lungo termine.

La caratterizzazione morfologica dei depositi sugli elettrodi ottenuti con LOx in ISO propanolo al 10%, ha evidenziato la presenza del biofilm sulla superficie dell'elettrodo mentre le misure amperometriche hanno provato che l'attività dell'enzima è preservata. Come nel caso della laccasi i test di stabilità nel tempo dimostrano che l'enzima depositato via ESD resiste a svariati lavaggi della superficie, dimostrando come la tecnica permetta un efficace ancoraggio dell'enzima alla superficie dell'elettrodo, rendendo il biofilm altamente resistente e attivo nel tempo. L'attività è continuata con la verifica della deposizione sui sensori "wearable" di interesse di Biosensor S.r.l. I risultati hanno mostrato che è possibile depositare la LOx su questi sensori ed ottenere un biosensore funzionante purchè gli elettrodi siano modificati con blue di prussia e la risposta in corrente in valore assoluto è proporzionale alla concentrazione del mediatore. La PMI continuerà l'attività ottimizzando i vari parametri per ottenere un biosensore commercialmente competitivo. I primi risultati ottenuti sulla deposizione della LOx sono raccolti nel Deliverable D10 (All.3).

Questi risultati e le caratteristiche dell'ESD hanno già generato l'interesse per l'utilizzo di questa tecnica per l'immobilizzazione di opportuni biorecettori per la rivelazione di troponina, il marcatore biochimico di lesioni al

miocardio. E' stato sviluppato un progetto che prevede la partecipazione di due PMI del Lazio (Microsis S.r.l e Biosensor S.r.l), due istituti del CNR ed il Dipartimento di Chimica dell'Università di Tor Vergata per produrre un sensore da inserire in un kit diagnostico point-of-care in grado di fornire risultati in un tempo molto breve e trasmetterli via cloud ad uno specialista remoto. Un'altra ricaduta di questa attività è il suo possibile utilizzo da parte di Biosensor S.r.l., la PMI partner del progetto, per la deposizione di soluzioni di polianilina (PANI) su substrati di ossidi o ceramici nell'ambito dello sviluppo di sensori per gas serra.

Le attività connesse al WP3 mirano alla deposizione di grandi molecole in ambiente pulito, di alto vuoto, cosa impossibile con metodi convenzionali come l'evaporazione termica, perché la soglia di decomposizione di questi sistemi è inferiore all'energia necessaria per trasferirli in fase gas. Il collo di bottiglia di questa attività è rappresentato dall'efficienza del trasporto e deposizione del fascio ionico. Più la funzionalità ambita nel sensore dipende da specifiche proprietà chimico/fisiche del sistema molecolare, che implicano un'alta selettività per esempio nella selezione in massa/carica del fascio ionico, più la fluenza del fascio ionico iniziale diventa importante. A tal fine particolare attenzione è stata posta nella progettazione di tutte le sezioni del set-up fin dalla sezione di immissione dello spray in vuoto, al fine di massimizzare l'immissione e trasporto del fascio di ioni molecolari, dalla sua generazione fino al target di deposito. A questo scopo diverse geometrie per l'accoppiamento aria-vuoto sono state investigate.

L'aumento della fluenza del fascio, l'ottimizzazione del sistema di trasporto in base ai risultati delle simulazioni realizzate nell'attività 3.1 del WP3 ed il controllo da remoto dei vari elementi del set-up sono gli elementi che possono far evolvere la tecnica di ESD in vuoto dalla suo stato attuale di "proof of principle" ad uno strumento utilizzabile nel campo delle nanotecnologie. Di questo risultato sicuramente beneficerà la PMI Ionvac Process S.r.l., partner del progetto, che potrà inserire questa strumentazione nel suo portfolio di strumenti per la preparazione di materiali.

3. Descrizione delle attività svolte dal Gruppo di Ricerca con evidenza dell'apporto e del contributo di ogni singolo membro (partecipazione, coinvolgimento, ecc.)

Il gruppo di ricerca ha avuto dei momenti comuni di incontro per definire lo stato di avanzamento delle varie attività, discutere come affrontare le criticità e programmare il proseguimento delle attività. Questi sono stati:

- Kick-off meeting 12 Settembre 2018 (Sede secondaria CNR-ISM Montelibretti) (Milestone Mi1)
- Meeting di progetto 29 Maggio 2019 (Biosensor S.r.l., Formello)
- Meeting di progetto 24 Giugno 2019 (presso Dipartimento DIBAF, Università della Tuscia, Viterbo) (Milestone Mi10)
- Meeting di progetto 6 Febbraio 2020 (Sede secondaria CNR-ISM Montelibretti)
- Incontro per stato avanzamento camera di deposizione 19 Giugno 2020 (Ionvac process S.r.l., Pomezia)
- Mail stato avanzamento progetto 24 Giugno 2020
- Meeting di progetto 17 Settembre 2020 (Sede secondaria CNR-ISM Montelibretti e Microsoft Teams) (Milestone Mi13)
- Test accoppiamento camera di deposizione - set-up ESI 7 Ottobre (Sede secondaria CNR-ISM Montelibretti)
- Meeting finale di progetto 5 Marzo 2021 (Sede secondaria CNR-ISM Montelibretti e Microsoft Teams)

Le agende di questi meeting sono raccolte nell'Allegato 11.

Il gruppo di ricerca inizialmente composto da 6 unità, includendo i coordinatori, provenienti da tre Istituzioni diverse (CNR-ISM & ISMN, Sapienza Università di Roma e Università della Tuscia) si è arricchito delle unità di personale incrementale acquisite con i fondi del progetto (dott.sa L. Carlini ricercatore TD, Milestone Mi2 e Mi6, e dott.sa M.A. Parracino assegnista di ricerca, Milestone Mi5), la dott.sa M.C. Castrovilli (unità di personale a TD in servizio presso CNR-ISM), il dott. J. Chiarinelli (dottorando presso il Dip. di Scienze, Università di Roma Tre in cotutela con CNR-ISM), le dott.se V. Scognamiglio e A. Antonacci e il sig. A. Ranieri (CNR-IC), la sig.ra E. Tempesta (CNR-IGAG) e i sig. G.P. Parisi e A. Morabito (CNR-ISM). Questo gruppo rappresenta un blend di competenze che vanno dalla capacità di progettare strumentazione innovativa per la produzione e trattamento di fasci ionici (Avaldi, Bolognesi, Calandra), l'esperienza in chimica-fisica di molecole e sistemi di interesse biologico (tutti i membri), la conoscenza di metodologie di spettrometria di massa convenzionali e innovative (Cartoni, Bolognesi, Avaldi, Castrovilli), la padronanza delle metodologie teoriche per la definizione della struttura molecolare e della dinamica molecolare dei sistemi di interesse (Borocci, Casavola, Cartoni), le applicazioni in biosensoristica (Scognamiglio, Antonacci, Castrovilli) e durante il progetto ha goduto del supporto tecnico nei settori elettronico (A. Morabito), software e informatico (A. Ranieri e G. Parisi) e microscopia (E. Tempesta). Per le PMI coinvolte nel progetto hanno collaborato alle varie attività la dott.sa M.T. Giardi, il dott. D. Zappi e l'ing. G. Ravani (Biosensor S.r.l.) e i sig. A. Vitulano e G. Sabbatella (Ionvac Process S.r.l.). Infine va sottolineato come l'attività di divulgazione connessa al progetto ha stimolato l'interesse di alcuni studenti del Dipartimento di Chimica di Sapienza Università di Roma ed una di loro (L. Gallo) ha deciso di svolgere la sua tesi magistrale sotto la guida delle dott.se. Cartoni e Castrovilli studiando l'applicazione dell'ESD in aria.

Il contributo di ciascun membro ai tre WP del progetto può essere schematizzato nel seguente modo

WP1 : Realizzazione ed ottimizzazione di un sistema di deposizione per electrospray ionization (ESD) di enzimi in aria

Responsabile : A. Cartoni

Attività:

Realizzazione del sistema di deposizione in aria (Castrovilli, Chiarinelli, Bolognesi, Avaldi)

Test e definizione delle procedure di deposizione (Castrovilli, Bolognesi, Parracino, Calandra, Cartoni, Tempesta, Scognamiglio)

Test amperometrici sui sensori a base di laccasi e lattato-ossidasi (Castrovilli, Parracino, Scognamiglio, Antonacci, Gallo, Biosensor S.r.l.)

WP2 : Studio computazionale dell'interazione enzima-solvente ed enzima-supporto

Responsabile: S. Borocci

Attività:

Definizione caratteristiche del server (Borocci, Casavola)

Installazione del server, del sistema operativo e dei software di simulazione MD presso DIBAF, Università della Tuscia (Borocci) (Milestone Mi3)

Dinamica Molecolare dell'evoluzione del citocromo C e della laccasi in soluzione (Borocci, Cartoni, Casavola)

Simulazione delle condizioni di spray e deposizione (Borocci, Cartoni, Casavola)

WP3: Apparato prototipo per la deposizione in vuoto e ultra-alto vuoto di specie selezionate in massa/carica

Responsabile : P. Bolognesi

Attività:

Assemblaggio e test del sistema da alto vuoto con selezione in massa/carica di specie cariche (Bolognesi, Chiarinelli, Carlini, Morabito)

Sviluppo di alimentatori programmabili (Morabito, Bolognesi, Chiarinelli, Avaldi)

Predisposizione di un sistema temporaneo per test di deposizione in alto vuoto (Bolognesi, Chiarinelli)

Software di controllo del sistema da alto vuoto (Bolognesi, Chiarinelli, Ranieri)

Simulazione del trasporto del fascio ionico (Chiarinelli, Bolognesi, Avaldi)

Progettazione e realizzazione del sistema di deposizione in UHV (Avaldi, Bolognesi, Chiarinelli, Ionvac Process S.r.l.)

Commissioning del sistema di deposizione in UHV (Bolognesi, Chiarinelli, Carlini, Ionvac Process S.r.l.)

Misure di caratterizzazione di peptidi al sincrotrone (Carlini, Bolognesi, Avaldi)

Coordinamento del progetto : L. Avaldi

Definizione e manutenzione del sito web : G.P. Parisi

4. Descrizione delle attrezzature, macchinari e software utilizzati nel Progetto di ricerca

WP1 : Realizzazione ed ottimizzazione di un sistema di deposizione per electrospray ionization (ESD) di enzimi in aria

Nell'ambito di questa attività è stato realizzato un apparato versatile per realizzare l'ESD a pressione atmosferica ("in aria") in condizioni controllate. L'apparato e tutte le sue componenti sono illustrate nella figura 13.

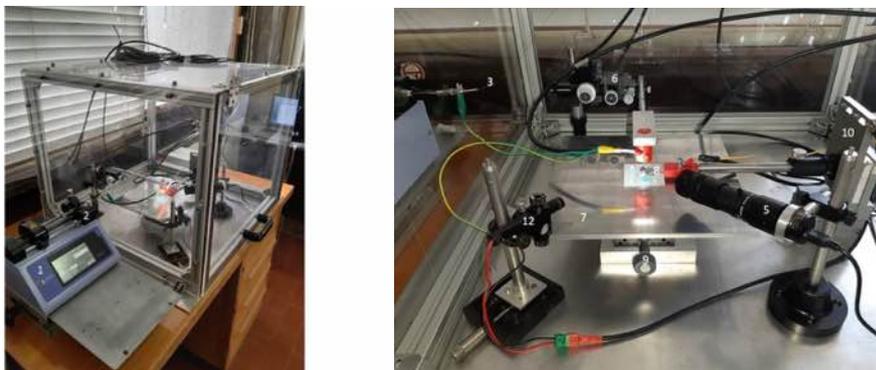


Figura 13 : Il set-up per ESD in aria con le sue varie componenti : la pompa Harvard Apparatus Pump 11 elite (1) e la siringa Hamilton 250 µl Gastight 1725 (2) con la soluzione sono poste all'esterno del box del set-up. Gli altri elementi in figura sono : un capillare in silice (lunghezza 50 cm e diametro interno 250 µm -Agilent Technologies) (3), ago (lunghezza 2 cm e diametro interno 100 µm -Vita Needles)(4), telecamera M-0616-E (SPECWELL) (5); traslatore x/y/z per l'allineamento dell'ago, (Thorlabs)(6); portacampioni (7); elettrodo conico di foceggiamento (8); traslatore x/y per l'allineamento del portacampioni (Thorlabs) (9); traslatore x/y/z per l'allineamento elettrodo conico di foceggiamento (Thorlabs) (10); sorgente di luce a LED (12) per la visualizzazione del cono di Taylor.

Come illustrato nel report del Deliverable 3 allegato (All. 1) questo sistema permette un buon controllo della deposizione. Il monitoraggio con la telecamera della qualità dello spray e l'introduzione dell'elettrodo di focheggiamento hanno ottimizzato notevolmente l'utilizzo dell'analita rispetto alla situazione in cui lo spray è indirizzato direttamente sul portacampione. La movimentazione dell'ago rispetto al portacampioni permette un allineamento ideale per deposizioni su elettrodi di diverse dimensioni. Il set-up è stato inserito all'interno di una cappa di aspirazione ed è incluso in un contenitore di plexiglass isolato, per permettere l'aspirazione di eventuali vapori nocivi attraverso una pompa.

WP2 : Studio computazionale dell'interazione enzima-solvente ed enzima-supporto

Per questa attività è stata acquisita una workstation dotata di un sistema multiprocessore con scheda grafica GPU per calcolo parallelo intensivo secondo lo schema ibrido CPU/GPU (Workstation HP Z6, CPU:1 CPU da 96GB(3x32GB); GPU : NVIDIA Quadro P5000 16GB).

La workstation è stata installata presso il Dipartimento per l'Innovazione dei sistemi biologici, agroalimentari e forestali dell'Università della Tuscia, Viterbo, e messa in rete per poter essere utilizzata sia dal gruppo del CNR-ISM a Montelibretti che dalla dott.sa Cartoni del Dipartimento di Chimica, Sapienza Università di Roma.

Il server è completamente dedicato alle simulazioni di dinamica molecolare ed ai calcoli della struttura di enzimi e proteine. Per le simulazione di dinamica molecolare si è scelto di utilizzare il software open-source GROMACS, con licenza gratuita LGPL (Lesser General Public License).

WP3: Apparato prototipo per la deposizione in vuoto e ultra-alto vuoto di specie selezionate in massa/carica

La strumentazione in uso per realizzare le attività di questo WP è completamente originale e progettata ad-hoc (figure 14-16). La parte di generazione del fascio ionico, il suo trasporto e selezione in massa/carica è stata sviluppata dal CNR-ISM in collaborazione con CNRS-CIMAP.

Il disegno tecnico dell'apparato è riportato in figura 14, mentre le parti realizzate sono illustrate nelle figure 15 e 16.

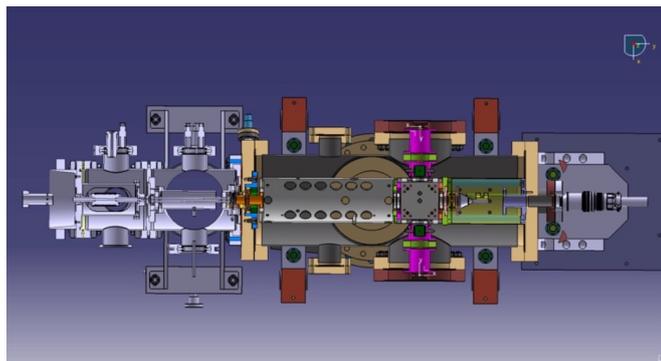


Figura 14 : Vista dall'alto del progetto Autocad dell'intero apparato. Partendo da sinistra si possono vedere il sistema di inserimento in vuoto del fascio ionico, il sistema di trasporto con l'ottupolo, il sistema per la selezione in massa/carica con il quadrupolo, il deflettore elettrostatico quadrupolare per portare il fascio verso la camera di deposizione e in fondo a destra il sistema di diagnostica con un rivelatore per ioni.



Figura 15: La prima parte del set-up in cui il fascio ionico è immesso in vuoto e guidato dall'ottupolo. Nella configurazione mostrata sopra dopo la valvola si è connessa la camera provvisoria per studiare la deposizione in alto vuoto (vd. Attività 3.3)



Figura 16: La seconda sezione dell'apparato con le due componenti: quadrupolo e deflettore elettrostatico.

Il sistema di controllo per assegnare le tensioni e/o le radiofrequenze ai vari elementi del set-up, leggere la corrente del fascio nei vari punti (figura 17) e misurare l'intensità della corrente ionica trasmessa alla fine del set-up è stato realizzato nel linguaggio LabView (National Instrument) in collaborazione con il sig. A. Ranieri del CNR-IC. Il

sistema di alimentatori programmabili custom per i vari elementi di ottica ionica è stato progettato in collaborazione con il Dip. di Fisica dell'Università di Aarhus e in parte realizzato all'interno del CNR-ISM dal sig. A. Morabito.

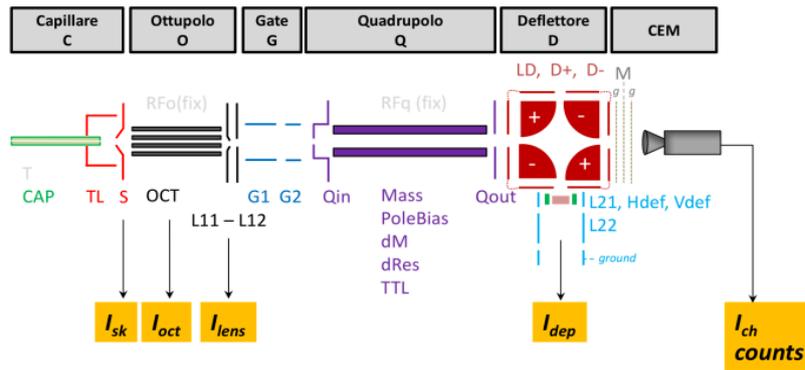


Figura 17 : Schema del sistema di trasporto degli ioni con i vari elementi. I punti per la misura dell'intensità del fascio per la sua ottimizzazione sono indicati dai box gialli.

Il progetto del prototipo per la camera di deposizione sviluppato in collaborazione con Ionvac Process S.r.l. è iniziato nel 2019 dopo che tutte le componenti relative al trasporto (figura 16) e selezione del fascio (figura 17) sono state consegnate presso il laboratorio della sede secondaria del CNR-ISM a Montelibretti. La descrizione del progetto del sistema di deposizione è oggetto del Deliverable D2 (All. 8). Una vista complessiva del sistema di deposizione con la camera di load/lock è rappresentata in figura 18, mentre in figura 19 è mostrato lo schema di accoppiamento della camera di deposizione con la camera del quadrupolo/deflettore elettrostatico già mostrato nelle figure 14-16. Il sistema è composto da due camere da vuoto: una camera di load-lock per l'inserimento dei campioni e una per la deposizione vera e propria. Le due camere sono separate da una valvola che permette l'introduzione dei campioni senza perturbare lo stato di vuoto della camera di deposizione. Il sistema è anche dotato di due manipolatori per l'inserimento del campione e per il suo posizionamento durante la deposizione. Un terzo manipolatore alloggia una serie di strumenti per realizzare la diagnostica del fascio prima della deposizione.

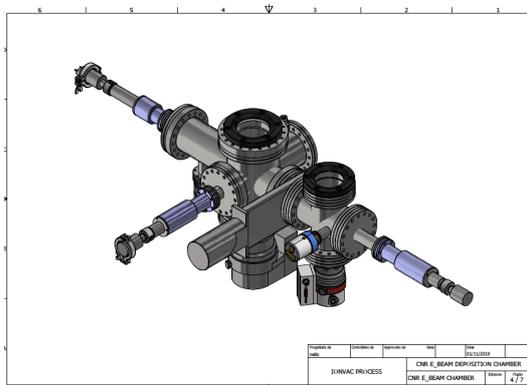


Figura 18: Progetto del prototipo del sistema di deposizione con la camera di load/lock e la camera di deposizione vera e propria.

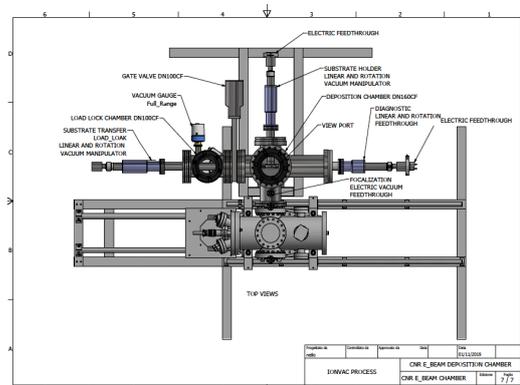


Figura 19: Accoppiamento del prototipo della camera di deposizione con la camera del quadrupolo/deflettore elettrostatico.

La situazione pandemica e il conseguente lock-down di tutte le attività nei primi mesi del 2020 ha ritardato notevolmente la realizzazione della camera di deposizione da parte di Ionvac Process S.r.l.. Nel mese di Giugno 2020 sono state prodotte le due camere (figura 20) e definite le specifiche tecniche del porta-campioni e manipolatore per la strumentazione di diagnostica.



Figura 20 : (a) Stato di avanzamento nella realizzazione della camera di deposizione e (b) definizione delle specifiche del porta-campioni e del sistema di aggancio/sgancio del campione presso Ionvac Process S.r.l. .

Nel mese di Ottobre 2020 è stato possibile realizzare i test di accoppiamento delle camere con il set-up installato presso i laboratori ISM di Montelibretti (figura 21) e definire le specifiche del supporto da realizzare con profilati in alluminio.

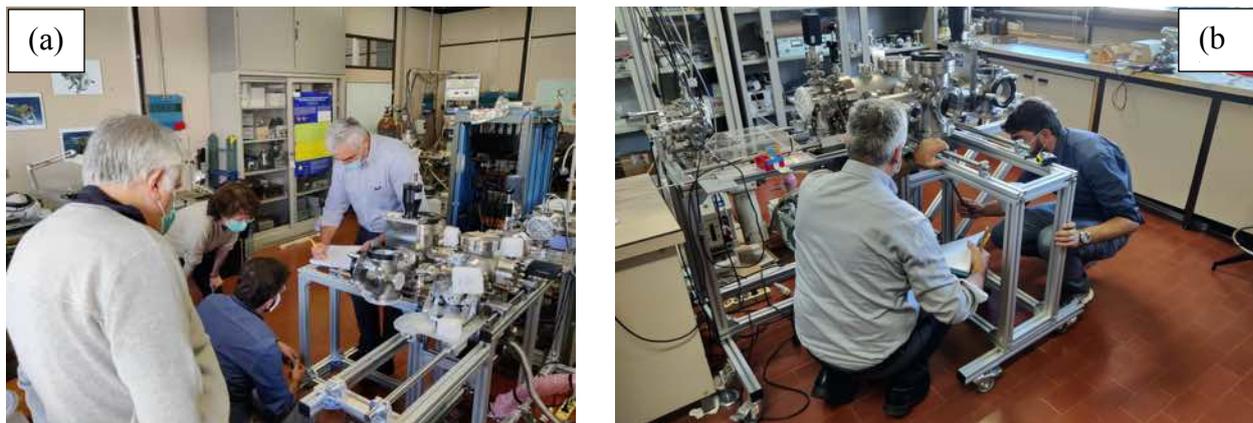


Figura 21 : Test di (a) accoppiamento della camera di deposizione al set-up del CNR-ISM a Montelibretti ; (b) supporto in profilati di alluminio

I collaudi finali del livello di vuoto delle camere e delle movimentazioni sono stati svolti presso la Ionvac Process S.r.l. in Febbraio 2021 (figura 22). Avendo verificato che il sistema raggiungeva un livello di vuoto ($p = 5 \cdot 10^{-7}$ mbar) coerente con le specifiche, il sistema di trasporto del campione dalla camera di load-lock al porta-campioni e quello di aggancio/sgancio del campione sul porta-campioni si comportavano come da specifica si è ritenuto il collaudo positivo. Quindi la camera di deposizione è stata consegnata ed accoppiata alla strumentazione preesistente presso i laboratori ISM di Montelibretti (Deliverable D5) come si può vedere in figura 23.

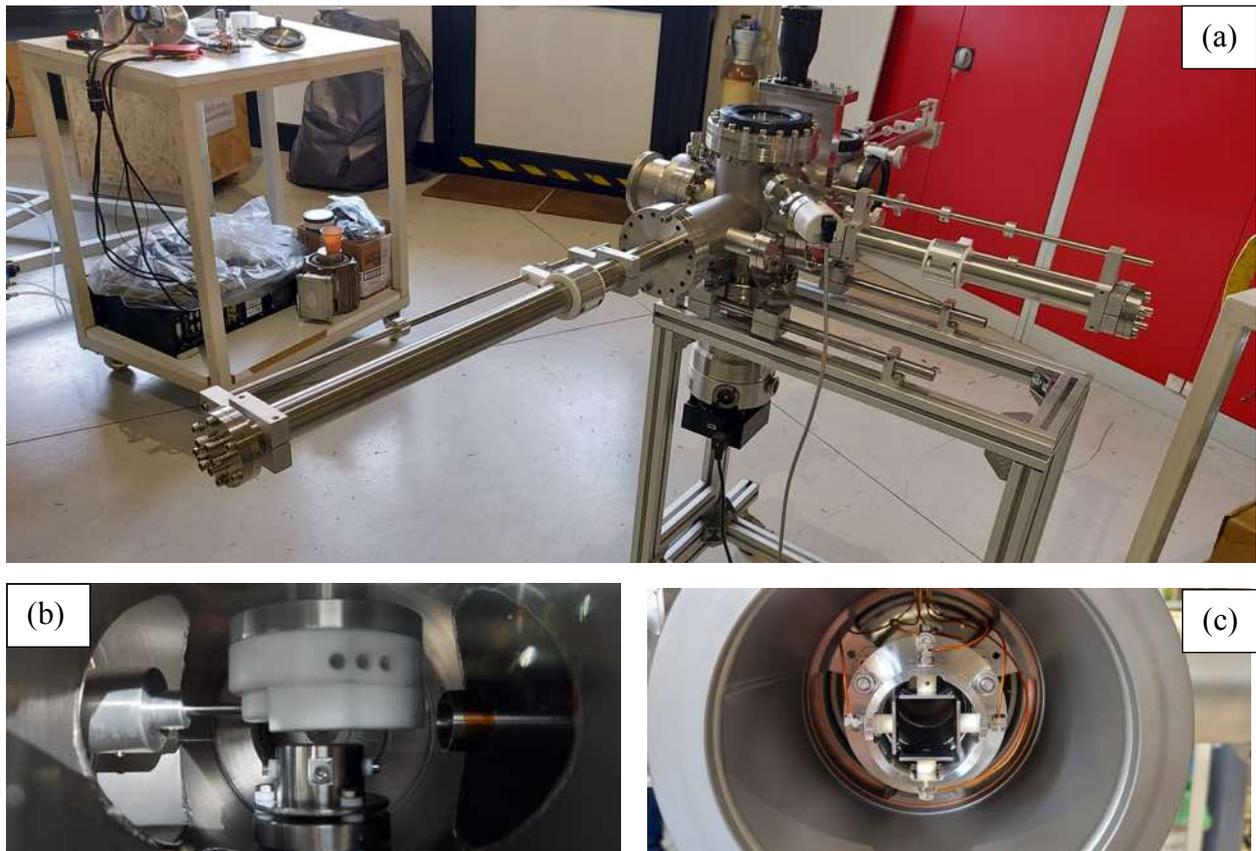


Figura 22 : (a) Sistema completo con camera di deposizione e camera di load-lock ; (b) Portacampioni e sistema di inserimento del campione ; (c) ottica di ionica di ingresso alla camera di deposizione per il trasporto e la guida del fascio ionico sul campione.



Figura 23 : La camera di deposizione accoppiata al set-up del CNR-ISM a Montelibretti.

5. Descrizione delle attività svolte per la diffusione dei risultati del progetto (pubblicazioni; produzione di materiali informativi; organizzazione di seminari; partecipazione a congressi, missioni e stage, ecc.)

Pubblicazioni (All.10) :

- 1) M. C. Castrovilli, P. Bolognesi, J. Chiarinelli, L. Avaldi, P. Calandra, A. Antonacci, V. Scognamiglio
The convergence of forefront technologies in the design of laccase based biosensors -An update
Trends in Analytical Chemistry 119 (2019) 115615
- 2) M. C. Castrovilli, P. Bolognesi, J. Chiarinelli, L. Avaldi, A. Cartoni, P. Calandra, E. Tempesta, M. T. Giardi, A. Antonacci, F. Arduini, V. Scognamiglio

Electrospray deposition as a smart technique for laccase immobilisation on carbon black-nanomodified screen-printed electrodes

Biosensors and Bioelectronics 163 (2020) 112299

3) J. Chiarinelli, P. Bolognesi and L. Avaldi

Ion optics simulation of an ion beam set-up coupled to an electrospray ionisation source, strengths and limitations

Review Scientific Instruments 91 (2020) 073203

Contributi a conferenze (All.12)

J. Chiarinelli, P. Bolognesi, J. M. Ramillon, P. Rousseau, A. Domaracka, M. C. Castrovilli and L. Avaldi

An electrospray ionisation apparatus for gas phase study of biomolecules

XXXI International Conference on Photonic, Electronic, and Atomic Collisions 23 July – 30 July 2019, Deauville, France, Book of abstract p.223 (poster)

P. Bolognesi

Size and environmental effects in molecular photofragmentation

20th International Symposium on Correlation, Polarization and Ionization in Atomic and Molecular Collisions (COPIAMC) Metz (France) ,1-3 August 2019 (presentazione plenaria su invito).

M. C. Castrovilli, J. Chiarinelli, P. Bolognesi, E. Tempesta, P. Calandra, A. Cartoni, A. Antonacci, L. Avaldi, F. Arduini, V. Scognamiglio

Electrospray ionisation technique in biosensor design: deposition of laccase enzyme as case study

XXVIII Congress of the Analytical Chemistry Division, Bari 22 – 26 September 2019 (presentazione orale)

P. Bolognesi, L. Carlini, A. Cartoni, A.R. Casavola, M.C. Castrovilli, J. Chiarinelli, L. Avaldi

Radiosensitisers and radiation damage

Workshop MOST@Elettra2.0 , Trieste (Italia), 20-21 Gennaio 2020 (presentazione orale)

L. Carlini, P. Bolognesi , J. Chiarinelli, M.C. Castrovilli, M. H. Stockett, H. Zettergren, A. Domaracka, P. Rousseau, S. Suvasthika, C. Nicolafrancesco and L. Avaldi

Peptide bond formation and decomposition in linear and cyclic dipeptides

Workshop MOST@Elettra2.0 , Trieste (Italia), 20-21 Gennaio 2020 (poster)

L. Carlini, P. Bolognesi , J. Chiarinelli, M.C. Castrovilli, M H Stockett, H Zettergren, A. Domaracka, P. Rousseau, I. Suvasthika, C. Nicolafrancesco and L. Avaldi

Gas-phase linear and cyclic dipeptides: a study of peptide bond formation and decomposition

1st Annual Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Caen (France) 18-21 February 2020 (poster)

L. Carlini, J. Chiarinelli, M. C. Castrovilli, P. Bolognesi, L. Avaldi, G. Mattioli

Mass spectrometry and infrared studies on dipeptides reveal an effective (and non-chemically activated) cyclisation mechanism in abiotic conditions

PATAS 2021- Processing in ATmospheric and ASTrochemical environments-WG3 meeting of the MD-GAS COST Action 18-21 January 2021

L. Carlini, J. Chiarinelli, M. C. Castrovilli, P. Bolognesi, G. Mattioli, L. Avaldi

Temperature induced cyclisation mechanisms in linear dipeptides

WP1&WP2 Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Virtual Conference 15-19 March 2021 (presentazione orale)

J. Chiarinelli, P. Bolognesi, M.C. Castrovilli, L. Carlini and L. Avaldi

Experimental characterization and ion optics simulation of an in-vacuum electrospray ionization apparatus

WP1&WP2 Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Virtual Conference 15-19 March 2021 (poster)

Organizzazione di seminari (All. 13) e workshop (All. 14)

22 Marzo 2019 Seminario Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali, Università degli studi della Basilicata, CAMPUS Macchia Romana (Pz)

Relatori : Dr.sa V. Scognamiglio; Dr.sa P. Bolognesi

21 Giugno 2019 Seminari Sala Parravano, Dip. Chimica, Sapienza Università di Roma

Relatori : Prof. M. Castagnola; Dr.sa M.C. Castrovilli; Prof.sa F. Arduini

15 Gennaio 2020 Seminario CNR-Istituto di Struttura della Materia, Ed.15 Area della Ricerca del CNR di Roma 1, Montelibretti

Relatore: Dr.sa M. A. Parracino

6 Febbraio 2020 Seminario CNR-Istituto di Struttura della Materia, Ed.15 Area della Ricerca del CNR di Roma 1, Montelibretti

Relatori: Prof. R. Velotta, Dr. A. Bearzotti

17 Settembre 2020 Seminario CNR-Istituto di Struttura della Materia, Ed.15 Area della Ricerca del CNR di Roma 1, Montelibretti

Relatore: Dr. D. Zappi

25 Febbraio 2021 Workshop virtuale (Piattaforma Gotomeeting)

“Nuove tecnologie per sensori e biosensori @ CNR-Area della Ricerca di Roma 1”

Il workshop ha visto la presentazione di 13 contributi orali e la partecipazione di circa 50 ricercatori. Il workshop è stato pubblicizzato oltre che sul sito del progetto anche attraverso i siti dell'Area della Ricerca di Roma 1 (<http://www.mlib.cnr.it/nuove-tecnologie-per-sensori-e-biosensori-area-della-ricerca-di-roma-1/>), dell'Istituto di Struttura della Materia (<http://www.ism.cnr.it/it/news/archivio-news/item/86-workshop-nuove-tecnologie-per-sensori-e-biosensori-area-della-ricerca-di-roma-1.html>) e sui canali social dell'Istituto di Struttura della Materia. Un breve report del workshop è stato anche riportato sul sito istituzionale del CNR (<https://www.cnr.it/it/news/10048/nuove-tecnologie-per-sensori-e-biosensori-cnr-area-della-ricerca-di-roma-1>).

Partecipazione a congressi**P. Bolognesi**

-XXXI International Conference On Photonic, Electronic, and Atomic Collisions 23 July – 30 July 2019, Deauville, France

-20th International Symposium on Correlation, Polarization and Ionization in Atomic and Molecular Collisions (COPIAMC) Metz (France) 1-3 August 2019

-Workshop MOST@Elettra2.0, Trieste (Italia), 20-21 Gennaio 2020

-1st Annual Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Caen (France) 18-21 February 2020

-Patas Cost MD-Gas Virtual Conference 2021, January 18, 2021

-Workshop virtuale “Nuove tecnologie per sensori e biosensori @ CNR-Area della Ricerca di Roma 1” 25 Febbraio 2021

-WP1&WP2 Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Virtual Conference 15-19 March 2021

L. Avaldi

-XXXI International Conference On Photonic, Electronic, and Atomic Collisions 23 July – 30 July 2019, Deauville, France

-20th International Symposium on Correlation, Polarization and Ionization in Atomic and Molecular Collisions (COPIAMC) Metz (France) 1-3 August 2019

-Workshop MOST@Elettra2.0, Trieste (Italia), 20-21 Gennaio 2020

-1st Annual Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Caen (France) 18-21 February 2020

-Patas Cost MD-Gas Virtual Conference 2021, January 18, 2021

-Workshop virtuale “Nuove tecnologie per sensori e biosensori @ CNR-Area della Ricerca di Roma 1” 25 Febbraio 2021



-WP1&WP2 Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Virtual Conference 15-19 March 2021

J. Chiarinelli

-XXXI International Conference On Photonic, Electronic, and Atomic Collisions 23 July – 30 July 2019, Deauville, France

-1st Annual Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Caen (France) 18-21 February 2020

-Patas Cost MD-Gas Virtual Conference 2021, January 18, 2021

-Workshop virtuale “Nuove tecnologie per sensori e biosensori @ CNR-Area della Ricerca di Roma 1” 25 Febbraio 2021

-WP1&WP2 Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Virtual Conference 15-19 March 2021

M.C. Castrovilli

-Workshop MOST@Elettra2.0 , Trieste (Italia), 20-21 Gennaio 2020

-XXVIII Congress of the Analytical Chemistry Division, Bari 22 – 26 September

-1st Annual Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Caen (France) 18-21 February 2020

-Patas Cost MD-Gas Virtual Conference 2021, January 18, 2021

-Workshop virtuale “Nuove tecnologie per sensori e biosensori @ CNR-Area della Ricerca di Roma 1” 25 Febbraio 2021

-WP1&WP2 Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Virtual Conference 15-19 March 2021

L. Carlini

-Workshop MOST@Elettra2.0 , Trieste (Italia), 20-21 Gennaio 2020

-1st Annual Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Caen (France) 18-21 February 2020

-Patas Cost MD-Gas Virtual Conference 2021, January 18, 2021

-Workshop virtuale “Nuove tecnologie per sensori e biosensori @ CNR-Area della Ricerca di Roma 1” 25 Febbraio 2021

-WP1&WP2 Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Virtual Conference 15-19 March 2021

A. Casavola

-Patas Cost MD-Gas Virtual Conference 2021, January 18, 2021

-Workshop virtuale “Nuove tecnologie per sensori e biosensori @ CNR-Area della Ricerca di Roma 1” 25 Febbraio 2021

-WP1&WP2 Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Virtual Conference 15-19 March 2021

A. Cartoni

-Workshop MOST@Elettra2.0 , Trieste (Italia), 20-21 Gennaio 2020

-Patas Cost MD-Gas Virtual Conference 2021, January 18, 2021

-WP1&WP2 Meeting COST Action CA18212 -Molecular Dynamics in the GAS phase, Virtual Conference 15-19 March 2021

Partecipazione ad eventi

M.C. Castrovilli ha partecipato all’evento organizzato da LazioInnova (14 Dicembre 2018, WEGIL, Roma) per la premiazione dei progetti vincitori del bando “Gruppi di Ricerca”

(<http://www.pz.ism.cnr.it/desir/deliverables/meetings/52-premiazione-progetti-gruppi-di-ricerca.html>)

Sito WEB

La descrizione delle attività svolte è riportata sul sito web del progetto <http://www.pz.ism.cnr.it/desir>.

Nota : L’url del sito web è stata cambiata rispetto a quella indicata nella convenzione sottoscritta ad Agosto 2018.

Allegati :

- Allegato 1 Condizioni ottimali per ESD in aria e test su laccasi (Deliverable D3)
- Allegato 2 Valutazione risultati deposizioni in aria della laccasi (Deliverable D8)
- Allegato 3 Valutazione deposizione in aria dell'enzima lattato ossidasi su SPE e sensori wearable (Deliverable D10)
- Allegato 4 Molecular Dynamic simulation (Deliverable D6)
- Allegato 5 Interazione Laccasi-solvente e Struttura molecolare in fase liquida e gassosa. Interazione Laccasi-supporto (Deliverable D11)
- Allegato 6 The high vacuum electrospray ionization apparatus, ion optics simulation (Deliverable D1)
- Allegato 7 The high vacuum electrospray ionization apparatus: beam transport and m/z selection (Deliverable D4)
- Allegato 8 Progetto di massima della camera di deposizione (Deliverable D2)
- Allegato 9 The high vacuum electrospray ionisation apparatus, deposition of proteins in vacuum conditions (Deliverable D9)
- Allegato 10 Pubblicazioni
- Allegato 11 Agende meeting
- Allegato 12 Contributi a conferenze
- Allegato 13 Organizzazione di seminari
- Allegato 14 Workshop

Luogo e data: Montelibretti 13 Aprile 2021

Il Coordinatore Scientifico Dr. Lorenzo Avaldi

Il Legale Rappresentante Prof. Aldo Di Carlo
(firma digitale)