



## 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 intermedi/finali raggiunti e quelli che si intendono ancora perseguire, metodologia di implementazione del Progetto ecc.)

Il progetto è articolato in tre workpackage :

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

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

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 electrospray ionization (ESD) di enzimi in aria

Responsabile : A. Cartoni (Sapienza Università di Roma). Partecipanti : P. Bolognesi , M.C. Castrovilli e P. Calandra (CNR). Collaborazione con PMI : Biosensor srl.

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 ESD 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" per la produzione 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.

Questo primo periodo è stato dedicato al raggiungimento degli obiettivi dell'Attività 1.1, mentre l'Attività 2.1 è stata iniziata e sarà completata nel secondo periodo del progetto.

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 originario. Il sistema di riferimento per lo sviluppo del sistema di deposizione ESD è stato l'enzima laccasi. 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 anche sull'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 per electrospray. A seguito dei test descritti nel report allegato (All.1) si è osservato che etanolo e metanolo presentano una simile compatibilità con l'attività enzimatica della laccasi, e considerando la migliore 'performance' del metanolo come agente protonante in soluzioni ESI, è stata infine individuata la composizione ideale per la soluzione da utilizzare nella deposizione in una concentrazione all'80 % di H<sub>2</sub>O e 20% di metanolo e una concentrazione di laccasi di 2µg/µl. Il 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 sono stati :

- 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 per realizzare sensori
- l'ESD può essere utilizzata per depositare su elettrodi commerciali (Screen Printed Electrodes) per realizzare biosensori
- è stata dimostrata una buona riproducibilità del processo sia all'interno di uno stesso set o in set diversi di elettrodi
- i depositi realizzati presentano una buona stabilità nel tempo (fino a 90 giorni).

La performance sensoristica degli elettrodi è stata valutata in collaborazione con la PMI Biosensor srl, 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.

Nell'ambito di questa attività è iniziata una collaborazione con il gruppo del Dr. Andrea Bearzotti, CNR-IIA, che sviluppa microbilance al quarzo "custom" per diverse applicazioni. Sono stati svolti dei 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.

Per la caratterizzazione della struttura e morfologia sono stati realizzati dei depositi su vari supporti per misure di fotoemissione XPS, misure di microscopia SEM e ottica. Le prime misure di fotoemissione sono state realizzate, utilizzando dei supporti di F-TiO<sub>2</sub> (Fluorine doped Tin Oxide coated glass) presso il Dip. di Scienze dell'Università di Roma Tre confrontando campioni depositati per ESD e drop casting. L'analisi dei dati è in corso.

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

Responsabile : S. Borocci (Università della Tuscia). 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 Tuscia, Viterbo.

Sono state realizzate le seguenti attività:

- installazione e configurazione di Ubuntu 16.0.4
- installazione del software openMPI 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 il corso della sperimentazione evitando processi di trial/error dispendiosi. 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 amminoacidi 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.2) 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 sia 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 in acqua che nell'altra soluzione è stata seguita per circa 300 ns dopo un periodo di equilibrizzazione 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.

La simulazione in fase gas che riproduca le condizioni sperimentali di spray con l'ESI è 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, e rimuovendo 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 400 ns alcune molecole di acqua permangono ancora all'interno della proteina.

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

Questa attività che era prevista in cascata alle due precedenti non è ancora iniziata e sarà l'oggetto della seconda parte del progetto.

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), 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 in costruzione 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 con 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 nell'ambito di Progetto PICS BIFACE con CNRS-CIMAP (France) e sono già nel laboratorio di Roma. 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. Pertanto fino ad ora solo la prima parte in alto vuoto è stata completamente caratterizzata. Le condizioni geometriche e l'effetto dei vari elementi elettrostatici responsabili del trasporto del fascio ionico dalla sorgente fino all'uscita della guida ottupolare sono stati simulati con il software di ottica elettrostatica SIMION. I risultati della simulazione sono oggetto di un report, che corrisponde al Deliverable D1 del progetto ed è allegato a questa relazione (All. 3). Inoltre il sistema è stato dotato di un software di controllo che permette di ottimizzare il trasporto del fascio ionico durante l'esperimento.

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 deposizioni con selezione di massa/carica in ultra alto vuoto. La progettazione di questa camera nonché delle strumentazioni di diagnostica del film 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 di tutti gli elementi dell'apparato il progetto definitivo del prototipo del sistema di deposizioni (Deliverable D2, All.4) è stata approvato solo in Novembre 2019, come illustrato nella sezione 4 della relazione. La camera di deposizione contiene un porta-campioni per ospitare i diversi tipi di supporti o direttamente gli elettrodi

(per esempio Screen Printed Electrodes) usati nei sensori e dei sistemi di diagnostica del fascio montati su un traslatore. Questi sistemi consistono in un rivelatore di ioni per l'ottimizzazione dell'intensità del fascio ionico e una microbilancia al quarzo per la valutazione quantitativa del rate di deposizione. La realizzazione del prototipo è in fase avanzata di costruzione presso la PMI Ionvac Process, Pomezia (Roma). La consegna del sistema di deposizione per l'accoppiamento con l'apparato e i primi test di vuoto sono previsti per la primavera 2020 (Milestone Mi7).

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

Quest'attività prevedeva in primo luogo la realizzazione della camera di deposizione, per poi procedere con le prime deposizioni dell'enzima laccasi in alto vuoto, cioè all'uscita dell'ottupolo, utilizzando le condizioni di nebulizzazione (solventi/tensioni) della sorgente ESI e i supporti utilizzati nel WP1. A causa dei ritardi nella consegna di tutte le componenti meccaniche e quindi la mancata realizzazione in questo primo periodo del sistema di deposizione, dopo i test di trasmissione (Attività3.1) si è proceduto ad approntare ed accoppiare un sistema di deposizione temporanea. I primi test con la deposizione dell'enzima laccasi sono iniziati solo nel mese di Dicembre 2019 (Milestone Mi9). Questa attività continuerà nel prossimo periodo allo scopo di confrontare le caratteristiche di attività del film e quindi le performance del dispositivo realizzato in condizioni di 'vuoto', in termini di efficienza, soglie di rilevabilità e durabilità con quelle ottenute nella deposizione in aria. Verrà valutato se la ridotta efficienza, in termini di tempi di deposizione, sia accettabile per un trasferimento in ambito produttivo, anche in relazione alla performance del sensore prodotto 'in vuoto' rispetto a quello prodotto 'in aria'.

In una seconda fase quando il sistema di deposizione oggetto dell'Attività 3.2 sarà completato ed accoppiato al quadrupolo si effettueranno delle deposizioni con fasci ionici selezionati in massa/carica. Anche in questo caso l'efficienza del sistema verrà valutata con la deposizione dell'enzima laccasi. Per completare la qualificazione del sistema si è programmato di depositare il citocromo c (CytC) su diversi supporti. Questa proteina è stata scelta perché le sue varie conformazioni, che dipendono fortemente dal suo stato di carica, giocano un ruolo fondamentale nei processi di trasferimento elettronico nei mitocondri e nell'apoptosi cellulare.

## **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 ~~dello sviluppo~~ 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 da 20 aminoacidi diversi 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 i principi della loro funzionalità e dall'altro sfruttare la disposizione e conformazione molecolare per realizzare funzioni particolari.

I risultati ottenuti in questa prima fase del progetto, soprattutto connessi alle attività del WP1 dedicata 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. Inoltre i biosensori ottenuti depositando l'enzima su elettrodi screen printed commerciali mostrano un'ottima risposta lineare, un buon limite di rivelabilità ( $2 \mu\text{M}$ ), una sufficiente durata nel tempo (il sensore è stato utilizzato fino a 90 giorni dalla sua deposizione senza degradazione delle sue caratteristiche pur essendo stato conservato in condizioni di temperatura ambiente, senza particolare cura) e una buona potenzialità di riuso (lo stesso sensore è stato riutilizzato fino a 30 volte senza degradazione delle sue performance).

Le implementazioni 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 la combinazione di questa tecnica di immobilizzazione con nanotecnologie per la produzione di opportuni elettrodi può portare ad un miglioramento sia del limite di rivelazione sia ad un'ulteriore riduzione della quantità di materiale da immobilizzare.

Queste caratteristiche hanno già generato l'interesse per l'utilizzo dell'ESD in aria per l'immobilizzazione di opportuni biorecettori per la rivelazione di troponina, il marcatore biochimico di lesioni al miocardio. È 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 Srl, 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 fluensa 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 due diverse geometrie per l'accoppiamento aria-vuoto sono state progettate e sono in fase di test.

L'aumento della fluensa 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" in uno strumento diffuso nel campo delle nanotecnologie. Di questo risultato sicuramente beneficerà la PMI Ionvac Process Srl, 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.)**

In questo periodo il gruppo di ricerca ha avuto dei momenti comuni di incontro per definire lo stato di avanzamento delle varie attività e programmare quelle future. 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)

Le agende di questi meeting e la lista dei partecipanti sono raccolti nell'allegato 5.

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 dell'unità di personale incrementale acquisita con i fondi del progetto (dott.sa L. Carlini, Milestone Mi2 e Mi6), la dott.sa M.C. Castrovilli (unità di personale a TD in servizio presso CNR-ISM), il dr. 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 (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) e le applicazioni in biosensoristica (Scognamiglio, Antonacci, Castrovilli). Inoltre nel mese di Novembre 2019 è stato emesso il bando per l'assegnazione di ricerca associato al progetto (Milestone Mi5). Il vincitore prenderà servizio presso CNR-ISM il giorno 2 gennaio 2020.

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, Bolognesi, Avaldi)

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

Test spettrofotometrici ed amperometrici sui sensori (Castrovilli, Scognamiglio, Antonacci, 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 Mi33)

DM dell'evoluzione del CytC in soluzione (Borocci, Cartoni, Casavola)

Simulazione delle condizioni di spray (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 (Bolognesi, Chiarinelli, Carlini, Morabito)

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

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

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

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 (ESI) di enzimi in aria

Nell'ambito di questa attività è stato realizzato un apparato versatile per realizzare una ESI a pressione atmosferica ("in aria") in condizioni controllate (figura 1).

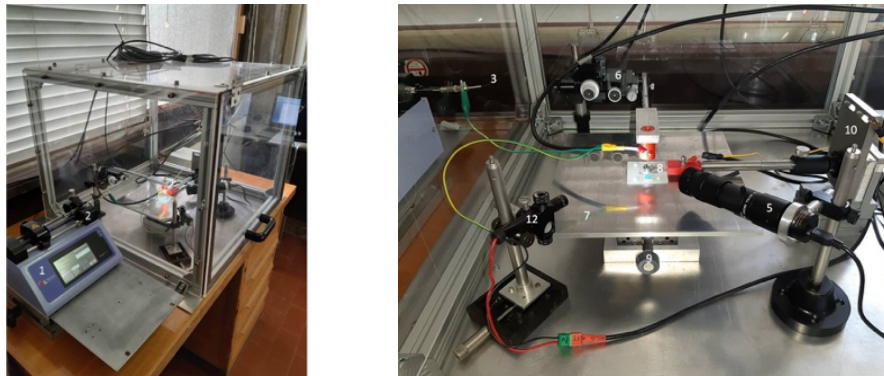


Figura 1 : Il set-up per ESI in aria con le sue varie componenti : la pompa Harvard Apparatus Pump 11 elite (1) e la siringa Hamilton 250  $\mu$ l Gastight 1725 (2) con la soluzione sono poste all'esterno del box del set-up. Gli altri elementi in figura sono : un capillare in silice (lunghezza 50 cm e diametro interno 250  $\mu$ m -Agilent Technologies) (3), ago (lunghezza 2 cm e diametro interno 100  $\mu$ m -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 foccheggio (8); traslatore x/y per l'allineamento del portacampioni (Thorlabs) (9); traslatore x/y/z per l'allineamento elettrodo conico di foccheggio (Thorlabs) (10); sorgente di luce a LED (12) per la visualizzazione del cono di Taylor.

Come illustrato nel report 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 foccheggio hanno ridotto notevolmente lo spreco di materiale rispetto alla situazione in cui lo spray è indirizzato direttamente sul portacampione.

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

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 (WorkstaNon 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. La parte di generazione del fascio ionico, il suo trasporto e selezione in massa è stata sviluppata dal CNR-ISM in collaborazione con CNRS-CIMAP.

Il disegno tecnico dell'apparato è riportato in figura 2, mentre le parti realizzate sono illustrate nelle figure 3 e 4.

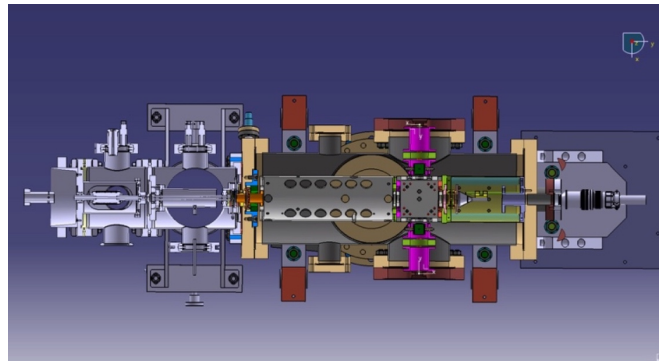


Figura 2 : Vista dall'alto del progetto dell'intero apparato. Partendo da sinistra si possono vedere il sistema di inserimento in vuoto del fascio ionico, il sistema di trasporto con l'ottupolo, il sistema per la selezione in massa/carica con il quadrupolo, il deflettore elettrostatico per portare il fascio verso la camera di deposizione e in fondo a destra il sistema di diagnostica con un rivelatore per ioni.

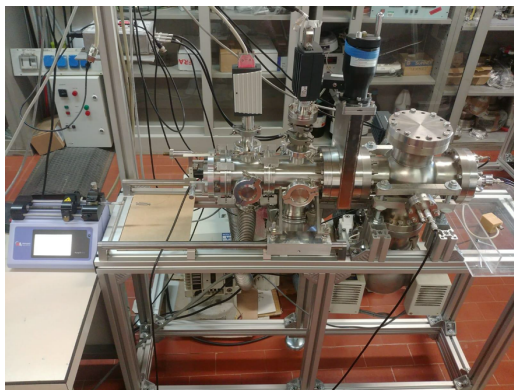


Figura 3: La prima parte del set-up in cui il fascio ionico è immesso in vuoto e guidato dall'ottupolo. Nella configurazione attuale dopo la valvola si è connessa la camera provvisoria per studiare la deposizione in alto vuoto (vd. Attività 3.3)

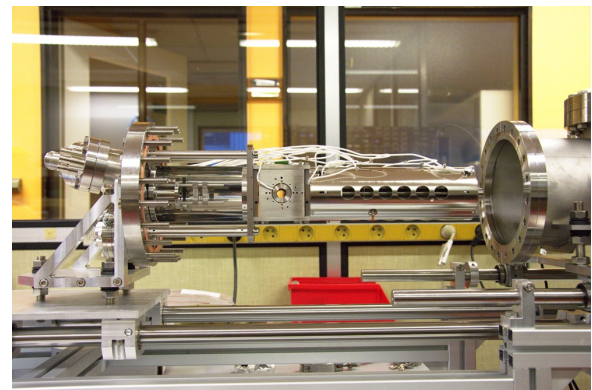


Figura 4: La seconda sezione dell'aparato con le due componenti: quadrupolo e deflettore elettrostatico.

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 5) e misurare l'intensità della corrente ionica trasmessa alla fine del set-up è stato realizzato nel linguaggio LabView (National Instrument).

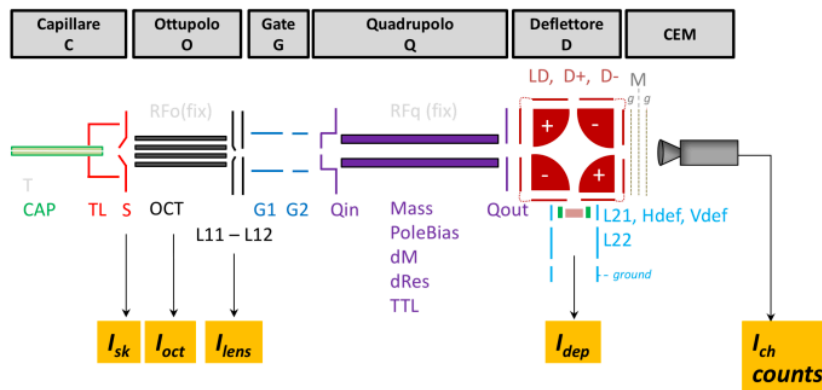


Figura 5 : Schema del sistema di trasporto degli ioni con i vari elementi. I punti per il prelievo dell'informazione sull'intensità del fascio per la sua ottimizzazione sono indicati dai box gialli.

Il prototipo per la camera di deposizione è stato progettato in collaborazione con Ionvac Process Srl una volta che tutte le componenti relative al trasporto (figura 3) e selezione del fascio (figura 4) sono state consegnate presso il laboratorio della sede secondaria del CNR-ISM a Montelibretti. Il progetto della camera è oggetto del Deliverable D2 del progetto DESIR (All. 4). Una vista complessiva del sistema è rappresentata in figura 6, mentre in figura 7 è mostrato l'accoppiamento della camera di deposizione con la camera del quadrupolo/deflettore elettrostatico già mostrato nelle figure 2-4.

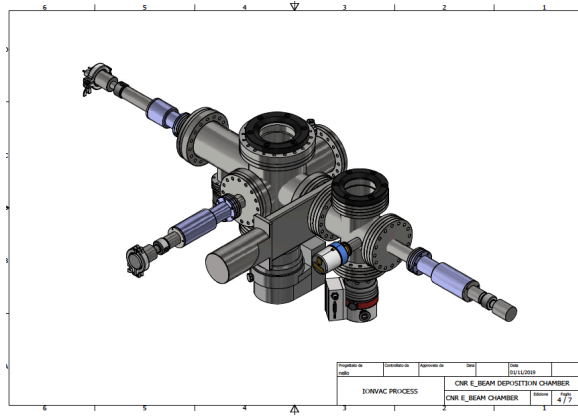


Figura 6: Progetto del prototipo del sistema di deposizione con la camera di load/lock e la camera di deposizione vera e propria.

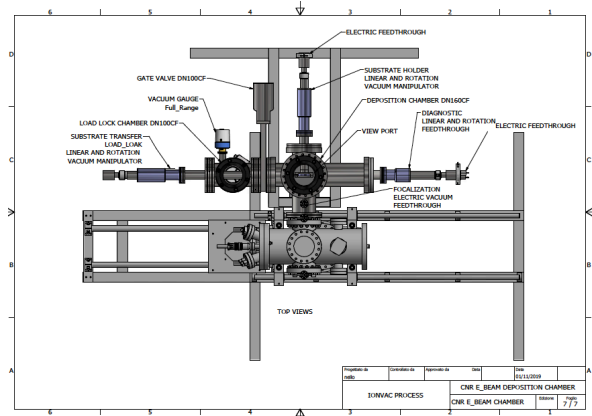


Figura 7 : Accoppiamento del prototipo della camera di deposizione con la camera del quadrupolo/deflettore elettrostatico

**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.)**

**Pubblcazioni (All.6) :**

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

**Contributi a conferenze (All.7)**

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)

**Organizzazione di seminari (All. 8)**



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

### 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

#### 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

#### J. Chiarinelli

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

#### M.C. Castrovilli

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

### 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 e in corso è riportata sul sito web del progetto [www.pz.ism.cnr.it/desir](http://www.pz.ism.cnr.it/desir).

Nota : si prega di notare che 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 Molecular Dynamic simulation (Deliverable D6)

Allegato 3 The high vacuum electrospray ionization apparatus, ion optics simulation (Deliverable D1)

Allegato 4 Progetto di massima della camera di deposizione (Deliverable D2)

Allegato 5 Agende e lista partecipanti meeting

Allegato 6 Pubblicazioni

Allegato 7 Contributi a conferenze

Allegato 8 Organizzazione di seminari



Luogo e data: Montelibretti 5 Dicembre 2019

Il Coordinatore Scientifico Dr. Lorenzo Avaldi

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