



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN : SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

DIGITAL FOOD: BIOSENSORI E LORO IMPIEGO NEL SETTORE ALIMENTARE

DIGITAL FOOD: BIOSENSORS AND THEIR APPLICATIONS ON FOOD SECTOR

TIPO TESI: compilativa

Studente:

GIOVANNI BERNETTI EVANGELISTA

Relatore:

DOTT.SSA ROBERTA FOLIGNI

Correlatore:

DOTT.SSA CINZIA MANNOZZI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

SOMMARIO

-Elenco tabelle.....	3
-Elenco figure.....	4
-Introduzione e scopo della tesi.....	5
-Capitolo 1: Biosensori come nuova tecnologia.....	6
1.1 composizione e struttura dei Biosensori.....	8
1.2 Tipologie differenti di Biosensori.....	9
1.2.1 Biorecettori.....	10
1.2.2 Trasduttori.....	10
-Capitolo 2: Analisi e determinazione della <i>Salmonella</i> con l'utilizzo di biosensori.....	12
2.1 Materie prime analizzate.....	13
2.2 Strumentazione utilizzata.....	14
2.3 Tipologia di analisi e metodica utilizzata.....	16
2.4 Risultati e conclusioni.....	19
-Capitolo 3: Biosensori utilizzati per la determinazione di tossine in ambito alimentare.....	20
3.1 Materie prime analizzate.....	21
3.2 Strumentazione utilizzata.....	21
3.3 Tipologia di analisi e metodica utilizzata.....	22
3.4 Risultati e conclusioni.....	25
-Capitolo 4: Biosensori utilizzati per il riconoscimento e la determinazione di antibiotici negli alimenti.....	26
4.1 Materie prime analizzate.....	28
4.2 Strumenti utilizzati.....	28
4.3 Tipologia di analisi e metodica utilizzata.....	28
4.4 Risultati e conclusioni.....	30
-Conclusioni.....	31
-BIBLIOGRAFIA.....	32

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Tabella tipologia trasduttori.....	11
Tabella 2: Tabella riportante i risultati del metodo 1 e del metodo 2, analisi <i>Salmonella</i>	19
Tabella 3: Risultati analisi sulle tossine.....	25

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Dimensione di due tipologie di biosensori rispetto ad una moneta da 10 cent.....	7
Figura 2: Struttura e composizione di un biosensore.....	8
Figura 3: Differenziazione dei principi utilizzati dai biosensori.....	9
Figura 4: Panoramica schematica dei biosensori per il rilevamento della <i>Salmonella</i>	13
Figura 5: Processo, dalla produzione al dato analitico.....	16
Figura 6: Dalla tossina al dato analitico.....	21
Figura 7: Schema che mostra una varietà di materiali per elettrodi utilizzati per la costruzione di biosensori.....	23
Figura 8: Tabella riportante esempi di biosensori specifici per tossine, e rispettivi dati analitici.....	24
Figura 9: Illustrazione schematica dell'applicazione di vari nanomateriali ed elementi di bioriconoscimento nello sviluppo di biosensori antibiotici.....	27
Figura 10: Alcuni metodi di rilevamento basati su biosensori aptamerici per la determinazione di SDM.....	30

Introduzione

Nel corso degli anni, in ambito scientifico, le tecniche analitiche richiedevano troppo tempo per svolgere le analisi e generare i risultati. Per questo è nata la necessità di avere una tecnica analitica, uno strumento che rendesse le analisi più efficienti ma soprattutto più veloci e immediate.

Pensando a questi bisogni, sono entrati in gioco i biosensori che consentono il rilevamento di varie tipologie di sostanze, fornendo i dati finali in grande velocità e precisione, con la produzione piccole quantità di residui di scarto. I biosensori sono stati utilizzati in molti settori scientifici, come ad esempio l'ambito medico, l'ambito biologico o l'ambito alimentare.

La seguente tesi intende descrivere le varie funzioni e applicazioni dei Biosensori in ambito scientifico, soprattutto focalizzandosi sulla ricerca di analiti specifici in ambito alimentare.

Prima verranno trattate le varie tipologie di biosensori e poi si approfondiranno argomenti riguardanti le analisi su matrice alimentare come: determinazione della Salmonella, determinazione di Micotossine e la rivelazione di antibiotici.

In fine si andranno a mettere a confronto i vari risultati e la vera efficienza dei Biosensori

Capitolo 1

Biosensori come nuova tecnologia

In molti ambiti scientifici la necessità di avere risultati e dati analitici immediati ha portato all'utilizzo di tecniche analitiche innovative. Fra queste tecniche troviamo i biosensori, strumenti utilizzati per effettuare analisi immediate e ridotto scarto in grado di fornire dati precisi e attendibili.

I Biosensori possono essere utilizzati su matrici e substrati di qualsiasi genere e grazie a questa caratteristica prendono impiego in svariati settori scientifici, come ad esempio quello alimentare, quello medico o quello biotecnologico.

Un'altra caratteristica che inserisce i biosensori tra le migliori tecniche analitiche è la praticità d'uso, essi possono essere utilizzati anche da operatori meno esperti grazie alla facilità di esecuzione e utilizzo.

L'ennesima caratteristica fondamentale che riguarda i biosensori di qualsiasi tipologia è la sostenibilità.

Andando ad analizzare più approfonditamente le caratteristiche che sono racchiuse all'interno dei biosensori, un attributo fondamentale che ritroviamo subito è la "specificità", cioè la capacità di reagire solamente con un determinato analita o alcuni degli elementi che lo caratterizzano, nella matrice in analisi. Quindi la specificità è una caratteristica fondamentale nelle analisi svolte tramite questi strumenti.

Un altro dei tanti fattori che caratterizzano i biosensori è la velocità di esecuzione e di generazione dei dati analitici. Infatti, il meccanismo dei biosensori è in grado di generare i risultati dell'analisi in una manciata di secondi, questa caratteristica ha rivoluzionato il mondo scientifico rendendo tutto molto più efficiente.

In fine il basso prezzo di costruzione dei biosensori fa di esso uno strumento davvero vantaggioso.

Di seguito sono riportate tutti i vantaggi che caratterizzano i biosensori:

- Basso costo;
- Velocità di risposta;
- Semplicità;
- Rapidità d'uso;
- Elevata specificità e sensibilità;
- Dimensioni ridotte;
- Facilità di trasporto;
- Minore pretrattamento del campione;

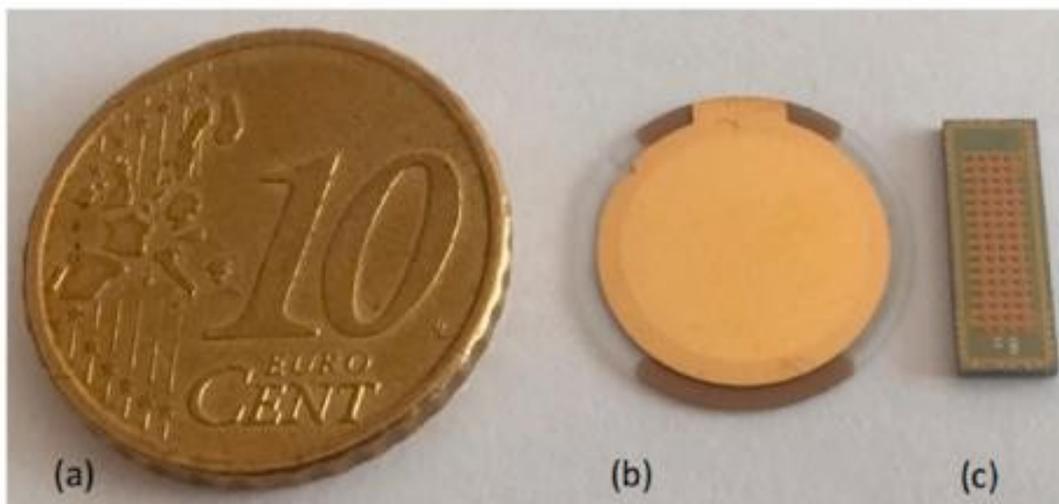


Figura 1: Dimensione di due tipologie di biosensori rispetto ad una moneta da 10 cent

. (P. Nolan et al 2021)

1.1 Composizione e struttura dei biosensori

I biosensori sono dispositivi utilizzati per misurare le reazioni biochimiche attraverso segnali generati dalla presenza di uno specifico analita.

Questi strumenti sono in grado di convertire un'attività biologica in un segnale, misurabile mediante la stretta integrazione di un elemento biologico sensibile con un sistema strumentale che poi genererà il dato analitico.

Il biosensore è composto da svariate parti ma le parti fondamentali che lo caratterizzano sono due: un biorecettore ed un trasduttore.

La prima struttura che compone il biosensore, consiste in un elemento sensibile chiamato "biorecettore", composto da materiale organico, che sarà poi l'elemento che andrà ad interagire con l'analita. Questa componente organica del biorecettore può essere di diverse tipologie come ad esempio, un enzima, un anticorpo o magari DNA e RNA e altre strutture differenti per ogni tipologia di analisi.

La seconda struttura che va a comporre il biosensore è un "trasduttore", cioè la componente elettronica che converte i segnali ricevuti dal biorecettore in veri e propri dati analitici e segnali rilevabili. Anche il trasduttore può essere di diversi tipi in base al tipo di analisi che si svolge o al tipo di analita che si cerca. (F. Malvano, 2020)

Ricapitolando i biosensori sono composti da due parti fondamentali un biorecettore che interagisce con il substrato organico ed un trasduttore che trasforma il segnale in dati analitici. Andando ad analizzare il segnale generato dal substrato a contatto con il biorecettore, in base ai diversi tipo di analisi si possono avere diversi tipi di segnali come ad esempio un segnale ottico, termico o elettrico che poi è convertito per mezzo di un trasduttore adatto in parametro elettrico misurabile, solitamente una corrente o una tensione.

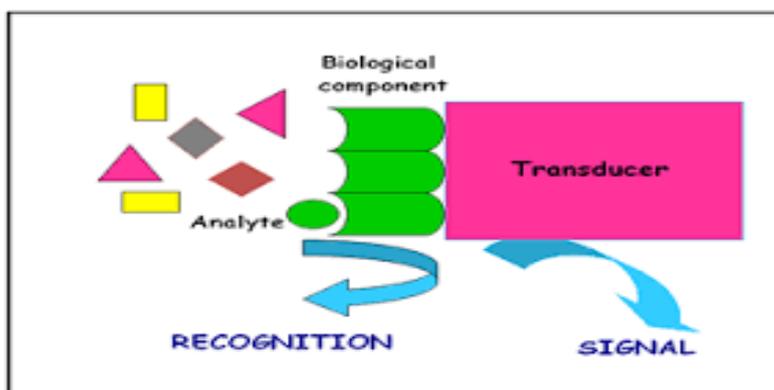


Figura 2: Struttura e composizione di un biosensore.

<https://www.chimicamo.org/chimica-analit-1>

1.2 Tipologie differenti di biosensori

I biosensori sono degli strumenti analitici che vengono utilizzati per molteplici tipologie di analisi e per questo sono stati creati e sperimentati diversi biosensori, in questo capitolo ne verranno descritte le tipologie.

I biosensori si basano su diversi principi come:

Biosistemi: in questi biosensori, cambiamenti nel pH, metabolismo cellulare ed espressione genica possono essere quantificati analizzando la risposta dei trasduttori in presenza di un analita target.

Bioaffinità: i biosensori basati sulla bioaffinità sono ampiamente utilizzati nella separazione e rilevamento di biomolecole. Questi usano componenti molecolari come gli elementi di rilevamento tipo anticorpi, peptidi, proteine ecc...

Biocatalitici: sono biosensori a base di enzimi, strumenti analitici robusti in cui gli enzimi vengono utilizzati come elementi di rilevamento biologico. In alcuni di questi biosensori, le molecole enzimatiche possono essere immobilizzate sul trasduttore specifico per migliorare la riproducibilità del rilevamento. (F. Piroozmand, et al, 2020)

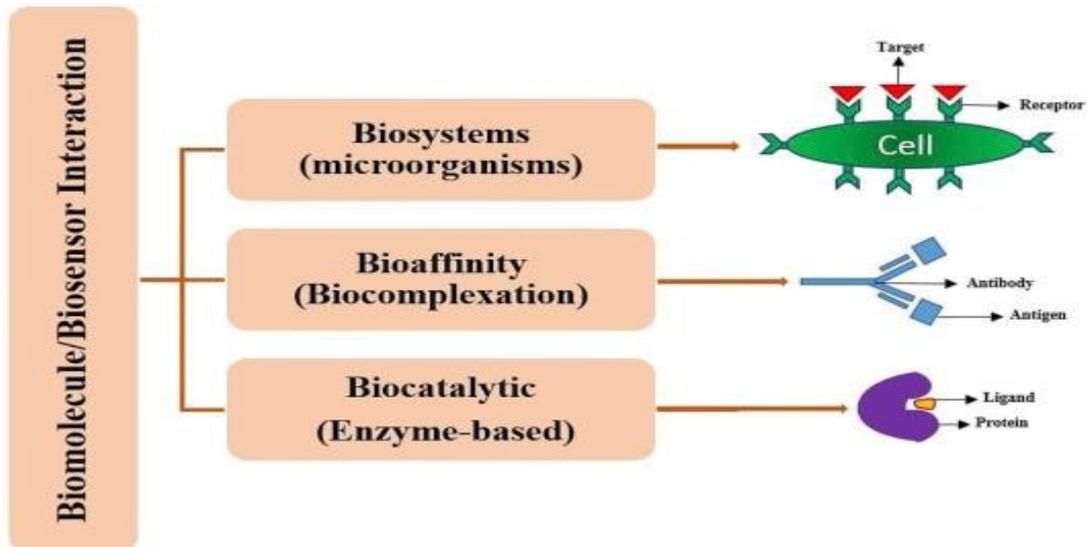


Figura 3: differenziazione dei principi utilizzati dai biosensori.

(F. Piroozmand et al 2020)

1.2.1 Biorecettori

I biosensori sono composti da una parte organica, il biorecettore e da una parte elettronica, il trasduttore. Quindi la prima suddivisione avviene in base al tipo di biorecettore o elemento sensibile.

- Enzimi
- Proteine
- Anticorpi;
- DNA/RNA;
- Aptameri;
- Intere cellule;

In base all'azione del biorecettore i biosensori si possono dividere in tre tipologie.

Sensori di affinità: quando il biorecettore si lega all'analita.

Sensori metabolici: quando il biorecettore e l'analita provocano una modificazione chimica che può essere usata per misurare la concentrazione di substrato.

Sensori catalitici: quando il biorecettore si combina con l'analita e non lo cambia chimicamente ma lo converte in substrato ausiliario.

1.2.2 Trasduttori

La seconda differenziazione che si può fare è in base al trasduttore cioè la componente elettronica che fornisce il dato analitico, che si dividono in:

Trasduttori elettrochimici: convertono i segnali biochimici risultanti dal riconoscimento dell'analita in segnali elettrici. Questo tipo di trasduttore mostra un'eccellente precisione, ripetibilità e risoluzione, ma può essere facilmente influenzato dalle variazioni di temperatura, con conseguente breve durata di conservazione.

I biosensori elettrochimici utilizzano principalmente enzimi come parte di riconoscimento a causa della specificità delle reazioni enzimatiche.

Di questi trasduttori se ne conoscono diversi tipi ma i più utilizzati sono:

- trasduttori amperometrici o voltammetrici, dove la corrente prodotta dalla differenza di potenziale tra degli elettrodi e l'analita contribuisce alla generazione di una reazione redox.

- trasduttori potenziometrici, essi misurano il potenziale di una cella elettrochimica. Il trasduttore si compone solitamente di un elettrodo (ione-selettivo) e di un elettrodo di riferimento.
- Trasduttori impedimetrici, misurano le fluttuazioni nella conduttanza di carica quando la molecola bersaglio si lega selettivamente alla superficie del sensore. Le tecniche impedimetriche sono state utilizzate per monitorare le reazioni catalizzate da enzimi o gli eventi di bioriconoscimento di cellule intere, microrganismi, anticorpi, proteine leganti specifiche ed altre tipologie di sostanze. (F. Piroozmant, et al. 2020)

Trasduttori ottici: rilevano i cambiamenti nelle lunghezze d'onda emesse e sono classificati in due gruppi: label-based (indiretto) e label-free (diretto). Il processo di rilevamento avviene utilizzando segnali luminescenti, fluorescenti o colorimetrici. Andando ad analizzare nello specifico i trasduttori a fluorescenza vediamo che, i biosensori fluorescenti utilizzano la lunghezza d'onda di emissione, durata della fluorescenza o anisotropia della fluorescenza come informazione analitica. I segnali possono essere derivati da variazioni di pH, carica, polarità o viscosità.

I trasduttori colorimetrici fanno parte di biosensori ottici che agiscono sulle basi dei cambiamenti nelle lunghezze d'onda all'interno dello spettro del visibile e hanno i vantaggi di esse molto rapidi e di essere osservati ad occhio nudo. (F. Piroozmant, et al. 2020)

Trasduttori di massa: anche detti di onde, si basano sul rilevamento del cambiamento di massa. Sensibile alla massa, i biosensori sono sensori label-free in cui le fluttuazioni di massa sono indotte dai processi di riconoscimento biologico.

Un'altra tipologia di trasduttori di massa sono i trasduttori calorimetrici o termici, che misurano le fluttuazioni entalpiche e hanno notevole potenziale nei saggi bioanalitici.

(F. Piroozmant, et al. 2020)

Tabella 1: tipologia di trasduttori

Trasduttore	Principio di utilizzo
Elettrochimici	Segnali elettici
Ottici	Segnali fluorescenti, colorimetrici e luminescenti
Massa	Cambiamento della massa

Capitolo 2

Analisi e determinazione della *Salmonella* con l'utilizzo di biosensori

La *Salmonella* è uno dei principali batteri patogeni di origine alimentare a livello globale ed è stato ritrovato in una vasta gamma di alimenti. Un microrganismo capace di provocare gravi danni a chi lo assume come ad esempio: diarrea, gastroenterite, tifo e altri sintomi. (W. Qi et al 2021).

Salmonella è una specie Gram-negativo a forma di bastoncino appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae. Contiene due principali specie, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. Attualmente sono stati identificati più di 2600 sierotipi di *Salmonella*. (E. Barilleau et al 2021)

La presenza di *Salmonella* negli alimenti è stata regolata in modo rigoroso nel corso degli anni grazie a numerose leggi e regolamenti a riguardo come, ad esempio il regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione (modificato dal n. 1441/2007) richiede l'assenza di *Salmonella* in un definito quantità di un determinato prodotto alimentare (10 o 25 g) posto sul mercato durante il periodo di validità. (Y. Shen et al 2020)

L'individuazione rapida e sensibili di questo microrganismo è una misura chiave per prevenire e controllare le malattie di origine alimentare. Allo stato attuale i metodi di rilevamento includono principalmente l'allevamento di colture su piastra, ELISA, l'acronimo di enzyme-linked immunosorbent assay (saggio immuno-assorbente legato ad un enzima), si tratta di un versatile metodo d'analisi immunologica che rientra nella categoria dei test immunoenzimatici (M. Minniti et al 2020) e la reazione a catena della polimerasi. Tuttavia, questi metodi richiedono tempo o sono carenti di sensibilità o richiedono un pretrattamento di campioni complessi. Pertanto, è urgente sviluppare un metodo semplice, rapido e sensibile per la rilevazione di *Salmonella*. (W. Qi et al 2021)

Le analisi precedentemente citate richiedono troppo tempo e personale qualificato ed è per questo che la necessità di utilizzare biosensori in questo ambito è sempre più grande.

In questo capitolo andremo ad analizzare l'utilizzo di biosensori per la determinazione di *Salmonella* su alcune matrici alimentari.

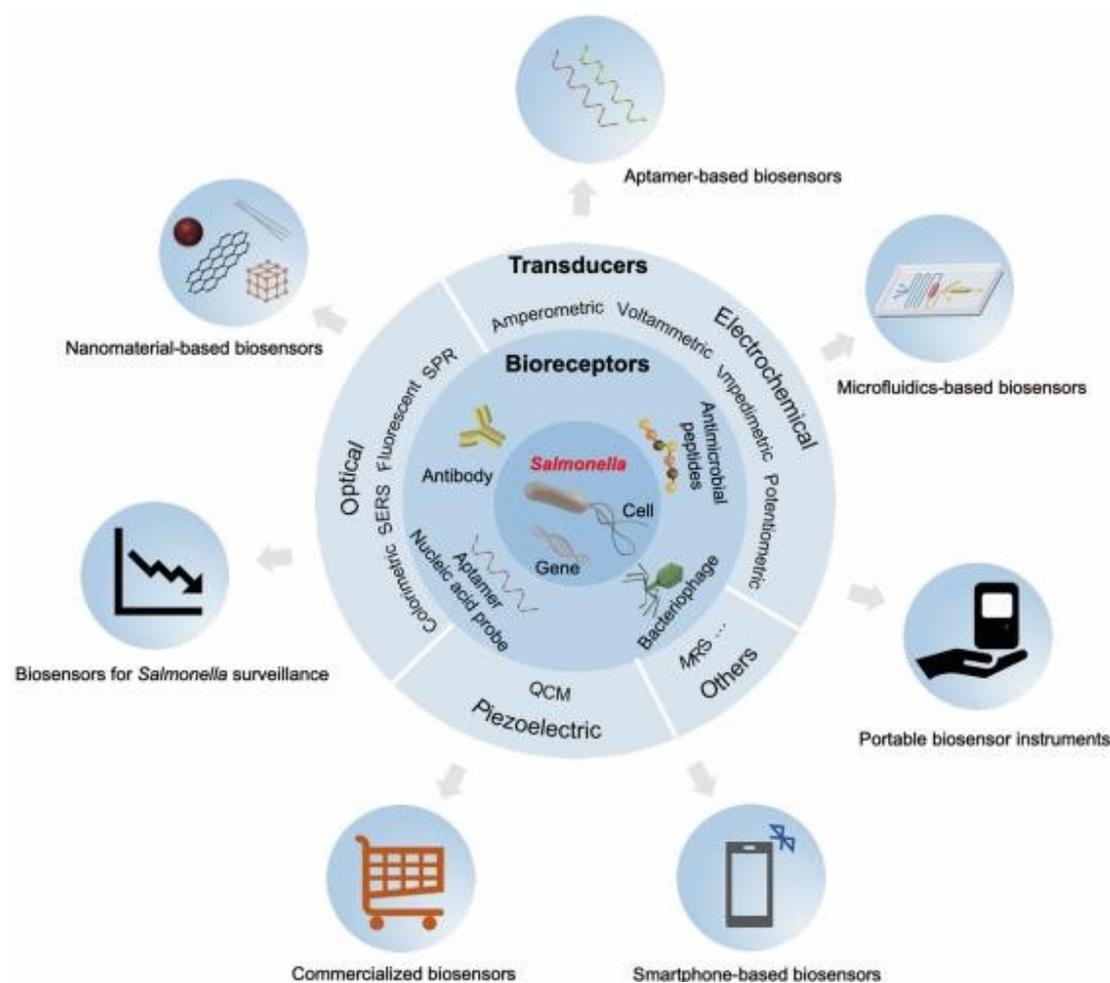


Figura 4: Panoramica schematica dei biosensori per il rilevamento della *Salmonella*

(Y. Shen et al 2020)

2.1 Materie prime analizzate

Nel mondo scientifico la presenza di *Salmonella* è stata riscontrata su molteplici alimenti come, uova crude (o poco cotte) e derivati a base di uova, latte crudo e derivati del latte crudo (compreso il latte in polvere) carne e derivati (specialmente se poco cotti) salse e condimenti per insalate.

In questa analisi sull'utilizzo dei biosensori per la ricerca di *Salmonella* si sono osservate tecniche analitiche svolte su tutti quegli alimenti in cui la *Salmonella* è in grado di sviluppare e proliferare comodamente. Considerando la capacità di determinati biosensori di lavorare su

qualsiasi tipologia di substrato, non ci sono state analisi specifiche sugli alimenti ma su componenti organiche generali caratteristiche di essi.

2.2 Strumentazione utilizzata

La strumentazione utilizzata in questo tipo di analisi consiste i determinati biosensori specifici per la ricerca di *Salmonella*, che vengono a contatto con diverse tipologie di campioni derivanti da matrici alimentari.

Nei biosensori il biorecettore ha un ruolo fondamentale, anche nelle analisi per la *Salmonella*. Per rendere specifico e sensibile il rilevamento si possono utilizzare biosensori composti da diversi tipi di biomolecole in grado di riconoscere target differenti come ad esempio, in questo caso la *Salmonella*. (Y. Shen et al 2020)

In generale i biosensori utilizzati per la ricerca di *Salmonella* sono:

Biosensori elettrochimici: questa tipologia di biosensori è dotata di un'elevata sensibilità e questa caratteristica li rende adatti per il rilevamento di *Salmonella*, inoltre sono caratterizzati dal basso costo e dalla possibilità di essere miniaturizzati. Essi si basano sulla presenza di diversi trasduttori che li suddividono in amperometrici, voltammetrici, impedimetrici e potenziometrici (Y. Shen et al 2020).

Tutti questi biosensori elettrochimici si basano su un segnale generato dal passaggio di corrente elettrica in un trasduttore specifico.

Biosensori amperometrici: questo biosensore va a misurare l'intensità di corrente che si genera sull'applicazione di un potenziale costante durante un fisso periodo di tempo. Essendo uno dei biosensori più utilizzati ha un ruolo importante anche nella determinazione di *Salmonella*. Si basano sull'interazione fra anticorpi marcati e perline immunomagnetiche (IMB) (Y. Shen et al 2020), queste IMB reagiscono efficacemente ad una data risposta immunologica, generata dall'anticorpo a contatto con *Salmonella*.

Biosensori voltammetrici: questi monitorano le variazioni di corrente sotto potenziali variabili. Questo monitoraggio avviene nel momento in cui le cellule batteriche si attaccano alla superficie dell'elettrodo. Spesso per l'ibridazione di un DNA bersaglio si utilizzano sonde di DNA immobilizzato, basate su diverse tecniche di rilevamento come il ciclico di voltammetria e voltammetria differenziale a impulsi (Y. Shen et al 2020).

Biosensori impedimetrici: misurano le variazioni di un campo elettrico. Più precisamente vanno a misurare il grado di impedenza, cioè una grandezza elettrica che misura la facilità con cui una corrente alternata passa in un circuito elettrico; è pari al rapporto tra la tensione applicata ai capi del circuito e l'intensità della corrente che vi scorre e si misura in ohm. Molto utilizzati per la *Salmonella* dato che sono dotati anche di minor tempo di analisi, maggiore sensibilità e potenziale di miniaturizzazione (Y. Shen et al 2020).

Biosensori potenziometrici: utilizzano un voltmetro ad impedenza elevata per misurare la differenza di potenziale elettrico e forza elettromotrice tra il lavoro e il riferimento degli elettrodi sotto un flusso di corrente nullo o trascurabile. Per fare questo si utilizza un metodo potenziometrico basato su un microelettrodo a membrana polimerica selettiva al cadmio che viene utilizzato come microelettrodo specifico per *Salomonella* (Y. Shen et al 2020).

Biosensori ottici: questi biosensori sono in grado di convertire le interazioni dei biorecettori con i loro bersagli in segnali ottici misurabili tramite l'utilizzo di un dispositivo che comprende un trasduttore. Offrono la possibilità di analisi in situ perché consentono la quantificazione in tempo reale e consentono il rilevamento non distruttivo del segnale (W. Tao et al 2021). Nello specifico i biosensori ottici, specifici per *Salmonella*, si possono dividere in diversi tipi, ad esempio biosensori colorimetrici, a diffusione Raman potenziata in superficie (SERS), fluorescenti e a risonanza plasmonica superficiale (SPR) e basati su diversi meccanismi ottici di trasduzione del segnale (Y. Shen et al 2020).

Biosensori colorimetrici: sono stati ampiamente studiati su due basi principali, la prima riguarda le caratteristiche ottiche intrinseche delle nanoparticelle e la seconda riguarda il cambiamento di colore originato da enzimi o reazioni chimiche. Sono molto utili per il rilevamento di *Salmonella* causa dei loro vantaggi di risposta rapida, funzionamento semplice e non c'è bisogno di apparati complicati (Y. Shen et al 2020).

Biosensori a base microfluidica: comprende principalmente due parti: un chip microfluidico e un dispositivo portatile. Il chip è costituito principalmente da tre parti: un miscelatore vibrante attivo per una miscelazione efficiente degli MNB (nanosfere magnetiche immunoglobuliniche), il campione e MOF (metal-organic framework), un canale di

incubazione a serpentina per sufficiente formazione dei complessi sandwich MNB Salmonella-MOF, ed in fine una camera multifunzionale per la separazione magnetica dei complessi (W. Qi et al 2021).

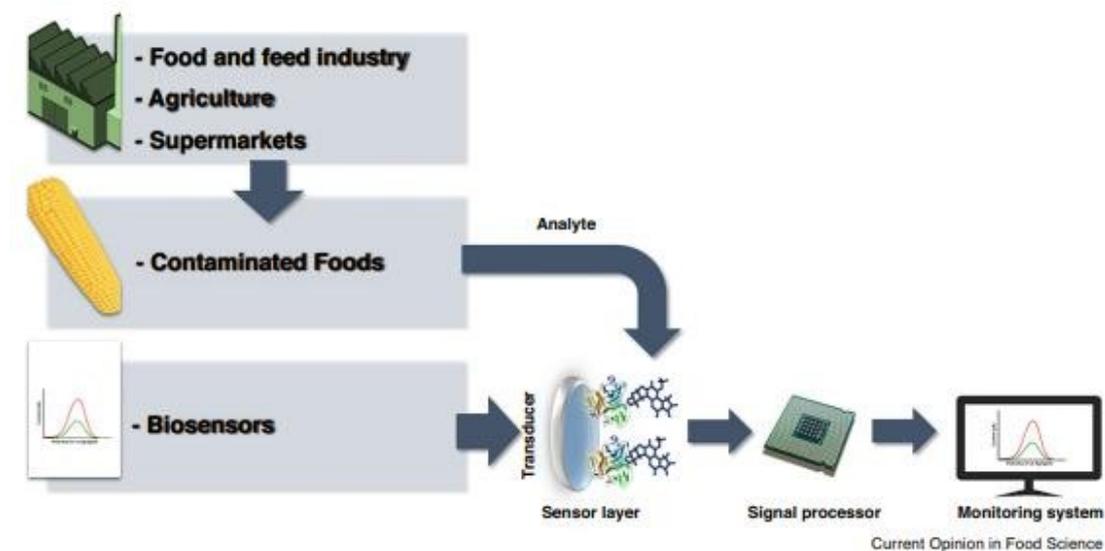


Figure 5: processo, dalla produzione al dato analitico.

(I. S. Oliveira et al 2019)

2.3 Tipologia di analisi e metodica utilizzata

Le metodiche della analisi svolte tramite l'utilizzo dei biosensori per la ricerca di *Salmonella* sono tuttora sperimentali dato che i biosensori come strumento sono una nuova tecnologia. Spesso le analisi venivano svolte su campioni pretrattati con *Salmonella* o direttamente sul microrganismo stesso. In questa parte di capitolo andremo ad analizzare le fasi di alcune metodiche utilizzate per la determinazione di *Salmonella*.

- Pretrattamenti dei substrati:

il pretrattamento del campione è una parte fondamentale per i biosensori dedicati alla *Salmonella*, nei campioni alimentari si mira a ridurre anche la complessità delle matrici alimentari e ad aumentare la concentrazione di batteri bersaglio. (Y. Shen et al 2020)

Un esempio è il pretrattamento di campioni di latte, addizionati con tre diverse concentrazioni di *Salmonella typhimurium* e tre diverse concentrazioni di una soluzione di

miscela contenente *Escherichia coli*, diluiti in precedenza in PBS (tampono fosfato salino). (F. Malvano et al 2020).

- Tecniche analitiche

Le tecniche analitiche utilizzate per la ricerca di *Salmonella* tramite biosensori sono molteplici. In questo paragrafo vengono approfondite tecniche che usano biosensori a base microfluidica.

-Biosensori a base microfluidica: andando a studiare due analisi differenti, che utilizzano entrambe questo biosensore osserviamo che, nella prima il rilevamento ottico ed elettrochimico sono spesso integrati a dispositivi microfluidici per il rilevamento di *Salmonella*. (Y. Shen et al 2020)

La metodica attuata in questo caso dice che il chip microfluidico consiste in una zona di separazione con fili di nichel e una zona di rilevamento con motivi in nichel. Gli agenti patogeni bersaglio sono catturati da nanosfere immunomagnetiche (MNB) e sono separati usando una forza magnetica laterale successivamente sono intrappolati tra modelli di nichel, a causa della forte forza magnetica tra questi modelli di nichel.

Dopo di che avviene l'etichettatura con QD cioè tramite l'utilizzo dei punti quantici, meglio conosciuti come quantum dots, che consistono in nanoparticelle di materiali semiconduttori con eccellenti proprietà spettroscopiche. Tramite l'etichettatura con QD è stato possibile rilevare nel latte, *S. Typhimurium* con una concentrazione di $5,4 \times 10^3$ UFC/ mL per campione.

Sono stati utilizzati dei biosensori a base microfluidica d'impedenza per la determinazione rapida di diversi sierotipi di *Salmonella* spp nei prodotti avicoli.

I campioni di pollame vengono iniettati nel biosensore attraverso l'ingresso principale, dove le cellule batteriche percorrono la regione di rilevamento spinte da una forza di troforesi dielettrica positiva. In fine il campione entra in contatto con gli anticorpi, specifici per *Salmonella*, generando il segnale che verrà rilevato. Questo biosensore ha consentito il rilevamento sensibile di *Salmonella* a 7 cells / mL in 40 min. (Y. Shen et al 2020)

Nella seconda analisi invece si va ad utilizzare una tecnica di rilevazione per la *Salmonella* differente dalla precedente.

Il campione su cui viene fatta l'analisi è della carne di pollo arricchita con microorganismi bersaglio, in questo caso cellule di *Salmonella*.

La prima fase è quella di sottoporre 25g di campione con 225ml di terreno di arricchimento allo stomacher in modo da omogenizzare la carne. L'analisi viene svolta su campioni in cui sono state aggiunte diverse concentrazioni di *Salmonella typhimurium* che vanno da $1,6 \times 10^1$ – $1,6 \times 10^6$ UFC / mL. Lo step successivo consiste nell'utilizzo del biosensore microfluidico sui campioni precedentemente descritti. Per rilevare una concentrazione sconosciuta di microorganismi è stata stabilita una curva tra assorbanza e il logaritmo della concentrazione batterica. Prima di tutto sono stati preparati gli MNB immuni. La composizione finale della miscela utilizzata consiste in 500 μ L del campione batterico a ciascuna concentrazione ($1,5 \times 10^1$ – $1,5 \times 10^7$ UFC / mL), 20 μ g degli MNB immuni (in 500 μ l di acqua deionizzata) e 80 μ g di MOF immuni (in 500 μ l di acqua deionizzata) simultaneamente iniettato nel chip microfluidico a una velocità di flusso di 30 μ L / min, rispettivamente, seguito da miscelazione nel miscelatore, utilizzato per miscelare rapidamente le soluzioni e migliorare l'elaborazione delle immagini con maggior sensibilità. In seguito, avviene l'incubazione all'interno del canale serpentino, con conseguente formazione del complesso MNB-Salmonella-MOF (W. Qi et al 2021).

Dopo questa fase tramite lavaggio con acqua deionizzata vengono rimossi tutti i MOF non legati, mentre i complessi formati sono legati nella camera multifunzionale ed il motore vibrante viene posto sotto la camera per migliorare la reazione catalitica per 15 min.

In fine un particolare computer il Raspberry Pi camera va ad analizzare i dati generati e a determinare la concentrazione batterica.

Con questa metodica si è riuscito a rilevare *Salmonella typhimurium* a partire da 14 UFC / mL in 1 ora (W. Qi et al 2021).

2.4 Risultati e Conclusioni

In conclusione, i biosensori si sono rivelati uno strumento molto utile per il rilevamento dei *Salmonella* su matrice alimentare, grazie alla versatilità delle varie tipologie di biosensori che possono essere utilizzati per le analisi.

I biosensori hanno permesso il rilevamento di *Salmonella* principalmente su carni avicole sfruttando i diversi principi generando valori accettabili e con velocità.

Entrambe le metodologie rappresentate che utilizzano un biosensore a base microfluidica si sono rivelate molto efficienti per la determinazione di *Salmonella* negli alimenti. Sono stati utilizzati gli stessi principi ma con rilevatori finali differenti.

Tabella 2

Tabella riportante i risultati del metodo 1 e del metodo 2, analisi *Salmonella*

	Biosensore	Matrice alimentare	Recettore	Rivelatore	Quantità rilevata su tempo
Metodo 1	microfluidico	Alimenti derivanti dal pollo	anticorpi		7 cellule / mL in 40 min
Metodo 2	microfluidico	Carne di pollo	Quantum dots (QD)	Raspberry Pi	14 UFC / mL in 1 ora

Capitolo 3

Biosensori utilizzati per la determinazione di tossine in ambito alimentare

L'espansione del commercio globale ha accresciuto la consapevolezza dei consumatori sui rischi generati dalla presenza di tossine negli alimenti, rendendo necessari vari e severi requisiti di sicurezza e qualità.

Di conseguenza, le autorità di tutto il mondo hanno istituito rigide normative per regolare il livello di tossine negli alimenti.

Le tossine microbiche presenti nelle matrici alimentari possono essere classificate in tre tipi:

- (1) micotossine (es. aflatossine, zearalenone, citrinina, fumonisine e patulina),
- (2) tossine batteriche (es. colera, ricina e enterotossina stafilococcica),
- (3) tossine algali.

(R. Gupta et al 2021)

Le tossine microbiche di qualsiasi tipologia sono un grande problema in ambito alimentari, dato che se ingerite possono causare numerose malattie di diverso tipo, come intossicazioni scaturite dall'assunzione di alimenti contaminati. Le tossine più comuni che si possono trovare negli alimenti sono le micotossine essendo le più abbondanti in natura.

Le micotossine presenti negli alimenti sono prodotti funghi appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. (J. Kochman et al 2021)

Le micotossine presenti in natura sono in genere molto resistenti ai trattamenti o anche alle diverse situazioni ambientali, influenzano una varietà di raccolti molto vasta, queste tossine pericolose possono anche raggiungere gli esseri umani tramite latte, uova e carne che possono fungere da vettori di trasporto di tossine dopo essere stati contaminati. (I.S. Oliveira et al 2019).

La necessità di andare a prevenire la proliferazione di tossine e l'eliminazione di esse dagli alimenti ha reso sempre più numerose le tecniche analitiche per la determinazione delle tossine di tutti i tipi. Fra queste analisi spiccano anche i biosensori come nuova tecnologia utilizzata per questo tipo di analisi.

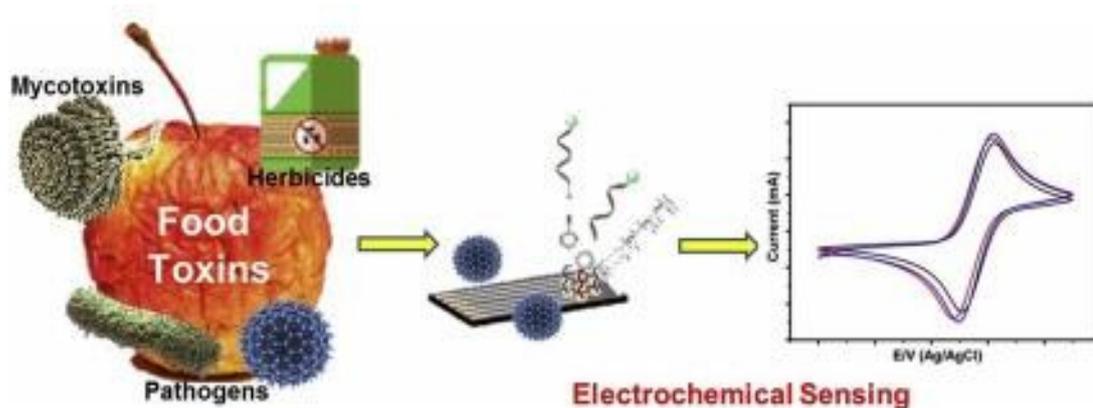


Figura 6: Dalla tossina al dato analitico.

(R. Gupta et al 2021)

3.1 Materie prime analizzate

Nel caso della ricerca di tossine e micotossine, le materie prime di origine alimentare, sottoposte alle analisi sono di vario genere e tipo. La vastità dei campioni alimentari utilizzati è data dal fatto che le tossine, ad esempio, sono prodotte da diverse tipologie di microorganismi che proliferano su differenti alimenti.

Allo stesso modo le micotossine provenienti da funghi si depositano e crescono su altrettante tipologie di alimenti. Per questo non si possono definire delle categorie di alimenti sottoposti a queste analisi.

3.2 Strumentazione utilizzata

Gli strumenti utilizzati in questo tipo di analisi, fra tutti i biosensori precedentemente citati, sono principalmente i biosensori elettrochimici, nello specifico biosensori impedimetrici. Come nel caso di altre analisi oltre ai biosensori elettrochimici per la determinazione di tossine e micotossine vengono utilizzati anche biosensori potenziometrici e biosensori amperometrici che fanno comunque parte dei biosensori elettrochimici.

Sono usati anche biosensori ottici con sensori di fluorescenza e biosensori piezoelettrici, quest'ultimi sono basati su un trasduttore formato da un cristallo di quarzo placcato in oro, quando avviene il riconoscimento della molecola la superficie porta a un cambiamento di massa e vibrazioni specifiche generando un segnale elettrico che viene inviato attraverso il

cristallo di quarzo, inducendolo cambiamenti nella frequenza di risonanza. (I.S. Oliveira et al 2019)

Naturalmente oltre alle analisi che sfruttano i biosensori sono utilizzate da anni analisi normate da autorità europee come, metodi basati su colture, test immunologici e metodi molecolari basati su PCR. Metodi questi ultimi con molti limiti come lentezza e difficoltà di preparazione dei campioni. (R. Gupta et al 2021)

3.3 Tipologia di analisi e metodica utilizzata

In questo capitolo andremo a vedere lo svolgimento di analisi che sfruttano biosensori per la ricerca di determinate tossine su diverse matrici alimentari, in particolare una micotossina e due aflatossine (descrizione).

In primis si è visto come la tecnica della spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) si presenta come uno strumento utile per l'identificazione delle micotossine e per monitorare i cambiamenti che si verificano nell'interfaccia originata tra una superficie dell'elettrodo modificata da una piattaforma nanostrutturata a contatto con una sonda redox. (I.S. Oliveira et al 2019)

L'EIS presenta come parametro principale i valori di resistenza al trasferimento di carica strettamente correlata ad un evento che si crea come ad esempio: l'immobilizzazione di micotossine o la reazione generata tra il contatto tra un anticorpo e un antigene.

Per la rilevazione di AFB1, un tipo di aflatossina chiamata aflatossinaB1, viene utilizzato un immunosensore impedimetrico composto da nanofibre di polianilina (PANI) rivestite con AuNP (nano particelle d'argento) in elettrodi a disco di ossido di indio e stagno molto sensibili a AFB1 nel mais. (I.S. Oliveira et al 2019)

Il principio dell'analisi si basa sull'interazione fra un anticorpo specifico e il suo antigene specifico.

Andando a monitorare i valori di impedenza da EIS l'aflatoxina AFB1 è stata rilevata con un intervallo lineare di 0,1–100 ng / mL 1 e LOD di 0,05 ng / mL 1.

Nella second analisi si va a ricercare PAT (micotossina Patulina) cioè un tipo di micotossina contenuta nel succo di mela.

Il componente fondamentale di questa analisi sono gli aptameri (descrizione) composti dagli oligonucleotidi a filamento singolo (RNA o DNA) e che possono legarsi con elevata specificità per un'ampia gamma di obiettivi, tra cui micotossine e funghi tossigeni (I.S. Oliveira et al 2019)

Gli aptameri hanno il vantaggio di essere molto più economici rispetto all'utilizzo degli anticorpi e gli aptameri sono più facili da rilevare dalle piattaforme di rilevamento biologico. Un recente studio ha mostrato l'uso di aptameri per la rilevazione di PAT nel succo di mela a cui si accede da EIS (spettroscopia di impedenza elettrochimica). L'assemblaggio dell'anti-PAT-aptamero cioè un complesso formato da un aptamero un anticorpo e PAT, sulla superficie degli elettrodi d'oro serigrafati (AuSPE) abilitato il rilevamento di PAT con alta sensibilità con un LOD e un LOQ rispettivamente di 2,8 ng / L e 4,0 ng / L. (I.S. Oliveira et al 2019)

Si è visto che l'utilizzo di un rivelatore impedimetrico può essere utilizzato anche per la determinazione di AFM1 (aflatossina M1), un tipo di micotossina presente negli alimenti. In questa analisi come in quella precedente si sfruttano degli aptameri che con la presenza di anticorpi formano il complesso dell'anti-AFM1 aptamer. Con questo metodo si sono ottenuti dei valori con intervallo dinamico di 2–150 ng L⁻¹ con un LOD di 1,15 ng L⁻¹. (I.S. Oliveira et al 2019)

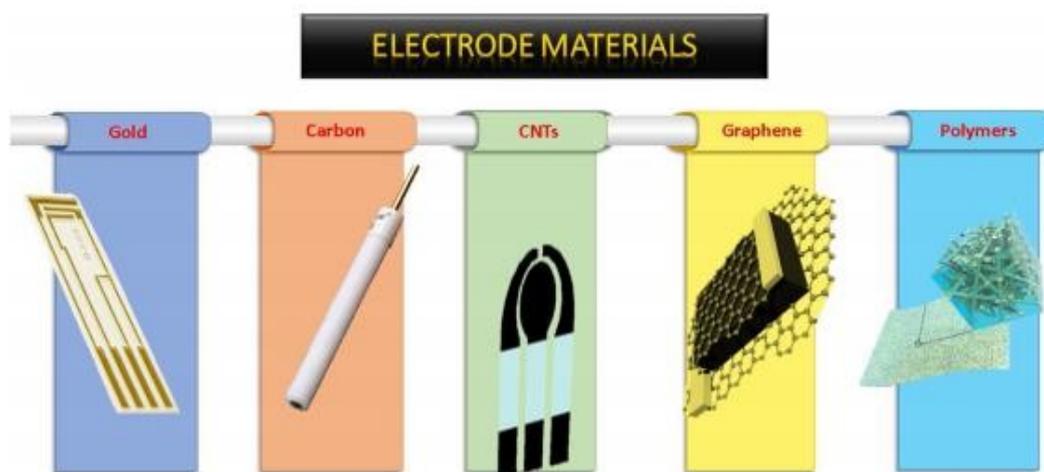


Figure 7: schema che mostra una varietà di materiali per elettrodi utilizzati per la costruzione di biosensori

(R. Gupta et al 2021)

Table 3**Examples of biosensors developed for detection and quantification of mycotoxins**

Mycotoxin	Recognition element	Transducer/technique	Matrix	LOD	Reference
AFB1	Aptamer	Fluorescence (FRET)	Maize and wheat	0.0004 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[132]
AFB1	Antibody	Impedimetric (CV/EIS)	Corn flour	0.79 pg g^{-1}	[62]
AFB1	Organic framework composite	Piezoelectric (QCM)	Peanut, pistachio, rice, and wheat	2.8 pg mL^{-1}	[95]
AFB1	Antibody	Impedimetric (EIS)	Corn	0.05 ng mL^{-1}	[63]
AFB1	Antibody	Piezoelectric (QCM)	x	1.625 ng mL^{-1}	[98]
AFB1	Antibody	Piezoelectric (QCM)	Peanut	0.83 ng kg^{-1}	[133]
AFB1	Antibody	Potentiometric (DPV)	Corn powder	3.5 pg mL^{-1}	[71]
AFB1 AFB2	Aptamer	Optical (SPR)	Vinegar	0.19 ng mL^{-1}	[86]
Citrinin	Antibody	Fluorescence (FRET)	Human serum	0.1 pM	[92]
Cyclopiazonic acid	Antibody	Optical (SPR)	Maize and cheese	0.29 ng mL^{-1}	[134]
DON ZEN T-2 toxin	Antibody	Optical (SPR)	Wheat	15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 24 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[85]
Fumonisin B1	Aptamer	Impedimetric (EIS)	Maize	2 pM	[135]
HT-2 toxin T-2 toxin AFM1	Antibody	Amperometric	Human urine	0.4 ng mL^{-1} 1 ng mL^{-1} 0.3 ng mL^{-1}	[136]
OTA	Aptamer	Impedimetric (EIS)	Grape and commodities	0.030 ng mL^{-1}	[137]
OTA	Aptamer	Amperometric (CV)	Red wine	0.23 pg mL^{-1}	[138]
OTA	Antibody	Piezoelectric (QCM)	Red wine	0.16 ng mL^{-1}	[139]
OTA	Antibody	Optical (SPR)	Coffee	3.8 ng mL^{-1}	[140]
OTA	Aptamer	Impedimetric (EIS)	Fruit juice	5.2 fg mL^{-1}	[141]
OTA	Black phosphorene	Potentiometric (DPV)	Grape juice and red wine	0.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[142]
OTA	Antibody	Piezoelectric (QCM)	x	17.2 ng mL^{-1}	[99]
OTA AFM1	Antibody	Potentiometric (CV)	Red wine and milk	0.15 ng mL^{-1} 3.04 ng mL^{-1}	[70]
PAT	Aptamer	Potentiometric (EIS/DPV)	Juice	0.27 pg mL^{-1}	[143]
PAT	Aptamer	Impedimetric (EIS)	Apple juice	2.8 ng L^{-1}	[66]
Sterigmatocystin	Soybean peroxidase enzyme	Amperometric	Corn	2.3 nM L^{-1}	[75]
T-2 toxin	Aptamer	Fluorescence (FRET)	Maize and wheat	0.93 pg mL^{-1}	[93]
T-2 toxin	Antibody	Optical (SPR)	Wheat	1.2 ng mL^{-1}	[144]
ZEN	Aptamer	Amperometric (CV/DPV)	Maize	0.17 pg mL^{-1}	[145]
ZEN	Antibody	Amperometric (CV/DPV)	Corn and corn products	1.5 pg mL^{-1}	[76]
ZEN	Antibody	Impedimetric (capacitive)	x	1.9 pg mL^{-1}	[146]
ZEN	Aptamer	Potentiometric (CV/DPV)	Maize	0.105 pg mL^{-1}	[72]

Figura 8: tabella riportante esempi di biosensori specifici per tossine, e rispettivi dati analitici.

(I.S. Oliveira et al 2019)

3.4 Risultati e Conclusioni

In conclusione, l'avvento dei biosensori è stato molto utile per la rilevazione di tossine e micotossine di varie tipologie.

Biosensori che hanno rivoluzionato il mondo della analisi sugli alimenti soprattutto nell'ambito delle tossine che sono e restano ancora in parte, un problema molto grande dati tutti i danni che possono riportare negli organismi che le assumono tramite gli alimenti.

Nelle analisi riportate nel paragrafo precedente si è osservato principalmente l'utilizzo di biosensori elettrochimici di natura impedimetrica, accoppiati all'utilizzo di sostanze selettive come anticorpi o aptameri.

Osserviamo ora i dati analitici risultanti dai test precedentemente citati.

Tabella 3: risultati analisi sulle tossine

	Tossina	Biorecettore	Trasduttore	Matrice alimentare	LOD
Analisi 1	AFB1	Anticorpo	Impedimetrico	Masi	0,05 ng mL
Analisi 2	PAT	Aptamero	Impedimetrico	Succo mela	4,0 ng L
Analisi 3	AFM1	Anticorpo	Impedimetrico	Generica	1,15 ng L

In fine le Tecniche di laboratorio convenzionali rimangono i metodi di prima scelta per rilevare le micotossine a causa della loro affidabilità, sensibilità e sono in grado di determinare diversissimi tipo di analiti.

Ma i biosensori si dimostrano ancora una tecnica analitica in grado di essere molto efficiente e precisa anche se ancora sperimentale.

Capitolo 4

Biosensori utilizzati per il riconoscimento e la determinazione di antibiotici negli alimenti

Gli antibiotici sono un gruppo di composti antimicrobici molto utili impiegati in medicina umana e veterinaria per trattare molte malattie infettive. Gli antibiotici veterinari sono originariamente utilizzati negli animali per il trattamento e la prevenzione delle malattie e vengono gradualmente aggiunti all'alimentazione per controllare il ciclo riproduttivo, prestazioni di allevamento e anche come profilassi e crescita promotori, che supera di gran lunga la loro applicazione come terapia animale attualmente (M. Majdinasab et al 2020). L'utilizzo eccessivo degli antibiotici porta ad un accumulo degli stessi nell'organismo ed in seguito ad una notevole perdita d'efficienza degli antibiotici stessi. La perdita dell'efficienza antibiotica si traduce in oltre 700.000 decessi annuali in tutto il mondo e fino a 10 milioni di morti nel mondo entro il 2050. A parte la salute umana, la contaminazione da antibiotici di carne e latte possono causare perdite economiche a causa di malattie indesiderate (T. Kulikova et al 2020).

Per mantenere il cibo in sicurezza e tutelare la salute dei consumatori, i limiti massimi dei residui di antibiotici (LMR) sono stati fissati dall'Unione Europea (UE); Ad esempio il valore LMR di L'SDM nella carne è di 100 µg/L. (A. Mohammad-Razdaria et al 2019)

I metodi tradizionali per l'analisi degli antibiotici richiedono, metodi come: cromatografia liquida (HPLC), gascromatografia, elettroforesi capillare, spettroscopia Raman con superficie migliorata e spettroscopia di mobilità ionica. Per essere sensibili e selettive queste tecniche analitiche richiedono attrezzature costose e sofisticate, personale ben addestrato e un trattamento dei campioni che richiede tempo e manodopera. Le tecnologie dei biosensori invece offrono alternative ai complicati pretrattamenti dei campioni e al rilevamento di alti livelli di contaminazione in maniera più facile e veloce (T. Kulikova et al 2020).

Quando si rilevano residui di antibiotici negli alimenti e campioni biologici, i biosensori non solo mantengono i vantaggi di alta specificità e sensibilità con un semplice dosaggio, ma

sono anche ultraportatili. Pertanto, i biosensori sono stati ampiamente utilizzati nel monitoraggio in tempo reale residui di antibiotici (C. Zhou et al 2021).

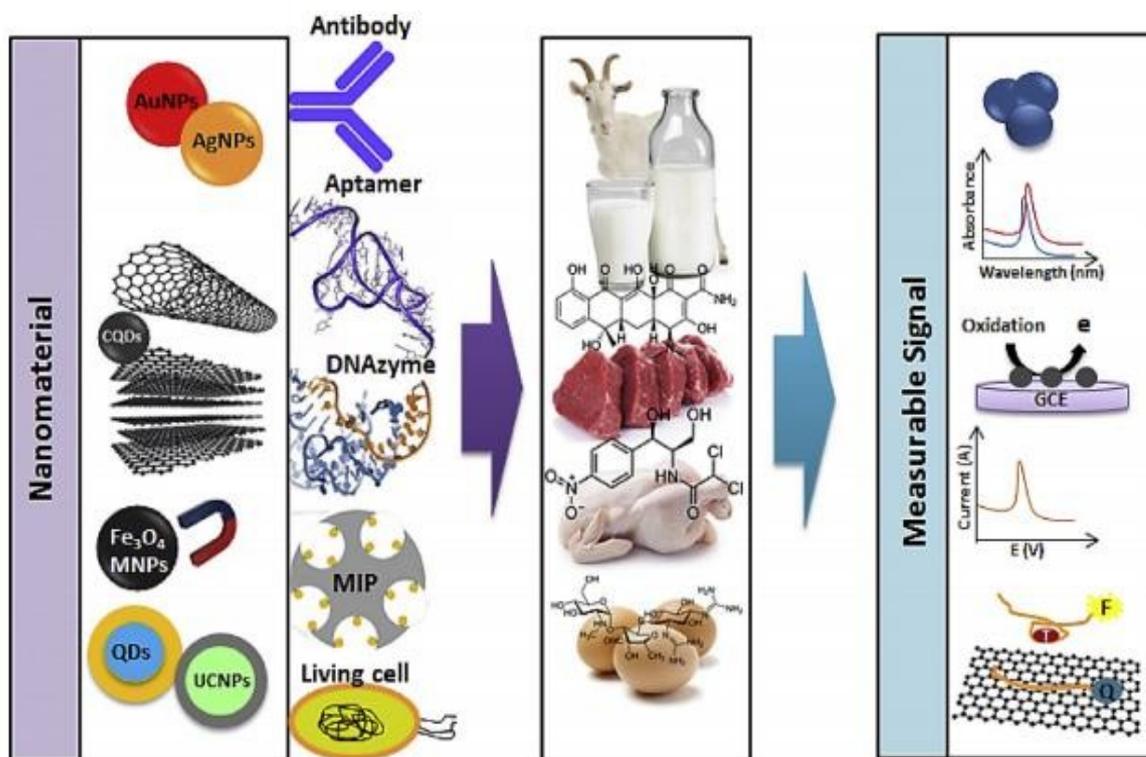


Figura 9: Illustrazione schematica dell'applicazione di vari nanomateriali ed elementi di bioriconoscimento nello sviluppo di biosensori antibiotici. (M. Majdinasab et al 2020).

4.1 Materie prime analizzate

Le materie prime alimentari analizzate in questo capitolo sono principalmente alimenti in cui è più probabile la presenza di antibiotici.

Come già detto in precedenza, gli alimenti che possono contenere antibiotici sono alimenti di origine animale dato che gli animali da allevamento, soprattutto negli ultimi anni, subiscono spesso trattamenti antibiotici sempre più massicci e invasivi.

Gli animali accumulano nel loro organismo questi antibiotici che poi ritroveremo nei prodotti come ad esempio: carne di manzo, carne di pollo, latte, uova, pesce e molti altri alimenti di origine animale.

4.2 Strumenti utilizzati

Uno dei componenti più cruciali di un biosensore è il biorecettore che può fornire un sensibile e selettivo processo di rilevamento. In questa sezione, diversi tipi di biorecettori inclusi anticorpi, aptameri, DNAzyme, MIP e cellule, utilizzati vengono introdotti all'interno di biosensori per antibiotici (C. Zhou et al 2021).

I biosensori che vengono utilizzati più spesso per il rilevamento degli antibiotici negli alimenti sono, biosensori voltammetrici, in analisi che sono state condotte in modalità a corrente continua (T. Kulikova et al 2020), biosensori elettrochimici (EIS) utilizzando un potenziostato/galvanostato collegato a un laptop dotato di un software specifico (A. Mohammad-Razdaria et al 2019).

Oltre a questi tipi di biosensori anche i biosensori ottici sono ampiamente utilizzati per la rilevazione di antibiotici a causa della loro sensibilità e specificità. Questi sono basati sulla modifica delle caratteristiche ottiche quando l'analita bersaglio si lega in modo specifico al biorecettore. In questo caso, la luce viene misurata come segnale di rilevamento (M. Majdinasab et al 2020).

4.3 Tipologia di analisi e metodica utilizzata

Una delle principali metodologie analitiche sfrutta l'utilizzo di aptameri che come già detto in precedenza sono, oligonucleotidi a filamento singolo che possono essere prodotto da un processo chimico piuttosto che da un processo biologico (M. Majdinasab et al 2020).

Una metodica analitica che utilizza gli aptameri come biorecettori di biosensori è il rilevamento di kanamicina nel latte.

La kanamicina è un antibiotico utilizzato nel trattamento delle infezioni causate principalmente da batteri Gram-negativi.

Il biosensore aptamerico è stato fissato capovolto e 2 μ l della soluzione del farmaco sono stati posti sulla sua superficie. L'elettrodo è stato tappato con un tubo di plastica per evitare l'essiccazione e lasciato per 20 min. Poi, è stato lavato con acqua deionizzata e sono state eseguite le misurazioni EIS. I campioni addizionati di latte o yogurt sono stati prima termostati a 40 °C per 30 min, quindi diluiti con metanolo in rapporto 1:3 v/v e centrifugato a 5000 rpm per 5 min. Il surnatante è stato separato dal sedimento e diluito 10 volte con un tampone fosfato (PB). Il biosensore è stato incubato per 20 min ed è stata studiata la sua prestazione analitica (T. Kulikova et al 2020).

Un'altra metodica analitica che sfrutta i biosensori ed in particolare gli aptameri è la ricerca di sulfadimetossina (SDM), un medicinale veterinario a base del principio attivo Sulfadimetossina, appartenente alla categoria dei Sulfamidici e nello specifico Sulfonamidi e si trova principalmente nelle carni.

Il rilevamento della SDM è stato effettuato utilizzando i parametri ottimizzati. Il biosensore aptamerico fabbricato è stato immerso in una soluzione di SDM con diverse concentrazioni (da $1,0 \times 10^{-15}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ M) per 50 minuti. Dalla risposta dell'EIS si è osservato che aumentando la concentrazione di SDM, il diametro del semicerchio diventa più grande, semicerchio che include la resistenza al trasferimento di elettroni e l'intervallo lineare della sezione corrisponde al processo di diffusione a una frequenza inferiore, che è correlato al valore della resistenza al trasferimento di carica (R_{ct}). In condizioni ottimali, il biosensore qui proposto è stato utilizzato per rilevare SDM a varie concentrazioni. A tal fine, EIS è stato impiegato per preparare una curva di calibrazione tracciando ΔR_{ct} (R_{ct} in presenza di SDM – R_{ct} in assenza di SDM) Vs la concentrazione logaritmica di SDM. Quando la concentrazione di SDM è aumentata da 10^{-15} a 10^{-5} M, ΔR_{ct} è aumentato. La curva di calibrazione di

il biosensore fabbricato indicava un intervallo di concentrazione lineare da

Da $1,0 \times 10^{-15}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ M.

Rispetto ad altri aptasensori, il biosensore fabbricato ha realizzato un LOD inferiore con una risposta impedimetrica, offrendo un metodo relativamente sensibile per il rilevamento di SDM. (A. Mohammad-Razdaria et al 2019).

Method sensing	Dynamic range (M)	LOD (M)
label-free aptasensor	1.6×10^{-7} - 3.2×10^{-6}	1.6×10^{-7}
colorimetric aptasensor	3.2×10^{-9} - 1.6×10^{-6}	2.2×10^{-9}
photoelectrochemical aptasensor	$(0.5-80) \times 10^{-9}$	0.1×10^{-9}
upconversion aptasensor	3.2×10^{-9} - 3.2×10^{-8}	3.5×10^{-10}
photoelectrochemical aptasensing	$(0.1-120) \times 10^{-9}$	3×10^{-11}
amperometric aptasensor	3.2×10^{-14} - 3.2×10^{-8}	3.2×10^{-14}
impedimetric aptasensor	1.0×10^{-15} - 1.0×10^{-5}	3.7×10^{-16}

Figura 10: Alcuni metodi di rilevamento basati su biosensori aptamerici per la determinazione di SDM. (A. Mohammad-Razdaria et al 2019).

4.4 Risultati e Conclusioni

Di recente, il monitoraggio dei residui di farmaci antimicrobici (cioè gli antibiotici) negli alimenti è diventato una delle principali preoccupazioni al fine di produrre un alimento sicuro. Ad oggi molti approcci analitici sono stati sviluppato per rilevare i residui di farmaci antimicrobici negli alimenti prodotti (M. Majdinasab et al 2020).

Promettentemene, i biosensori possono essere semplicemente utilizzati per rilevare altri analiti modificando la sequenza dell'aptamero, indicando un grande potenziale nella fabbricazione di aptasensori per la sicurezza monitoraggio dei prodotti alimentari.

Anche nel settore degli antibiotici quindi i biosensori si sono rivelati una scelta ottimale e una tecnica analitica affidabile.

Conclusioni

Concludendo in questa analisi abbiamo visto che i biosensori sono strumenti con un elevato potenziale in ambito analitico. Il biorecettore, può essere composta da varie tipologie di sostanze come ad esempio: aptameri, anticorpi, DNA, enzimi, proteine e molto altro, i trasduttori si basano su diversi principi ed in base al principio di funzionamento si possono dividere in: trasduttori voltammetrici, impedimetrici, elettrochimici, ottici e molti altri.

Questa diversità di composizione di ogni biosensore rende questo strumento utile in moltissimi ambiti scientifici compreso quello alimentare.

I biosensori possono essere utili per la determinazione di moltissimi composti chimici, microorganismi e funghi, tutto caratterizzato dalla peculiarità fondamentale di questi biosensori cioè l'estrema velocità di risposta delle analisi, insieme all'elevata sensibilità e precisione.

Nei paragrafi precedentemente descritti si è visto come l'utilizzo di determinati biosensori in diversi settori del campo alimentare abbiano facilitato e migliorato i risultati di analisi che normalmente vengono effettuate con metodiche che già conosciamo da anni, che danno risultati meno precisi in tempi molto più lunghi.

I biosensori hanno però il difetto di essere ancora strumenti sperimentali tecniche innovative che hanno bisogno ancora di tempo per poter essere utilizzate al meglio.

In molte analisi condotte su alimenti con l'utilizzo dei biosensori sono stati utilizzati campioni di alimenti precedentemente analizzati con altri metodi analitici, in modo da avere dei risultati su cui basare le analisi condotte con i biosensori.

In fine i biosensori sono degli strumenti che grazie alle loro doti potranno migliorare nettamente il mondo dell'industria e delle analisi in ambito alimentare, andando a salvaguardare la vita dei consumatori contribuendo sempre di più alla sicurezza, all'igiene e alla conservabilità degli alimenti di qualsiasi tipologia.

BIBLIOGRAFIA

- Nolan, P. Auer, S. Spehar, A. Oplatowska-Stachowiak, M. Campbell, K. 2021. Evaluation of Mass Sensitive Micro-Array biosensors for their feasibility in multiplex detection of low molecular weight toxins using mycotoxins as model compounds. *Talanta*.
- Malvano, F. 2020. Dal produttore al consumatore: cos'è la sicurezza alimentare? *Food Hub magazine*.
- Pizerman, F. Mohammadipanah, F. Faridbod, F. 2020. Emerging biosensors in detection of natural products. *Synthetic and Systems Biotechnology*, pp. 293–303.
- Qi, W. Zheng, L. Wang, S. Huang, F. Liu, Y. Jang, H. Lin, J. 2021. A microfluidic biosensor for rapid and automatic detection of Salmonella using metal-organic framework and Raspberry Pi. *Biosensors and Bioelectronics*.
- Shen, Y. Xu, L. Li, Y. 2020. Biosensors for rapid detection of Salmonella in food: A review. *comprehensive reviews in food science and food safety*, pp. 149-197.
- Malvano, F. Pillotion, R. Albanese, D. 2020. A novel impedimetric biosensor based on the antimicrobial activity of the peptide nisin for the detection of Salmonella spp. *Food Chemistry*.
- Barilleau, E. Védrine, M. Koczerka, M. Gaillard, J. Kempf, F. Grépinet, O. Payanti, I. Velge, P. Wiedemann, A. 2021. Investigation of the invasion mechanism mediated by the outer membrane protein PegN of *Salmonella Typhimurium*. pp. 2-18.
- Minniti, M. 2020. ELISA: principi delle tecniche immunochimiche ed esempi di saggi. *Microbiologia Italia*.

- Tao, W. Song, Y. Singhal, N. McGoverin, C. Vanholsbeeck, F. Swift, S. 2021. A novel optical biosensor for in situ and small-scale monitoring of bacterial transport in saturated columns. *Journal of Environmental Management*.
- Gupta, R. Raza, N. Bhardwaj, S. Vikrant, K. Kim, K. Bhardwaj, N. 2021. Advances in nanomaterial-based electrochemical biosensors for the detection of microbial toxins, pathogenic bacteria in food matrices. *Journal of Hazardous Materials*.
- Kochman, J. Jakubczyk, K. Janda, K. 2021. Mycotoxins in red wine: Occurrence and risk assessment. *Food Control*.
- Oliveira, I.S. da Silva Junior, A.G. de Andrade, C.A.S. Lima Oliveira, M.D. 2019. Biosensors for early detection of fungi spoilage and toxigenic and mycotoxins in food. *ScienceDirect*. pp. 64-79.
- Majdinasab, M. Kumar Mishra, R. Tang, X. Marty, J.L. 2020. Detection of antibiotics in food: new achievements in the development of biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*.
- Kulikova, T. Gorbachuk, V. Stoikov, I. Rogov, A. Evtugyn, G. Hianik, T. 2020. Impedimetric Determination of Kanamycin in Milk with Aptasensor Based on Carbon Black-Oligolactide Composite. *MDPI*.
- Mohammad-Razdari, A. Ghasemi-Varnamkhasti, M. Izadi, Z. Rostami, S. Ensaf, A. Siadat, M. Losson, E. 2019. Detection of sulfadimethoxine in meat samples using a novel electrochemical biosensor as a rapid analysis method. *Journal of Food Composition and Analysis*.
- Zhou, C. Zou, H. Sun, C. Li, Y. 2021. Recent advances in biosensors for antibiotic detection: Selectivity and signal amplification with nanomaterials. *Food Chemistry*.