



SENSORI PLASMONICI PER BIOMARCATORI CIRCOLANTI

L'attività di ricerca riconosciuta dal Premio "Ambrogio Mazzucotelli 2025", conferito dal Gruppo di Spettroscopia Analitica della Divisione di Chimica Analitica, riguarda lo sviluppo di nuove piattaforme biosensoristiche plasmoniche, integrate con nano/microstrutture metalliche, per l'identificazione di biomarcatori circolanti in campioni biologici ed alimentari, al fine di affrontare le criticità e migliorare le prestazioni dei metodi analitici tradizionali.

La diagnostica medica e la sicurezza alimentare si trovano di fronte ad una sfida comune: la necessità di individuare biomarcatori con elevata sensibilità, specificità e rapidità. La capacità di identificare questi marcatori - quali proteine, acidi nucleici o metaboliti - è fondamentale non solo per la diagnosi precoce di patologie, migliorando significativamente i tassi di sopravvivenza dei pazienti, ma anche per lo sviluppo di terapie personalizzate [1]. Tuttavia, i metodi analitici convenzionali si scontrano con notevoli limitazioni, tra cui l'estrema complessità dei protocolli di pretrattamento dei campioni che richiedono lunghe procedure di estrazione, purificazione e isolamento delle molecole target, rendendoli poco efficienti in contesti che esigono risposte rapide. Un'ulteriore difficoltà è rappresentata dalla bassa concentrazione dei biomarcatori, soprattutto nelle fasi iniziali di una patologia o in condizioni di *down-regulation*, dove i metodi convenzionali richiedono un'amplificazione del segnale, ottenuta mediante l'aumento del numero di copie delle molecole target, per ottimizzare i livelli di rivelabilità. Questi metodi, insieme ai potenziali rischi di contaminazione dei campioni biologici e ai costi crescenti, destano preoccupazioni significative nella fase preanalitica del trattamento dei campioni per l'analisi dei biomarcatori [2]. Inoltre, matrici complesse, come plasma, siero o alimenti, costituiscono una fonte critica di interferenze analitiche. La loro composizione varia in base a numerosi fattori (salute del donatore, dieta, processo di raccolta, ecc.) e può alterare in modo significativo i risultati delle analisi attraverso fenome-

ni di interazioni aspecifiche indotti dal cosiddetto effetto matrice.

In ambito clinico, la biopsia liquida introduce un nuovo approccio non invasivo, altamente sensibile ed economicamente vantaggioso, per isolare ed individuare frammenti di acidi nucleici ed altre molecole target di origine tumorale, come proteine e cellule tumorali circolanti, da campioni di pazienti con cancro sospetto o diagnosticato. La scoperta di mutazioni genomiche nei biomarcatori tumorali circolanti ha stimolato sempre più lo sviluppo di piattaforme molecolari, in grado di analizzare le biomolecole d'interesse direttamente nel sangue periferico dei pazienti allo stadio iniziale della malattia. Tale metodica potrebbe favorire una maggiore tempestività nella diagnosi della patologia, un miglioramento delle attività di controllo clinico nelle fasi post-operatorie e/o post-trattamento terapeutico ed una notevole riduzione dei costi. La ricerca di frontiera mira quindi allo sviluppo di nuovi metodi biotecnologici basati sulla biopsia liquida, che consentano di eseguire una diagnosi molecolare *in vitro* con procedure analitiche più semplificate rispetto allo stato dell'arte.

La ricerca qui descritta, premiata con il prestigioso riconoscimento "Ambrogio Mazzucotelli", si concentra sullo sviluppo di nuovi biosensori basati sulla risonanza plasmonica ad immagini (SPRI) con l'obiettivo di superare i limiti dei metodi tradizionali nell'identificazione di biomarcatori nei fluidi biologici mediante biopsia liquida (Fig. 1).

Nell'ambito del Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche, svolto presso il Dipartimento di Scienze Chi-

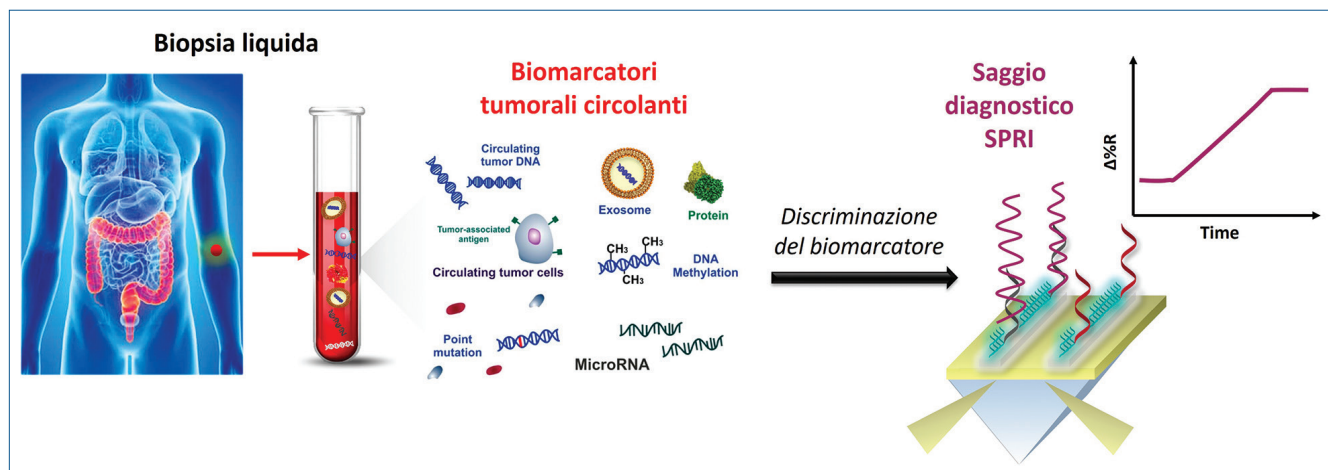


Fig. 1 - Schema illustrativo dei biomarcatori circolanti e dell'analisi basata su biopsia liquida mediante un sensore plasmonico

miche dell'Università di Catania, è stato messo a punto un biosensore plasmonico altamente sensibile ed integrato con un circuito microfluidico e nanostrutture funzionalizzate. Questo dispositivo è stato progettato per la rilevazione di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) nel gene KRAS, un biomarcatore circolante nel sangue periferico di pazienti sospetti o già affetti da cancro al colon-retto. Il saggio sfrutta un'ibridazione a "sandwich" mediante l'utilizzo di una sonda ad acido peptidonucleico complementare alla sequenza mutata del DNA e nanoparticelle d'oro funzionalizzate per il riconoscimento finale della mutazione SNP [3]. Un nuovo polimero con proprietà *antifouling*, in grado di prevenire l'assorbimento non specifico sulla superficie del sensore di materiale biologico interferente e di limitare la mani-

polazione del campione, è stato realizzato in collaborazione con il Prof. Dr. ir. Jurriaan Huskens della University of Twente, nei Paesi Bassi [4]. Il saggio plasmonico combinato con il polimero *antifouling* ha permesso una rivelazione rapida, semplice ed ultrasensibile (a livello di poche unità di $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$) dei biomarcatori circolanti, direttamente in campioni di plasma di pazienti con cancro colonrettale senza l'uso di protocolli di amplificazione del target, superando così alcuni degli ostacoli e delle limitazioni degli approcci attualmente disponibili per la diagnostica molecolare dei tumori basata su biopsia liquida [5]. La modifica della superficie con il polimero *antifouling* ha mostrato grande versatilità e applicabilità anche per biomarcatori proteici circolanti, come il lisozima, in ambito clinico e alimentare [6] (Fig. 2).

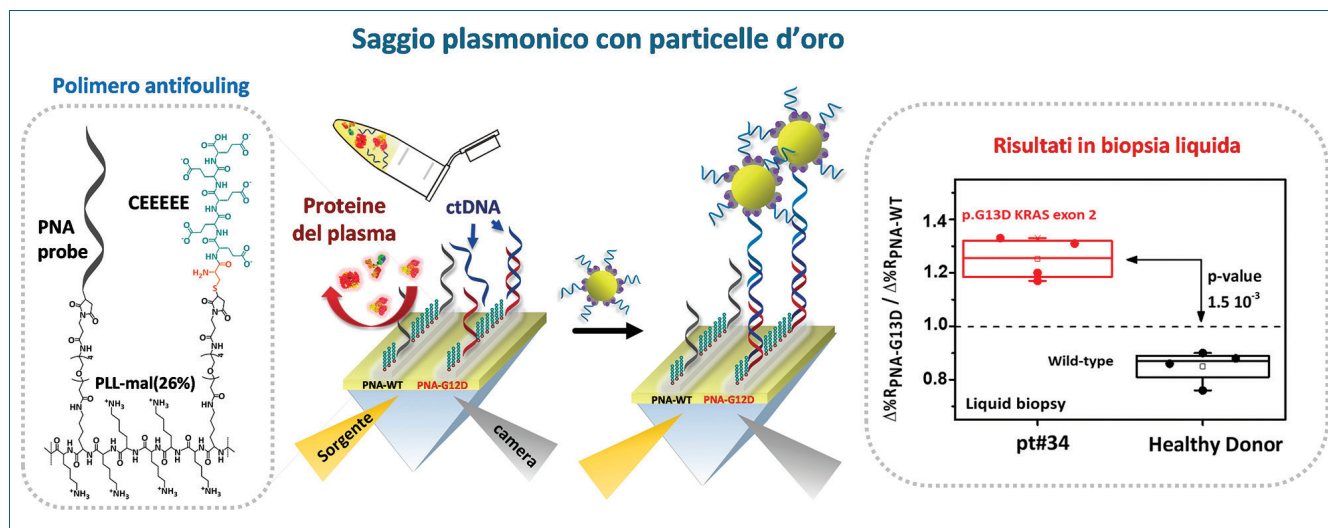


Fig. 2 - Struttura del polimero *antifouling* e sensore plasmonico per l'analisi di biomarcatori tumorali a DNA mediante biopsia liquida. Da [5]

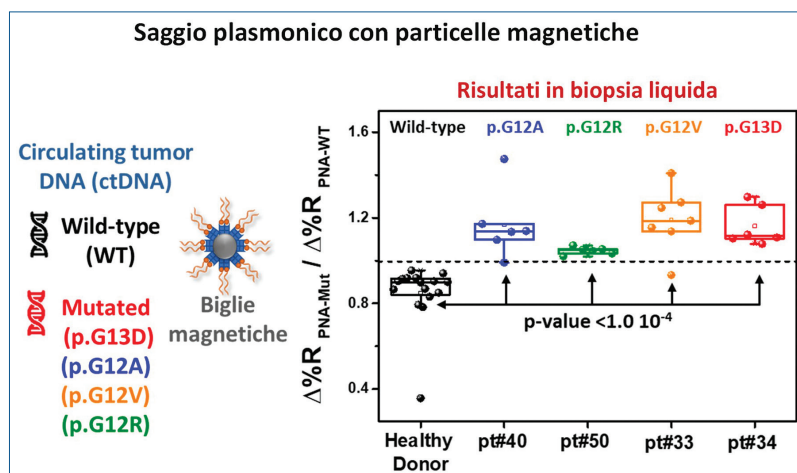


Fig. 3 - Analisi di biomarcatori tumorali a DNA mediante biopsia liquida e particelle magnetiche. Da [7]

Nell'ottica di un'ulteriore semplificazione del saggio diagnostico e di un miglioramento della sensibilità di rivelazione delle mutazioni SNPs, i recenti sviluppi sui biosensori plasmonici hanno suggerito l'uso di microparticelle superparamagnetiche per offrire un'analisi in tempo reale, riducendo l'effetto matrice e richiedendo solo pochi microlitri di campione biologico per uno screening tumorale mediante l'uso di plasma da pazienti con cancro colonrettale e donatori sani [7] (Fig. 3). La stessa strategia è stata anche impiegata per un'analisi pre-impianto non invasiva, al fine di valutare la qualità e salubrità degli embrioni, attraverso il prelievo di biomarcatori circolanti nelle colture cellulari embrionali [8]. Grazie alle loro proprietà magnetiche, le particelle funzionalizzate con una sonda oligonucleotidica riescono a catturare il biomarcatore target direttamente nel fluido biologico. Successivamente, l'applicazione di un campo magnetico esterno consente di isolare le biglie legate al target d'interesse, eliminando tutte le possibili sostanze interferenti presenti nel campione. L'analisi mediante il sensore plasmonico permette di riconoscere in modo specifico la mutazione SNP in tempi rapidi. Il lavoro di ricerca descritto è stato svolto e procede ancora oggi all'interno di due progetti di ricerca ad ampio respiro internazionale come "ULTRAPLACAD" (ULTRASensitive PLAsmonic devices for early CAncer Diagnosis, 2018), coordinato dal Prof. Giuseppe Spoto dell'Università di Catania, per lo sviluppo di dispositivi plasmonici ultrasensibili per la diagnosi precoce del cancro colorettale ed indicato come uno dei progetti più rilevanti finanziati dalla

Commissione Europea nell'ambito della tematica "cancro", e "VerSiLib" (VERsatile amplification Method for Single-Molecule Detection in Liquid Biopsy, in corso) per la messa a punto di una piattaforma digitale per analizzare sia le proteine che gli acidi nucleici associate al melanoma, a livello di singola molecola, utilizzando particelle magnetiche e biomolecole a diverse affinità.

In futuro, l'attività di ricerca sarà orientata verso la creazione di approcci diagnostici sempre più innovativi per la diagnosi tempestiva di patologie. Attraverso l'analisi molecolare di biomarcatori circolanti, si mira a definire una nuova generazione

di tecnologie "lab-on-a-chip" che possano essere implementate come standard analitici in ambito clinico e nella sicurezza alimentare.

BIBLIOGRAFIA

- [1] N. Bellassai, G. Spoto, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 7255.
- [2] N. Bellassai *et al.*, *Front. Chem.*, 2019, **7**, 570.
- [3] R. D'Agata *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, 2020, **170**, 112648.
- [4] N. Bellassai *et al.*, *J. Mater. Chem. B*, 2018, **6**, 7662.
- [5] N. Bellassai *et al.*, *ACS Sens.*, 2021, **6**, 2307-2319.
- [6] N. Bellassai *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2023, **1283**, 341979.
- [7] N. Bellassai *et al.*, *Talanta*, 2025, **286**, 127543.
- [8] N. Bellassai *et al.*, *Anal. Chem.*, 2025, **97**, 19241.

Plasmonic Sensors for Circulating Biomarkers

The research acknowledged with the "Ambrogio Mazzucotelli 2025" Award, bestowed by the Analytical Spectroscopy Group of the Analytical Chemistry Division, focuses on developing innovative plasmonic biosensor platforms. These systems are integrated with nano- and micro-scale metallic structures to detect circulating biomarkers in biological and food samples, to address the critical issues and improve the performance of conventional analytical techniques.