

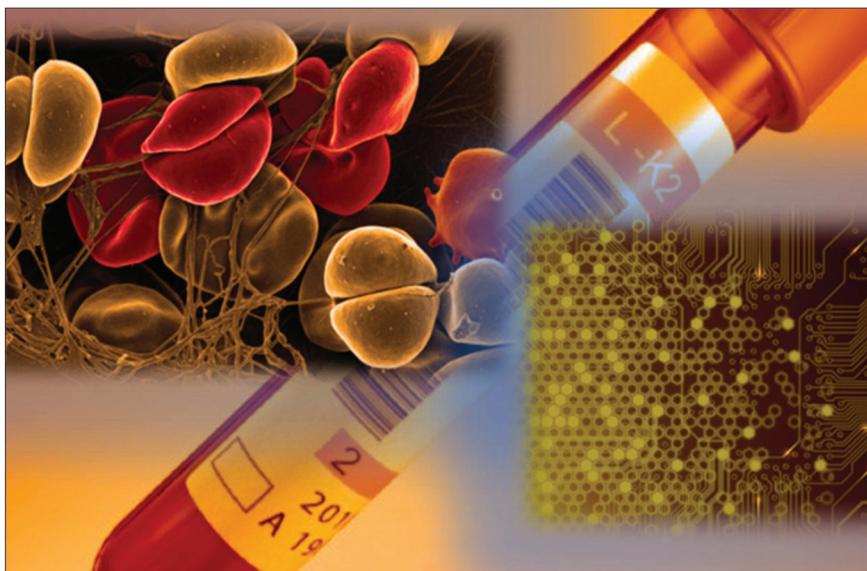
MARIAANNA MESSINA^A, SALVATORE PETRALIA^B^AAZIENDA OSPEDALIERO UNIVERSITARIA POLICLINICO VITTORIO EMANUELE, CATANIA^BSTMICROELECTRONICS, CATANIA

MMESSINA@UNICT.IT, SALVATORE.PETRALIA@ST.COM

BIOSENSORI: PROGRESSI ED APPLICAZIONI IN CLINICA DIAGNOSTICA

I biosensori sono dispositivi utilizzati in diversi settori della clinica diagnostica, per il riconoscimento di numerose patologie, per il monitoraggio di terapie dietetico-farmacologiche e parametri vitali, attraverso la misura di opportuni biomarker, quali acidi nucleici, proteine, amminoacidi ecc. I biosensori sono costituiti da una parte di sensing per il riconoscimento del target e da una parte elettronica per la trasduzione del segnale. La chimica in questo settore ha un ruolo fondamentale sia per il miglioramento delle prestazioni analitiche, quali sensibilità e specificità, sia per la robustezza e la stabilità del biosensore.

Lo sviluppo di nuove biotecnologie e la loro integrazione in dispositivi elettronici miniaturizzati ha aperto nuovi interessanti scenari nei settori della biosensoristica e della clinica diagnostica [1]. I biosensori sono dispositivi analitici progettati per la rileva-



zione di analiti (target), quali proteine, acidi nucleici, acidi grassi e piccole molecole organiche, come amminoacidi, glucosio, etanolo ecc. Tali dispositivi sono costituiti principalmente da un modulo di sensing per il riconoscimento del target attraverso l'ausilio di opportune reazioni biologiche e da un modulo elettronico per la trasduzione, ovvero per la conversione del segnale biologico in una grandezza

fisica misurabile, quale intensità di corrente, resistenza, impedenza, capacità (trasduzione elettrica), intensità di radiazione elettromagnetica (trasduzione ottica), variazione di massa (trasduzione meccanica) ecc.

L'avanzare di innovativi processi tecnologici della

microelettronica (VLSI *Very Large Scale Integration* e MEMS *Micro Electro-Mechanical Systems*) assieme allo sviluppo delle nanotecnologie hanno contribuito fattivamente all'integrazione delle reazioni biochimiche e dei metodi di trasduzione in sistemi elettronici sempre più miniaturizzati, portando ad un veloce sviluppo dei sistemi Point-of-Care (PoC) per il self-testing [2].



I biosensori possono essere classificati in diversi modi. Sulla base della loro struttura si possono distinguere in biosensori indossabili, impiantabili e portatili [3], mentre sulla base del metodo di trasduzione si identificano principalmente i biosensori elettrici basati sulla misura di variazioni di resistività, capacità, ecc., biosensori elettrochimici (basati su reazioni di ossido-riduzione all'elettrodo) e biosensori ottici basati sulla misura dell'intensità di fluorescenza, interferometrici e rifrattometrici (Surface Plasmon Resonance) ecc. [4].

Un metodo molto diffuso di classificazione dei biosensori si basa sulla tipologia di interazione tra analita da misurare (*target*) ed il materiale biochimico attivo per il sensing (*probe*). Pertanto, secondo quest'ultima classificazione, i biosensori si possono distinguere in:

a) *biosensori per bioaffinità*, dispositivi nei quali il meccanismo di sensing è basato sulla formazione di un legame altamente specifico tra il probe ed il target (*DNA-on-chip*, *immuno-chip* ecc.);

b) *biosensori per catalisi enzimatica*, dispositivi che sfruttano il riconoscimento del target attraverso l'utilizzo di enzimi altamente specifici opportunamente immobilizzati su una superficie (*glucose-sensor*, *sensori per il colesterolo* ecc.);

c) *biosensori per catalisi non enzimatica*, sensori che si basano sull'utilizzo di nanomateriali innovativi in grado di catalizzare specifiche reazioni per il riconoscimento diretto delle molecole target [5].

Grazie alle principali caratteristiche, quali miniaturizzazione, facilità d'utilizzo, basso consumo energetico e basso costo, i biosensori hanno trovato larghissima applicazione per l'esecuzione di indagini qualitative e quantitative nel campo della diagnostica. In particolare, sono stati utilizzati come strumenti di indagine per il riconoscimento di numerose patologie, per il monitoraggio di terapie dietetico-farmacologiche e parametri vitali, attraverso la misura di opportuni *biomarker* [6]. In tale contesto, negli ultimi anni, sono stati sviluppati e commercializzati diversi biosensori,

come ad esempio il biosensore sviluppato per il monitoraggio dei livelli di glutammato plasmatico, quale utile supporto per la diagnosi di malattie psichiatriche come la depressione, la schizofrenia ed il morbo di Alzheimer [7].

Nel settore della chimica clinica, sono stati sviluppati vari biosensori per la misura delle concentrazioni di fenilalanina plasmatica ed urinaria, come strumento diagnostico per il monitoraggio della terapia dietetico-farmacologica nei pazienti affetti da iperfenilalaninemie. Questi dispositivi sono basati su reazioni altamente specifiche catalizzate da enzi-

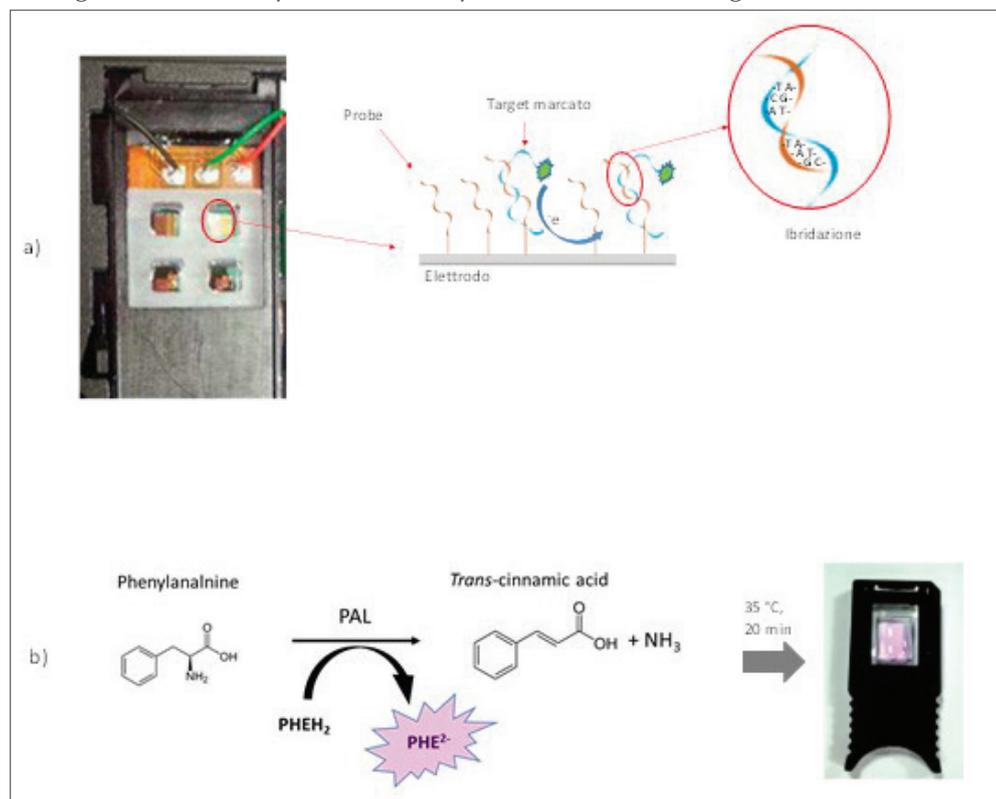


Fig. 1 - Esempi di biosensori: a) *DNA-on-chip* per il riconoscimento di acidi nucleici basato sulla reazione di ibridazione e trasduzione elettrochimica; b) biosensore per il riconoscimento di fenilalanina attraverso reazione enzimatica catalizzata da PAL e trasduzione ottica

mi, come ad esempio la fenilalanina ammonio liasi (PAL), in grado di trasformare quantitativamente la fenilalanina in acido *trans*-cinnamico, con produzione di ammoniaca. Tale dispositivo, basato su una trasduzione di tipo ottico è in grado di rilevare basse quantità di fenilalanina con un range di linearità che va da 20 μM a 3000 μM , sfruttando una semplice variazione di colore (ottenuta tramite l'aggiunta di fenolfaleina come indicatore di pH) proporzionale alla quantità di ammoniaca prodotta e quindi alla quantità di fenilalanina presente nel campione biologico [8]. Un secondo biosensore, presente in letteratura, sfrutta la reazione della fenilalanina deidrogenasi (PDH) che trasforma la fenilalanina in piruvato in presenza del cofattore NAD^+ , in questo caso una trasduzione di tipo elettrochimico basata sull'ossidazione diretta del NADH permette la misura quantitativa delle concentrazioni di fenilalanina nel campione in esame [9].

In Fig. 1, a titolo di esempio, sono riportati alcuni tipi di biosensori per il riconoscimento e la quantificazione di target biologici, quali acidi nucleici ed amminoacidi.

I *DNA-on-chip* sono tra i più diffusi biosensori presenti sul mercato. Essi sono stati sviluppati per il riconoscimento del materiale genetico attraverso un meccanismo di sensing basato sulla reazione di ibridazione tra il target (sequenza specifica del DNA da rilevare) ed il probe costituito da una sequenza di oligonucleotidi, generalmente lunga 20-25 bps, complementare alla sequenza da rilevare. Il probe che rappresenta il materiale sensing attivo viene immobilizzato sul supporto solido del biosensore sfruttando diverse strategie chimiche basate su coating epossidici, amminici, aldeidici ecc. [10]. Sul materiale di sensing attivo viene quindi fatta avvenire la reazione di riconoscimento di ibridazione, nella quale il target si lega allo specifico probe attraverso interazioni tra le basi degli acidi nucleici (A-T e C-G). La trasduzione in questi biosensori può essere di diversi tipi: ottica, nel caso in cui si utilizzi una sonda fluorescente (come Cy5, Cy3, FAM ecc.) che si può intercalare alla doppia elica o innestare al target; elettrica, nel caso in cui si utilizzi una sonda redox-attiva come ad esempio ferrocene o complessi di osmio(II) (Fig. 1a). Le tecnologie utilizzate per la costruzione dei *DNA-on-chip* spaziano dalla mi-

crofluidica per la movimentazione di piccole quantità di campione biologico, alla chimica delle superfici per l'immobilizzazione dei probe sul supporto solido, alla biologia molecolare per la messa a punto delle condizioni operative per l'estrazione del materiale genetico, l'amplificazione degli acidi nucleici (tramite la reazione di PCR) ed il riconoscimento tramite reazione di ibridazione. I *DNA-on-chip* in ambito clinico trovano larghissima applicazione sia nel settore dell'infettivologia per la rilevazione di materiale genetico di virus, funghi e batteri, sia nell'analisi genetica per la rilevazione di mutazioni genetiche e nella proteomica per la valutazione dell'espressione genica [11].

In Fig. 1b è riportato un esempio di biosensore per biocatalisi basato su una trasduzione di tipo ottico, per il riconoscimento di fenilalanina in liquidi biologici. Tale dispositivo è composto da una camera di reazione del volume di circa 200 μl , costituita da un substrato di carta sul quale è stato pre-immobilizzato l'enzima PAL insieme a tutti i reagenti per la reazione enzimatica. Una trasduzione ottica ottenuta per semplice variazione di colorazione di un opportuno indicatore permette la misurazione quantitativa dei livelli di amminoacido in un campione di urina, previa incubazione a 35 °C per 20 min.

Una classe di biosensori largamente utilizzati nel settore della diagnostica sono gli immuno-*chip*, progettati per il riconoscimento di anticorpi tramite utilizzo di antigeni specifici immobilizzati in supporti solidi quali, plastica, vetro, silicio, metallo ecc. La chimica anche in questo caso gioca un ruolo chiave nello sviluppo degli immuno-*chip*, sia nelle metodiche di immobilizzazione delle molecole biologiche sulla superficie del supporto solido sia nella scelta del metodo di trasduzione più appropriato. La strategia chimica di immobilizzazione del materiale proteico sul supporto solido deve garantire un legame stabile con la superficie, preservando le funzionalità biologiche della molecola. A seconda della strategia di immobilizzazione una proteina può essere ancorata con un orientamento casuale od ordinato [12]. Il metodo di immobilizzazione più comune che permette la formazione di un layer proteico altamente ordinato è basato sull'interazione altamente specifica streptavidina-biotina. Tale metodo necessita però l'utilizzo di proteine opportunamente ingegnerizzate

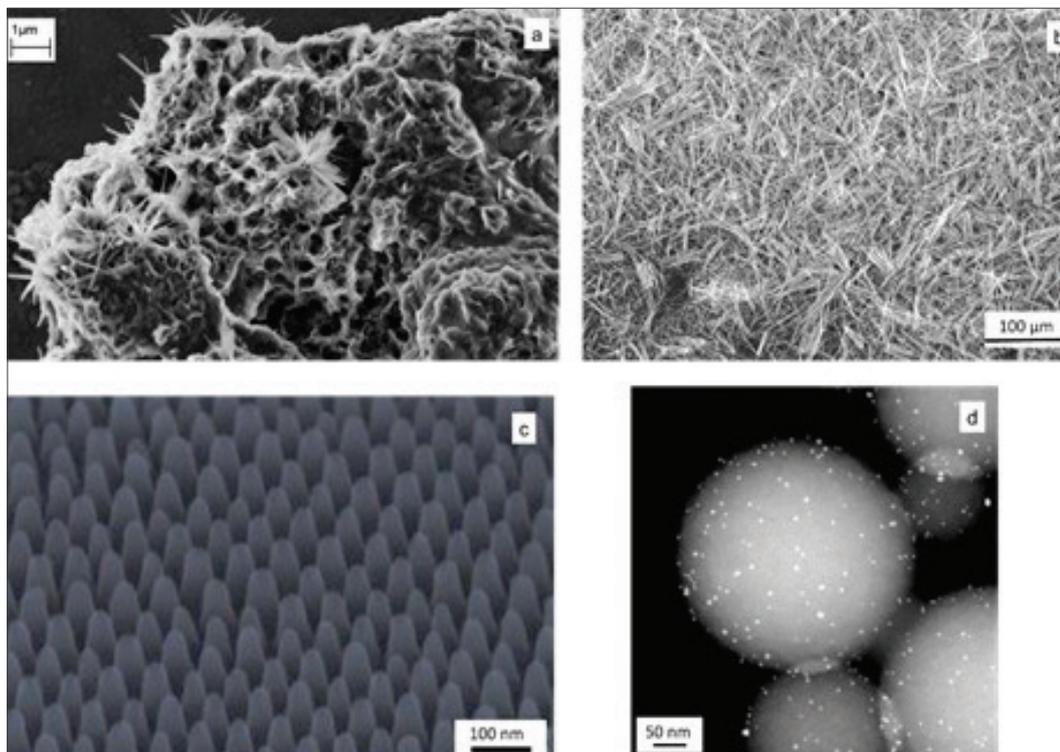


Fig. 2 - Esempi di nanostrutturazioni: a) nanofoam di nichel; b) nanorods di nichel; c) nanopillars di silicio e d) nanoparticelle di palladio su microsferi di polistirene

Un altro importante esempio di sistema diagnostico enzimatico ed elettrochimico è il sensore di glucosio, il quale permette il monitoraggio dei livelli di glucosio plasmatico. I metodi tradizionali di monitoraggio di glucosio integrati su sistemi portatili sfruttano un approccio enzimatico basato sull'utilizzo della glucosio ossidasi o della glucosio deidrogenasi, quest'ultimo con l'utilizzo del cofattore pirrolochinolina chinone. In entrambi i

e pertanto non risulta sempre applicabile. Una metodologia alternativa che permette di ottenere film proteici con un sufficiente ordine ed orientamento spaziale si basa sulla formazione di coating reattivi come *N*-idrossisuccinimide, anelli epossidici, gruppi aldeidici, in grado di formare legami covalenti con i residui amminoacidici (lisina, serina, tirosina ecc.) della proteina [13]. Di contro un coating basato su materiali ionici e polari, come ad esempio PEG, polianilina, chitosano, garantisce interazioni di natura prevalentemente elettrostatica ottenendo layer proteici casuali e non ordinati [14].

La chimica ha un ruolo fondamentale anche nella scelta delle tecniche di trasduzione per la misura dell'interazione antigene-anticorpo. Tale interazione altamente specifica, può essere misurata, ad esempio, attraverso opportuni marcatori fluorescenti o redox opportunamente legati ad un antigene secondario, con formazione di una struttura a sandwich antigene/anticorpo/antigene* [15]. Un altro metodo di trasduzione (*label free*) consiste nel misurare le variazioni elettriche (biosensori resistivi) od ottiche (biosensori SPR) che tali interazioni apportano sulla superficie.

casi gli enzimi catalizzano la reazione di ossidazione del glucosio a gluco lattone, dove l'elettrone prodotto può essere sia letto direttamente dall'elettrodo sia utilizzato per produrre acqua ossigenata, la cui quantità è proporzionale ai livelli di glucosio presente nel sangue [16]. Tali metodi enzimatici, nonostante siano altamente specifici, presentano svantaggi legati alla dipendenza dalle condizioni esterne, quali temperatura ed umidità. Per ovviare a tali inconvenienti negli ultimi anni è stata sviluppata una nuova generazione di sensori di glucosio basati su catalisi di tipo non-enzimatica.

Questi sensori di nuova generazione sfruttano dei nanomateriali in grado di ossidare direttamente il glucosio all'elettrodo, generando una corrente elettronica proporzionale alla concentrazione di glucosio. Uno dei materiali più utilizzati in grado di rilevare piccolissime quantità di glucosio è il nichel nelle sue varie specie ossidate ($Ni^{2+/3+}$). I biosensori basati su tale approccio sono generalmente costituiti da un elettrodo di lavoro di Ni^0 ricoperto da uno strato nanometrico di $NiOOH$, quest'ultimo, riducendosi reversibilmente a $Ni(OH)_2$, è in grado di ossidare il

Analita target	Tipologia di biosensore/ Meccanismo di sensing	Meccanismi di trasduzione	Riferimenti
Acidi Nucleici	Bioaffinità Ibridazione con probe complementari	Ottico Elettrochimico capacitivo	http://vereduslabs.com https://www.illumina.com/techniques/microarrays.html
Anticorpi	Riconoscimento con antigeni specifici	Ottico Elettrochimico	https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-microarrays.html
Aminoacidi	Catalisi enzimatica Riconoscimento con enzimi specifici	Ottico Elettrochimico	[8] [19]
Glucosio	Catalisi enzimatica Ossidazione specifica tramite Gox o glucosio deidrogenasi PQQ Elettrochimic	Elettrochimico	http://www.abbottdiabetescare.co.uk , 2010 https://www.accu-chek.co.uk/ , 2010
	Catalisi non enzimatica Ossidazione con nanomateriali	Elettrochimico	http://www.zensor.com.tw [17]
	Metodo ottico diretto/ spettroscopia SERS	Ottica	http://googleblog.blogspot.it/2014/01/introducing-our-smart-contact-lens.html
Urea		Elettrochimico	[20]
Etanolo		Elettrochimico	[21] [22]
Colesterolo		Elettrochimico	[23]

Tab. 1

glucosio. La reversibilità viene garantita mantenendo l'elettrodo di lavoro ad un potenziale costante di circa 0,5 V, al quale la specie $\text{Ni}(\text{OH})_2$ formatasi viene ossidata a NiOOH , pronta nuovamente ad ossidare una nuova molecola di glucosio. In tal modo gli elettroni coinvolti in tale processo sono proporzionali alla quantità di glucosio presente nel campione [17]. I principali vantaggi di tale metodo sono l'elevata

sensibilità, l'ottima stabilità ed il basso costo di produzione; di contro il principale svantaggio è legato alla bassa specificità. In questo contesto la chimica dei materiali ha avuto un ruolo essenziale nello sviluppo di nanostrutture quali *nanofoam*, *nanorods*, *nanowires*, *nanowalls*, *nanopillars* e nanoparticelle in grado di aumentare sia la sensibilità del materiale attivo (grazie all'aumento dell'area attiva per unità



di superficie fino ad un fattore 1000) che la specificità (grazie all'interazione tra l'analita e la superficie nanostrutturata [18]). In Fig. 2 sono riportati alcuni esempi di nanostrutturazioni utilizzate nel settore della sensoristica.

Diversi biosensori sono attualmente presenti in commercio, alcuni dei quali trovano interessanti applicazioni anche nello sviluppo di sistemi portatili Point-of-Care. In Tab. 1 sono riportati alcuni esempi di biosensori utilizzati nel settore diagnostico con le principali caratteristiche di meccanismo di sensing e di trasduzione.

Conclusioni

I biosensori trovano ampia applicazione nel settore della diagnostica come prezioso strumento per un semplice e veloce monitoraggio dei parametri biochimici utili per la diagnosi di varie patologie, quali iperfenilalaninemie, depressioni, diabete, ecc. Tali strumenti sono inoltre utili per il monitoraggio delle terapie dietetico-farmacologiche. Le principali caratteristiche, quali miniaturizzazione, facile utilizzo, basso costo d'analisi ed elevata velocità di risposta, rendono tali dispositivi dei potenziali candidati per lo sviluppo di sistemi *self-testing*, in grado di aumentare la qualità di vita dei pazienti. Inoltre la possibilità di un diretto autocontrollo di alcuni parametri biochimici, direttamente dal paziente, senza la necessità di recarsi presso laboratori specializzati, permette un'efficiente campagna di prevenzione ed una netta riduzione dei costi del Sistema Sanitario Nazionale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A.P.F. Turner, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 3184.
- [2] A. St John, C.P. Price, *Clin. Biochem. Rev.*, 2014, **35**, 155.
- [3] A. Tricoli, N. Nasiri, S. De, *Adv. Funct. Mater.*, 2017, **16**, 5271.
- [4] S. Mariani, L. Pinom *et al.*, *ACS Sensors*, 2016, **1**, 1471.
- [5] C. Li, J. Li, H. Tang *et al.*, *Anal. Methods*, 2017, **9**, 1265.
- [6] W. Gao *et al.*, *Nature*, 2016, **529**, 509.
- [7] S.L. Okon, N.J. Ronkainen, *InTechopen*, 2017, DOI: [10.5772/68025](https://doi.org/10.5772/68025).
- [8] M.A. Messina, C. Meli *et al.*, *Analyst*, 2017, **142**, 4629.

- [9] R. Robinson, L. Wong *et al.*, *Micromachines*, 2016, **7**, 28.
- [10] G. Ventimiglia, S. Petralia, *Bionanoscience*, 2013, **3**, 428.
- [11] S. Petralia, S. Conoci, *ACS Sensors*, 2017, **2**, 876.
- [12] S.B. Nimse, K. Song *et al.*, *Sensors*, 2014, **14**, 22208.
- [13] N.G. Welch, J.A. Scoble *et al.*, *Biointerphases*, 2017, **16**.
- [14] B.J. Endrizzi, G. Huang *et al.*, *Langmuir*, 2016, **22**, 11305.
- [15] S. Petralia, G. Ventimiglia *et al.*, *BioNanoSci.*, 2017, **3**, 449.
- [16] J. Wang, *Chem. Rev.*, 2007, **108**, 814.
- [17] S. Petralia, S. Mirabella *et al.*, *Bionanoscience*, 2017, **7**, 58.
- [18] K.O. Iwu, A. Lombardo *et al.*, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, **224**, 764.
- [19] G. Thiessen, R. Robinson *et al.*, *Analyst*, 2015, **140**, 609.
- [20] M. Dervisevic *et al.*, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, **254**, 93.
- [21] P.D. Thumngon *et al.*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, **97**, 83.
- [22] S. Petralia, E.L. Sciuto *et al.*, *Sensors and Actuators: B chemical*, 2018, **263**, 10.
- [23] G. Kaur *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, **409**, 1995

Biosensors: Progresses and Applications on Clinical Diagnostic

Biosensors are devices employed in various fields of clinical diagnostics, for the recognition of numerous pathologies, for the monitoring of dietetic/pharmacological therapies and for the monitoring of vital parameters, through the monitoring of suitable biomarkers, such as nucleic acids, amino acids, etc. Biosensors consist of a sensing part for target recognition and an electronic part for signal transduction. Chemistry in this sector plays a fundamental role both for the improvement of analytical performances, such as sensitivity and specificity, and for the robustness and stability of the biosensor.

