

Fabricación de biosensores piezoeléctricos para la lectura de interacciones antígeno-anticuerpo

J.M. Hernández-Lara^a, C. Mendoza-Barrera^{a,b}, V. Altuzar^{a,c}, S. Muñoz-Aguirre^β,
S. Mendoza-Barrera^γ, and A. Saucedo-Carvajal^a

^aCentro de Investigación en Micro y Nanotecnología, Universidad Veracruzana,
Edif. MICRONA, Av. Ruiz Cortines 455, Fracc. Costa Verde, 94294, Boca del Río, Veracruz, México.
email: jumahela@hotmail.com; omendoza@uv.mx; valtuzar@uv.mx; asaucedo@uv.mx

^bOn sabbatical leave at Departamento de Física, CINVESTAV-IPN

^cOn sabbatical leave at FCFM-BUAP.

^βFacultad de Ciencias Físico Matemáticas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,
Av. Sn. Claudio y 18 Sur, Col. Sn. Manuel, 72570, Puebla, Puebla, México.
email: smunoz@fcfm.buap.mx

^γGlobalZone Science & High Technology A.C.,
I.M. Altamirano 1830, Fracc. Satélite, 72320, Puebla, Puebla, México.
e-mail: smendoza.barrera@gmail.com

Recibido el 13 de marzo de 2012; aceptado el 8 de mayo de 2012

En años recientes las microbalanzas de cristal de cuarzo QCM han despertado un gran interés en la comunidad científica e industrial por su potencial aplicabilidad en áreas como la médica, control de calidad, química y farmacéutica. Son parte de una técnica de monitoreo rápida, de bajo costo, alta reproducibilidad y bajos límites de detección de la sustancia de interés. En este trabajo se reporta la fabricación de biosensores con monocapas de fibrinógeno (1.5 mg/ml) o albúmina de suero de bovino (1.5 mg/ml) anclados sobre electrodos de oro de cristales de cuarzo para su aplicación en la lectura de interacciones proteína/proteína en soluciones saturadas (1.5 mg/ml) de anti-fibrinógeno y anti-albúmina de suero de bovino. Los electrodos de oro, empleados también como soportes de los biosensores, fueron depositados mediante la técnica de erosión catódica sobre los cristales de cuarzo de frecuencia fundamental f de 20 MHz, mientras que su caracterización fue realizada empleando difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido, microscopía de fuerza atómica y perfilometría. La amino-funcionalización de los electrodos de oro, así como la fabricación de las películas sensibles de fibrinógeno y albúmina de suero de bovino, se realizaron mediante auto-ensamblado molecular. Los resultados experimentales y el modelo *Sauerbrey* permitieron determinar la densidad superficial de masa σ de la proteína absorbida después de la interacción proteína/proteína. Se determinó que en el caso de interacciones fibrinógeno/anti-fibrinógeno y albúmina/anti-albúmina la densidad superficial de masa correspondió al orden de $3.20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $2.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. Por su lado, los casos de baja homología presentes en la interacción fibrinógeno/albúmina y albúmina/anti-fibrinógeno mostraron valores promedio de σ de $0.37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $0.08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente.

Descriptores: Piezoeléctricos; QCM; biosensores.

In recent years, quartz crystal microbalances (QCM) have aroused great interest in the scientific and industrial communities due to their potential applications in areas such as medicine, quality control, chemistry, and the pharmaceutical industry. They are part of a rapid monitoring technique, and also have a low cost, high reproducibility, and low detection limits of the substance of interest. The following research addresses the main steps for biosensors with fibrinogen (1.5 mg/ml) or bovine serum albumin (1.5 mg/ml) monolayers anchored to the gold electrode of quartz crystals fabrication, which are used for detecting the protein/protein interaction in the saturated solution of anti-fibrinogen and anti-bovine serum albumin (1.5 mg/ml). Gold electrodes were prepared by a sputtering technique using a high purity gold target to grow thin films onto the surfaces of quartz crystals until they presented a fundamental frequency of 20 MHz. The morphology, roughness, thickness, and crystallography were characterized using scanning electron microscopy, atomic force microscopy, profilometry, and X-ray diffraction, respectively. The amino-functionalization of the gold electrodes and fibrinogen and bovine serum albumin sensitive films manufacture were performed by using molecular self-assembly. Through experimental data, the Sauerbrey model obtained the adsorbed surface concentration of protein after protein/protein interaction. The protein surface coverage of fibrinogen/anti-fibrinogen and albumin/anti-albumin interactions were $3.20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $2.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively. On the other hand, the cases of low homology, which were present in the fibrinogen/albumin and albumin/anti-fibrinogen interactions, showed values of $0.37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $0.08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively.

Keywords: Proteins; biosensors; QCM.

PACS: 87.14.E; 87.15.km; 87.85.fk

1. Introducción

En años recientes, el interés de diversos grupos mexicanos se ha extendido hacia el desarrollo de investigaciones que guarden interacción multidisciplinarias entre la biología, medicina, ingeniería y física. Uno de los retos sigue siendo

el desarrollo de equipamiento e instrumental propio que permitan cultivar dicha relación y, al mismo tiempo, sean un campo fértil para el desarrollo de investigadores jóvenes y la captación de estudiantes interesados por la ciencia y la tecnología. La fabricación y aplicación de biosensores se

presenta en forma natural debido a la necesidad de contar con mecanismos de detección de un amplio rango de biomoléculas de interés en la industria y en particular en el diagnóstico clínico, a través de la explotación de diversos fenómenos físicos como la variación del índice de refracción, de masa, de esfuerzo, de resistencia, entre otros. Dichos biosensores requieren una alta sensibilidad, reproducibilidad, bajo costo y detección rápida. Una de las tendencias actuales para el anclaje de moléculas selectivas, y su aplicación en biosensado de moléculas específicas (ADN, proteínas, virus, enzimas), es a través de la funcionalización de superficies [1-3]. La investigación en el área de biosensores posee una gran importancia por su amplio espectro de aplicaciones y por la generación de nuevo conocimiento, sin embargo, en México existen muy pocos grupos dedicados a estas ramas de la ciencia, por lo que sería deseable formar un número creciente de investigadores de alto nivel en Física Aplicada a la Biología y a la Medicina. En este trabajo se presenta la fabricación de biosensores con películas de fibrinógeno (FGN) o albúmina de suero de bovino (BSA) sobre cristales piezoeléctricos con electrodo de oro, los cuales han sido previamente amino-funcionalizados. La parte instrumental posee una amplia aplicabilidad y puede ser desarrollada fácilmente en un semestre de estudios a nivel universitario y, aplicándolo para desarrollar biomateriales y biosensores, puede fácilmente constituirse en tema de investigación para desarrollo de tesis de licenciatura o de postgrado [4-5].

Una *microbalanza de cristal de cuarzo* (QCM, *quartz crystal microbalance*) se fabrica cuando sobre un cristal piezoeléctrico se deposita un electrodo metálico (oro, plata, platino en el caso particular para biosensores) y se incorpora en un sistema oscilador. Dependiendo del espesor y el corte del cristal, contarán con una frecuencia de resonancia fundamental f_0 . Estos dispositivos de detección son robustos, de bajo costo, estables en su frecuencia de resonancia y altamente sensibles a los cambios de masa que van de los miligramos (10^{-3} kg) a los picogramos (10^{-15} kg), particularmente si el tipo de corte del cristal de cuarzo es seleccionado de tal manera que su frecuencia de oscilación no dependa de la temperatura en un cierto rango (corte AT) [6,7].

Cuando un QCM es empleado como *sensor* se aprovechan los cambios en la frecuencia de resonancia del cristal debida a los cambios de masa en la superficie del electrodo metálico. Estos cambios son directamente proporcionales al corrimiento de la frecuencia de resonancia y pueden ser evaluados mediante la ecuación de *Sauerbrey* [8-9].

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\mu_q \rho_q}} \quad (1)$$

donde Δf es el cambio de frecuencia medido, f_0 es la frecuencia fundamental de resonancia del cristal de cuarzo con electrodo metálico antes de producirse el cambio de masa, Δm es el cambio de masa, A es el área piezoeléctricamente activa (electrodo metálico), μ_q es el módulo de cizalla del cuarzo de corte AT (para $f_0 = 20$ MHz corresponde un valor de 2.947×10^{11} dina-cm $^{-2}$) y ρ_q es la densidad del cuarzo

(2.65 g-cm $^{-3}$). El signo negativo indica que un incremento de la masa en la superficie del cristal, por ejemplo por la adsorción de una molécula, da lugar a una disminución en su frecuencia de resonancia, y viceversa [6,7,10]. La fabricación de un *biosensor* basado en QCMs consiste en la incorporación de una monocapa orgánica con grupo terminal activo (i.e. grupo amino) depositada sobre los electrodos de oro, tal que sea posible el anclaje covalente de las biomoléculas de interés. En este trabajo se inmovilizaron covalentemente proteínas FGN y BSA (1.5 mg/ml) para detectar y cuantificar anti-fibrinógeno (anti-FGN) y anti-albúmina de suero de bovino (anti-BSA), respectivamente, en soluciones saturadas (1.5 mg/ml).

2. Detalles experimentales

2.1. Fabricación de biosensores para la detección de anti-FGN y anti-BSA

Las Figs. 1a a 1e esquematizan los pasos para la fabricación de las diversas películas que conforman el biosensor con monocapa de FGN o BSA, empleando cristales de cuarzo con electrodo de oro amino-funcionalizados como substratos. La Fig. 1a representa el cristal de cuarzo, con frecuencia de resonancia f , tal como se recibe de fábrica; la Figs. 1b y 1c corresponderían al cristal una vez que se ha depositado un electrodo de oro por erosión catódica, donde f'_0 y f_0 son las respectivas frecuencias fundamentales, antes y después de someterlo a un lavado con solución piraña. La Fig. 1d muestra la modificación orgánica (o activación o funcionalización) de la superficie de oro limpia y depositada mediante autoensamblado molecular (SAM, *self assembled monolayer*), y que presenta una frecuencia f_1 . Las películas biosensoras, de frecuencia f_2 , se fabricaron por incubación de los QCMs en soluciones saturadas de BSA y FGN (1.5 mg/ml) por un periodo de dos horas (Fig. 1e) [11,12]. Finalmente, la Fig. 1f ejemplifica la interacción biomolecular entre dos proteínas,

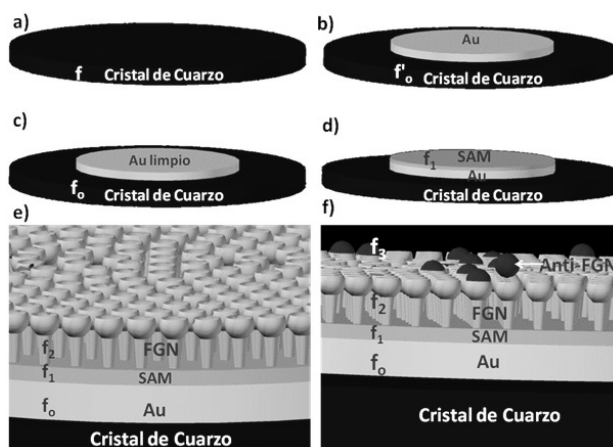


FIGURA 1. Diagrama del proceso de fabricación de las diversas monocapas, y sus frecuencias asociadas, que componen un biosensor de proteínas.

de frecuencia f_3 , una que se encuentra anclada sobre una superficie plana (proteína blanco, ligando o película biosensora) y la otra en una solución (analito o proteína sonda) bajo condiciones de pH neutro, temperatura ambiente y concentración saturada (1.5 mg/ml) [11,12].

2.1.1. Cristales de cuarzo

Se emplearon quince QCMs de corte AT y frecuencia fundamental base f de 20 MHz (International Crystal Manufacturing Co., Inc.), preparados como osciladores de cuarzo. Previo al depósito sobre los substratos de cuarzo, estos se limpiaron en solución piraña 1:3 (una parte de ácido sulfúrico H_2SO_4 en tres partes de peróxido de hidrógeno H_2O_2), se realizaron dos lavados extensos con agua desionizada ($18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) y uno con etanol absoluto (grado reactivo, Sigma). El secado empleado entre dos lavados se realizó con gas nitrógeno de alta pureza (Infra), después de lo cual se procedió a la lectura de su frecuencia fundamental f_o (Fig. 1a).

2.1.2. Depósito y caracterización de electrodos de oro mediante Sputtering

En el depósito de las películas de oro se empleó un sistema de erosión catódica (Sputterig, Denton vacuum desk IV) con un blanco de oro de 99.9999% por periodos de 2, 4, 6 u 8 min, 35 mA y 60 mTorr (muestras MD1 a MD4) y 2, 4, 6 u 8 min, 25 mA y 60 mTorr (muestras MD5 a MD8). La técnica de *sputtering* consiste básicamente en la extracción o erosión de átomos de la superficie de un blanco de interés debido al intercambio de momento con iones que bombardean los átomos de la superficie de dicho blanco. Durante este proceso se produce plasma del material del blanco el cual se deposita sobre un substrato para fabricar una película [13]. El área de la máscara empleada para la fabricación del electrodo de oro fue de 11.6274 mm^2 en todos los casos (Fig. 1b). La forma de la máscara de aluminio fue circular e incluyó dos pistas rectangulares que permiten el contacto con las terminales de lectura (electrodos). En la verificación de la composición y homogeneidad a lo largo de la superficie depositada, así como del espesor, los electrodos fabricados fueron analizados mediante difracción de rayos X a ángulo rasante (XRD, difractómetro Bruker D8 Advanced), microscopia de fuerza atómica (AFM, Thermomicroscopes), microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM, JSM-7401F) y perfilometría (Dektak IIA). Las condiciones buscadas fueron tales que el espesor de las películas de oro, en conjunto con el espesor del cristal de cuarzo, tuviesen una frecuencia fundamental de 20 MHz (correspondientes a un espesor total de $80 \mu\text{m}$).

2.1.3. Preparación de monocapas orgánicas mediante SAM sobre los electrodos de oro

Para fabricar una película de cualquier biomolécula de interés sobre los electrodos depositados (película biosensora), es necesario previamente activar la superficie metálica depositando una monocapa orgánica mediante algún proceso

físico o químico. En este trabajo se utilizó el método de autoensamblado molecular para crear sitios reactivos aminos con la proteína para fabricar la monocapa biosensora. Las moléculas de la solución del SAM cuentan con tres regiones fundamentales, un *grupo funcional cabezal*, que se adsorberá químicamente a la superficie a modificar; un *grupo funcional terminal*, que brindará reactividad para el anclaje covalente de las biomoléculas deseadas; y un *separador del grupo*, formado por las cadenas intermedias de H, C y O, generalmente [14-16]. La activación orgánica de los electrodos de oro, empleada en este trabajo, fue con grupos orgánicos terminales amino-reactivos lo que permitió el anclaje covalente entre las proteínas y los electrodos activados [17] (Ver Fig. 1d). Es decir, el radical amino (NH_2^+) servirá como sitio de anclaje molecular covalente para los sitios activos negativos (COO^-) de las proteínas a inmovilizar. La activación de la superficie se realiza básicamente en tres pasos:

- 1) Monocapas de Mercaptopropiltriethoxisilano $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$, 5 mM (Sigma-Aldrich)
- 2) Hidrolización de monocapas en ácido Clorhídrico HCl, 0.5 M (Sigma-Aldrich)
- 3) Monocapas de Tiocianatopril $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{SSi}$, 5% (Sigma-Aldrich).

Previo a la amino-funcionalización de los electrodos de oro de los QCMs, se realizó una limpieza mediante su inmersión por 10 seg. en solución piraña 3:1 ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4$), lavado abundante con agua desionizada ($18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) y etanol absoluto para erradicar óxidos de oro formados sobre la superficie (Fig. 1c). Una vez lavados los QCMs se procedió a su amino-funcionalización inmediata.

2.1.4. Protocolo de adsorción de proteínas

En la fabricación de las películas biosensoras sobre los electrodos activados se emplearon las proteínas FGN (Sigma-Aldrich) y BSA (Sigma-Aldrich), de peso molecular de 340 y 67 kDa, respectivamente, en concentraciones saturadas (1.5 mg/ml) [11-12]. El protocolo consistió en realizar soluciones de fibrinógeno de humano y de Albúmina de Suero de Bovino (BSA) en solución buffer de fosfato (PBS) a pH 7, temperatura ambiente y por un periodo de 2 hrs, tal que se genere la adsorción espontánea de proteínas sobre los grupos terminales aminos (radicales NH_2^+) de la superficie de oro modificada, con aquellos presentes en las terminales carboxilo (terminal COO^-) de las proteínas (Fig. 1e).

2.1.5. Biosensor de anti-FGN

La evaluación de los QCMs con películas de FGN se realizó empleando un control negativo (BSA, 1.5 mg/ml) y un control positivo (anti-FGN, 1.5 mg/ml) en base PBS (pH 7). Los experimentos de interacción proteína/proteína se llevaron a cabo a temperatura ambiente con un pH neutro y por un periodo de dos horas (Fig. 1f). Para evitar la formación de

multicapas, transcurrido el tiempo establecido se realizaron lavados con PBS y posteriormente con agua desionizada ($18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). Inmediatamente después del lavado se procedió a medir la frecuencia de la interacción proteína/proteína de los QCMs, y empleando la ecuación de *Sauerbrey* se determinó la densidad superficial de masa adsorbida σ . La estabilidad del biosensor en aire y a temperatura ambiente fue monitoreada cada 20 minutos durante las primeras ocho horas; y posteriormente de la hora ocho a la 36, se monitoreó en periodos de 12 horas. Empleamos un frecuencímetro de cuatro canales para el monitoreo del cambio de frecuencia de los biosensores.

2.1.6. Biosensor de anti-BSA

De manera similar, los biosensores con película de BSA fueron evaluados en soluciones saturadas de anti-BSA (150 kDa, control positivo) y anti-FGN (160 kDa, control negativo). En este caso la estabilidad del biosensor fue registrada cada 20 minutos en las primeras cuatro horas; y cada 1.5 horas de la hora 16 a la 24. La última medición se obtuvo en la hora 36.

2.1.7. Medición de la variación de frecuencia de los QCMs

Se empleó un frecuencímetro comercial para la lectura de las frecuencias f , f'_0 , f_0 , f_1 , f_2 y f_3 correspondientes al cristal de cuarzo sin electrodo, con electrodo de oro, con electrodo de oro limpio, con electrodo de oro funcionalizado, con película biosensora de FGN o BSA y correspondiente a la interacción proteína-proteína, respectivamente. La frecuencia f_0 de cada QCM fue tomada como referencia experimental respecto a ese biosensor durante el proceso de medición de la interacción biomolecular. La Fig. 2 muestra esquemáticamente las etapas del experimento de medición de frecuencia de los biosensores fabricados, a través del empleo un frecuencímetro de cuatro canales.

3. Resultados y Discusión

3.1. Electrodo de oro

Para establecer las mejores condiciones de depósito de películas de electrodos de oro sobre los cristales de cuarzo, se usaron cuatro técnicas que rutinariamente se emplean en el análisis de películas delgadas y ultradelgadas: XRD, FE-SEM, perfilometría y AFM. La fase cristalográfica del oro depositada sobre las superficies de cristales de cuarzo fue corroborada a través de difracción de rayos X (muestras MD1 a MD8). La Fig. 3 muestra un difractograma típico de una de las muestras depositadas mediante sputtering (muestra MD5; 2 min, 25 mA y 60 mTorr). Se observó que en todas las muestras (datos no mostrados) se obtuvieron los patrones característicos del oro con fase cúbica centrada en las caras (FCC, face-centered cubic). Mediante la ecuación de *Scherrer* [18] se calculó el parámetro de red, el cual fue alrededor de $a = 4.078$ en todas las muestras [19].

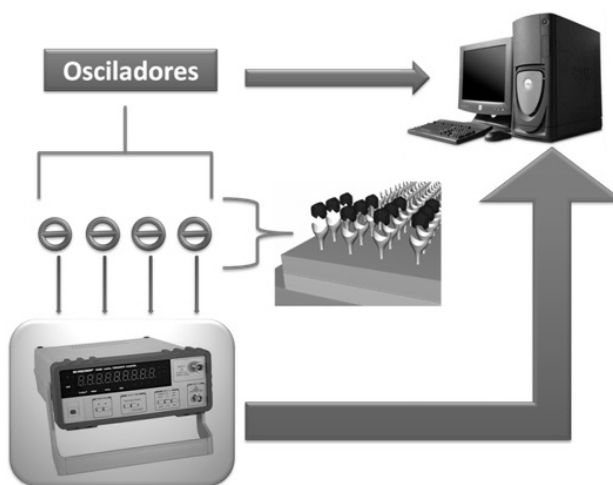


FIGURA 2. Configuración experimental de medición de las frecuencias de los QCMs como un arreglo de biosensores.

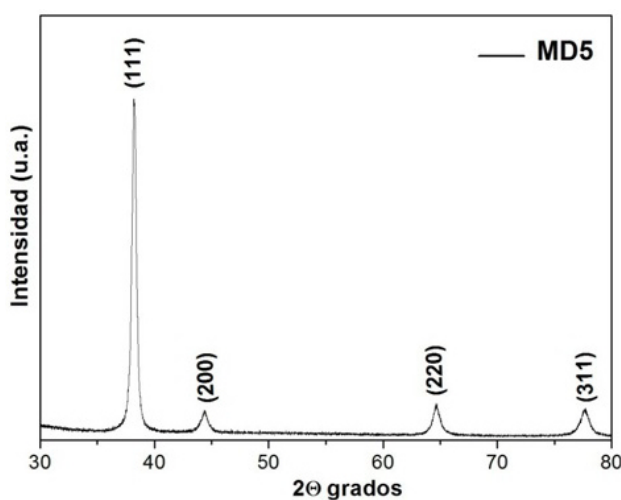


FIGURA 3. Difractograma típico de una muestra de película de oro depositada sobre cristal de cuarzo empleando erosión catódica a RF (muestra MD5).

Para que los cristales de cuarzo en configuración de microbalanzas tuvieran una frecuencia fundamental de 20 MHz fue necesario que el área de 11.6274 mm^2 depositada correspondiese a un cambio de espesor en el cuarzo de 20 nm, lo cual corresponde a su vez a una masa de 487.17 ng. Los análisis de perfilometría y microscopía electrónica de barrido nos permitieron corroborar que las muestras que contaban con este espesor fueron aquellas depositadas en condiciones de 4 min, 25 mA y 60 mTorr. La Fig. 4 corresponde a dos micrografías de barrido en corte transversal de muestras de películas de oro depositadas sobre los cuarzos. En ambas muestras se determinó que el espesor es alrededor de 125 nm para tiempos de 6 min, 25 o 35 mA y 60 mTorr. Las flechas, en las Figs. 4a y 4b, indican la presencia del depósito de oro a lo largo del borde en dirección axial. La presencia de algunas impurezas fue producto de la preparación de las muestras para su observación en el microscopio de barrido.

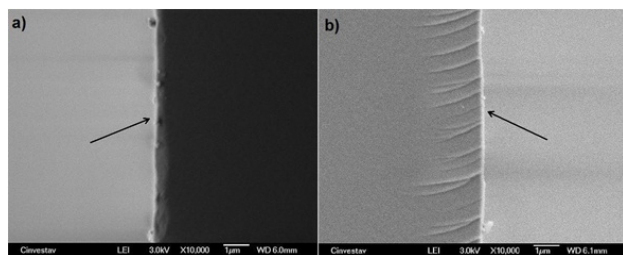


FIGURA 4. Micrográficas electrónicas de barrido de muestras fabricadas empleando erosión catódica a 6 min, 25 o 35 mA y 60 mTorr. a) MD3 y b) MD7.

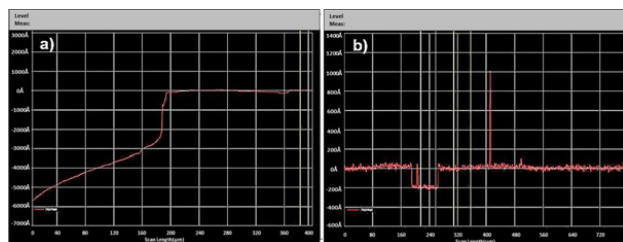


FIGURA 5. Perfilometría de las dos muestras que presentaron el mayor espesor (muestra MD8, Fig. 5a) y menos espesor (MD2, Fig. 5b).

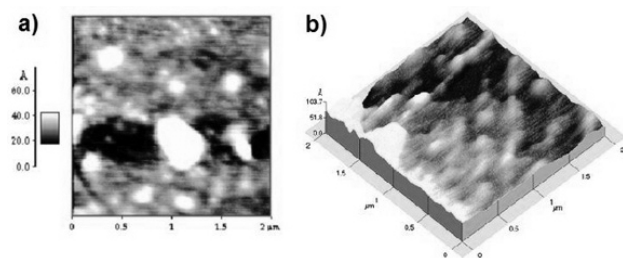


FIGURA 6. Micrografía por fuerza atómica de la muestra MD2. a) Topografía y b) rugosidad media.

Por otro lado, los análisis de perfilometría corroboraron un espesor de 304 nm para la muestra MD8 (Fig. 5a), mientras que la muestra MD2 presentó un espesor de 20.08 nm (Fig. 5b). Dichos espesores correspondieron al mayor y menor valores obtenidos con las condiciones de depósito aplicadas. La diferencia en la forma de los perfiles de las mediciones con perfilometría se debió a la preparación del escalón de la muestra analizada. En el caso de la Fig. 5a, se realizó la lectura sobre el escalón de la película de oro depositada sobre el cuarzo, mientras que en el caso de la Fig. 5b se realizó un rayado sobre la superficie de oro una vez depositada. Ambos métodos de preparación de una película son válidos para su estudio con perfilometría.

Dado que nos interesa conocer si las superficies de los electrodos de oro son altamente planas para obtener una mejor uniformidad de anclaje de las biomoléculas (conformación y orientación) que formen la película biosensora y por lo tanto una mejor señal [20], es que los dichos electrodos se examinaron mediante AFM. Se estimó la rugosidad superficial mediante la raíz cuadrática media (RMS) directamente de las imágenes de AFM empleando el software del

microscopio. La Fig. 6a presenta la rugosidad media de 9.3 Å y la morfología (Fig. 6b) de la superficie del electrodo de oro limpia (muestra MD2).

3.2. Medición de frecuencias y determinación de masa de las monocapas

Cuando se emplean las microbalanzas de cristal de cuarzo como biosensores, el parámetro importante a medir es la diferencia de frecuencias Δf entre dos películas adyacentes; y es mediante la ecuación de *Sauerbrey* que se relaciona con la diferencia de masas Δm . Entonces, aún y cuando se presenten variaciones entre las frecuencias fundamentales f_o de dos diferentes microbalanzas, no se adicionará un error a la lectura de interacción entre la película biosensora y la muestra a detectar (*analito*) debido a que se registraron las correspondientes diferencias de frecuencias. La Fig. 7 muestra los comportamientos típicos de las frecuencias f_o , f_o' , f_1 y f_2 , medidas empleando un frecuencímetro (entradas digitales, 5 V de alimentación, salida a pantalla LCD 8 dígitos y rangos de medición: 1 Hz a 3.5 MHz, 2 Hz a 7 MHz, 4 Hz a 14 MHz y 8 Hz a 28 MHz), correspondientes al electrodo de oro sin lavar, limpio, amino-funcionalizado y con película sensora, respectivamente. La Fig. 7a muestra los resultados experimentales durante el proceso de fabricación de los biosensores con película sensible de FGN y la Fig. 7b con película sensora de BSA. Se observa que el fenómeno de piezoelectricidad para el tipo de corte AT de las microbalanzas de cristal de cuarzo empleadas se presenta durante todo el proceso de fabricación del biosensor. Se registró un incremento en la frecuencia fundamental f_o en todos los electrodos analizados respecto de los correspondientes cuando son lavados con solución piraña (f_o'). En el caso de la película amino-funcional (monocapa caracterizada por f_1) y película biosensora (monocapa f_2) se presentó un decremento en sus

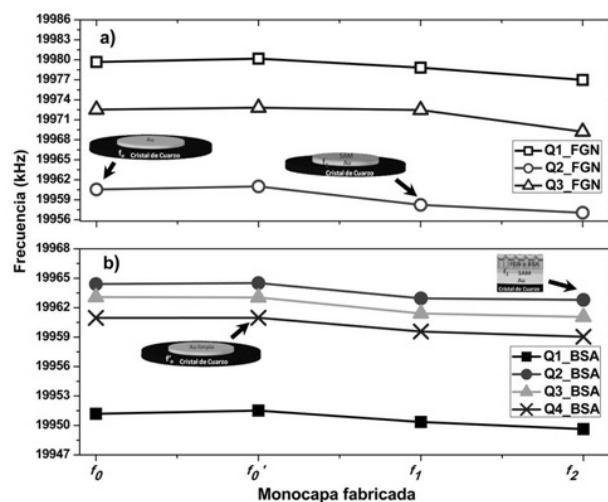


FIGURA 7. Comportamiento de la frecuencia de oscilación de la microbalanza de cristal cuarzo durante las diferentes etapas de fabricación del biosensor.

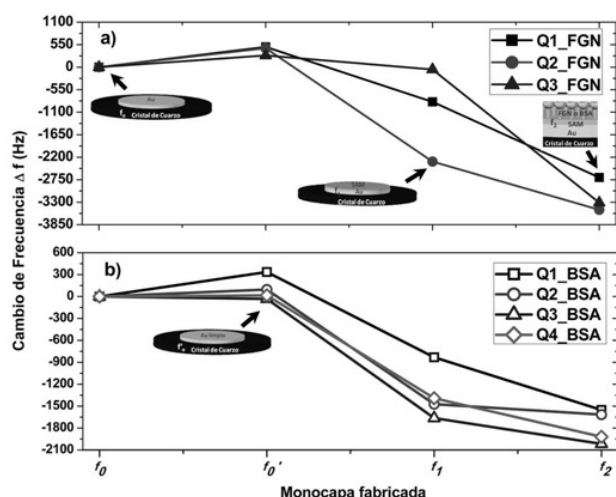


FIGURA 8. Cambio de frecuencia de las microbalanzas de cristal cuarzo durante la fabricación del biosensor.

frecuencias y por tanto un aumento en masa. Se recomienda que si los QCMs con electrodos de oro no son empleados inmediatamente después de la amino-funcionalización, se proceda a su refrigeración a 8°C. Una vez preparados los QCMs como biosensores, es recomendable su uso inmediato.

La Fig. 8 muestra los correspondientes cambios de frecuencias correspondientes a las monocapas fabricadas en los biosensores de la Fig. 7. Dichos resultados están en concordancia con el modelo de *Sauerbrey* que relaciona una disminución de masa con el aumento en la frecuencia del QCM, y viceversa (Ec. 1). La disminución en masa sobre el electrodo, una vez lavados, puede atribuirse a la remoción de óxidos, polvo y grasas sobre la superficie del electrodo cuando estos han sido expuestos a aire, como fue en este caso [21]. Para el caso de la diferencia de frecuencias entre f_1 (SAM/Au/QCM) y f_0 (Au/QCM); y de f_2 (película sensora/SAM/Au/QCM) con f_1 también se obedece la Ec. 1. En estos casos el aumento de masa se debe a las películas amino-funcional y sensible adsorbidas, respectivamente. El tamaño de la proteína FGN (Fig. 8a) cuenta con una masa de un orden de magnitud superior que las correspondientes de los biosensores con película de BSA (Fig. 8b), por lo que se presentó una disminución de frecuencia de entre 1176 Hz y 3256 Hz, mientras que en el caso de una molécula de menor tamaño y peso como BSA la disminución oscila entre 350 Hz y 720 Hz.

En la Fig. 9 se muestra el cambio de la frecuencia entre f_3 y f_2 en función del tiempo para experimentos de interacciones proteína/proteína empleando microbalanzas de cristal de cuarzo con películas de FGN o BSA. En todos los casos se emplearon soluciones saturadas de proteínas que sirvieron como controles positivos o negativos (1.5 mg/ml), considerándose como $t = 0$ minutos la medición de la frecuencia antes de la interacción proteína/proteína (película sensora). Inmediatamente después los biosensores se incubaron durante dos horas en las soluciones de proteína. Posteriormente los QCMs fueron lavados profusamente para eliminar

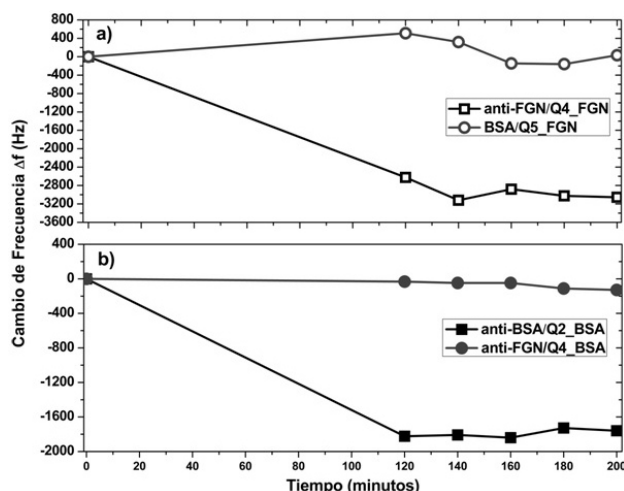


FIGURA 9. Comportamiento de la variación de la frecuencia de los biosensores durante la interacción proteína/proteína con el tiempo (minutos).

las posibles multicapas que pudiesen haberse depositado (interacciones iónicas) sobre los biosensores. En el caso de los biosensores con película de FGN (Fig. 9a) se empleó como control negativo a BSA y como positivo a anti-FGN; mientras que en el caso de los biosensores con película de BSA (Fig. 9b) el control negativo empleado fue la proteína anti-FGN y el positivo correspondió al antígeno anti-BSA.

Las correspondientes interacciones entre películas biosensoras y controles negativos (BSA/Q5_FGN y anti-FGN/Q4_BSA) no presentaron grandes variaciones en la frecuencia dado que presentan una baja constante de asociación K_a entre ellas [22]. Por el contrario, se observan variaciones de ~ 3000 Hz para la interacción altamente reactiva entre anti-FGN y FGN (anti-FGN/Q4_FGN) dado que es una interacción antígeno/anticuerpo con una constante de asociación K_a de $9.15 \pm 2.16 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ [23]. Para el caso de la interacción entre anti-BSA y BSA (anti-BSA/Q2_BSA se registró una variación de ~ 1800 Hz, la cual presenta una constante de asociación K_a de $3.5 \pm 0.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ [24]. Estos rangos se pueden atribuir también al tamaño y peso de los antígenos a los cuales fueron expuestas las películas sensibles de las microbalanzas. Se observa un incremento en la variación de la frecuencia después de los 120 min de exposición de las microbalanzas con la solución analito de proteína (anti-FGN/Q4_FGN y anti-BSA/Q2_BSA). Dicho incremento se debe a la interacción de anti-FGN sobre los respectivos biosensores; a los 140 minutos se observa otro cambio en la frecuencia que podría ser asociado con la pérdida de conformación de las proteínas anti-FGN y anti-BSA. La evolución del cambio de la frecuencia en función de tiempo a partir del minuto 120 se realizó exponiendo los biosensores a condiciones normales de presión y temperatura (20°C), lo que podría ocasionar la presencia de una masa aparente y por tanto un incremento en la variación de la frecuencia al minuto 140. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para la corroboración de esta hipótesis.

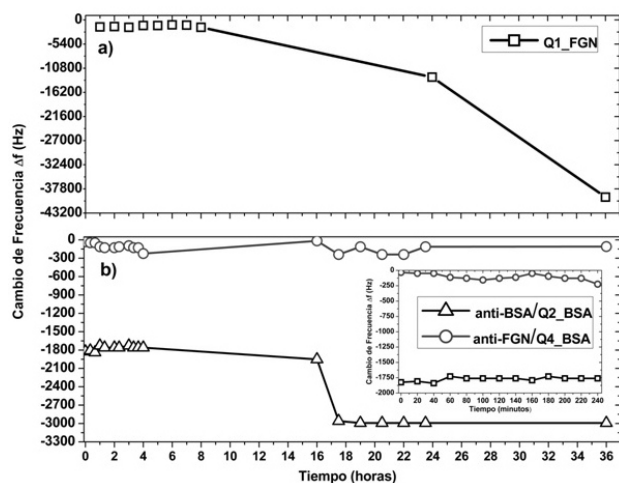


FIGURA 10. Estabilidad de la frecuencia de los biosensores: a) película sensora y b) interacción proteína/proteína.

TABLA I. Cambio en las frecuencias y determinación de la densidad superficial de masa de la interacción proteína/proteína mediante QCMs.

Cristal	$\Delta f_3 = f_3 - f_2$	σ_3
	(Hz)	($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
anti-FGN/Q2_FGN	2,964	3.29
BSA/Q3_FGN	568	0.63
anti-FGN/Q4_FGN	2,941	3.26
BSA/Q5_FGN	112	0.12
anti-BSA/Q2_BSA	1824	2.02
anti-FGN/Q3_BSA	128	0.14
anti-FGN/Q4_BSA	-32	0.04

La Tabla I resume el cambio de frecuencia debida a la interacción proteína/proteína $\Delta f_3 = f_3 - f_2$ (Hz) y la correspondiente variación de densidad superficial de masa σ_3 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) sobre los QCMs después de la interacción proteína/proteína. Esta densidad fue calculada mediante la ecuación de *Sauerbrey* que permite determinar cambios de masas sobre los electrodos considerando la masa depositada como una película rígida. Se observa que la densidad superficial de masa del analito (anti-FGN y anti-BSA, 1.5 mg/ml) para los biosensores de FGN corresponden a 3.29, 0.63, 3.26 y 0.12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, para las microbalanzas Q2_FGN, Q3_FGN, Q4_FGN y Q5_FGN, respectivamente; mientras que para Q2_BSA, Q3_BSA y Q4_BSA se calcularon valores de 2.02, 0.14 y 0.04 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Se puede ver que en el caso de Q3_FGN y Q5_FGN (controles negativos), los valores de la densidad superficial de masa son pequeñas en comparación con los valores obtenidos para Q2_FGN y Q4_FGN (alta afinidad) por lo cual se puede asegurar que sobre los QCM's de control negativo no se presentó interacción proteína/proteína. Esta misma tendencia se observa para los biosensores anti-FGN

/Q3_BSAy anti-FGN/Q4_BSA los cuales tienen un cambio de frecuencia mínimo en comparación con anti-BSA/Q2_BSA (control positivo); entonces para ambos tipos de biosensores se comprueba la especificidad de los biosensores.

El estudio de la estabilidad de la medición de las frecuencias de la películas biosensora (f_2) y de interacción (f_3) con el tiempo, se muestra en la Fig. 10. La Fig. 10a corresponde a la evolución de la película de FGN anclada sobre la superficie aminofuncionalizada de oro, mientras que la Fig. 10b corresponde a la interacción proteína/proteína de películas de BSA con anti-BSA y anti-FGN, respectivamente. Se observa que la variación de la frecuencia de la monocapa autoensamblada de FGN no varía hasta 10 hrs aún estando expuesta al aire. Con ello se garantiza la utilidad de los QCMs fabricados como biosensores hasta por un periodo de 8 h expuestos al aire. Para el caso de la interacción de anti-FGN con BSA se presenta un comportamiento cuasi-estático con el tiempo de medición (anti-FGN/Q4_BSA), mientras que para la monocapa de interacción antígeno/anticuerpo (anti-BSA/Q2_BSA) se presentó una disminución significativa de la frecuencia a las 16 hrs posiblemente debida a la pérdida de conformación a causa de la disminución de humedad en la película sensible al no encontrarse en solución líquida.

4. Conclusiones

Se fabricaron biosensores con películas de FGN y de BSA basados en microbalanzas de cristal de cuarzo para la detección de interacciones proteína/proteína de anti-FGN/FGN y anti-BSA/BSA. Los electrodos de oro, de espesor nanométrico, fueron depositados por la técnica de erosión catódica a radiofrecuencia; mientras que las capas orgánicas, correspondientes a la activación superficial del oro y la película biosensora de FGN o BSA, fueron fabricadas mediante autoensamblado molecular. Se demostró la especificidad de los biosensores con las proteínas anti-FGN o anti-BSA en concentraciones saturadas, empleando el modelo de *Sauerbrey* para la determinación de la densidad superficial de masa de proteína adsorbida sobre el biosensor. Se demostró que la vida útil de las películas sensoras de FGN y BSA es de al menos 8 horas después de su exposición al aire. Así mismo, se presentó un comportamiento estable en aire de las monocapas de la interacción proteína/proteína hasta por un periodo de 12 hrs.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el proyecto No. 105491 (CB-2008, CMB). Los autores agradecen a Ana B. Soto, Rogelio Frago (Departamento de Física, CINVESTAV-IPN), Miguel Luna (SEES, Departamento de Ingeniería Eléctrica, CINVESTAV-IPN), Erika Luna (MICRONA-UV) por el apoyo técnico prestado.

1. L.L. Hood, J.R. Heath, M.E. Phelps ME y B. Lin, *Science* **306** (2004) 640.
2. N. Christodoulides *et al.*, *Clin Chem.* **51** (2005) 2391.
3. R. Kirby *et al.*, *Anal. Chem.* **76** (2004) 4066.
4. F.C. Wardle *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **24** (2006) 963.
5. J.S. Shumaker-Parry, R. Aebersold y C.T. Campbell, *Anal. Chem.* **76** (2004) 2071.
6. A. Arnau, T. Sogorb, Y. Jiménez y J.C. Gómez, *Rev. Colombiana de Física* **33** (2001) 503.
7. S. Muñoz-Aguirre, T. Nakamoto y T. Moriizumi, *Sensors and Actuators B: Chemical* **105** (2005) 144.
8. J.W. Gardner y P.N. Bartlett, *Electronic noses, principles and applications* (Oxford Science Publications, UK, 1999).
9. M.C. Dixon, *J. Biomol. Tech.* **19** (2008) 15.
10. B. Godber *et al.*, *Biosen. and Bioelectr.* **22** (2007) 2382.
11. C. Mendoza-Barrera, *Rev. Sup. Vacío* **10** (2005) 31.
12. F. Vazquez-Hernández *et al.*, *Mater. Sci. Eng. B* **174** (2010) 290.
13. K. Wasa, M. Kitabatake y H. Adachi, *Thin Films Material Technology: Sputtering of Compound Materials* (Springer, William. Andrew Pub., NY, 2004).
14. W.C. Bigelow, D.L. Pickett y W.A. Zisman, *J. Colloid Interface Sci.* **1** (1946) 513.
15. R.H. Tredgold, *Order in Thin Organic Films* (Cambridge University Press, UK, 1992).
16. R.G. Nuzzo y D.L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 4481.
17. C.L. Love, L.A. Estroff, J.K. Hriebel, R.G. Nuzzo y G.M. Whitesides, *Chem. Rev.* **1005** (2005) 1103.
18. B.D. Cullity, *Elements of X-Ray Diffraction* (Addison-Wesley Publishing Company Inc, USA, 2001).
19. Carta cristalográfica 00-004-0784
20. X. Chen, M. Pan, y K. Jiang, *Microelectr.* **87** (2010) 790.
21. H. Ron, S. Matlis e I. Rubinstein, *Langmuir* **14** (1998) 1116.
22. V. Altuzar, C. Mendoza-Barrera, M.L. Muñoz, J. G. Mendoza-Alvarez y F. Sánchez-Sinencio, *Rev. Mex. Fis.* **56** (2010) 147.
23. E. Melvin *et al.*, *Biochim Biophys Acta.* **1768** (2007) 1703.
24. N.H. Chiem and D.J. Harrison, *Electrophoresis* **19** (1998) 3040.