

# Cristales Piezoeléctricos de Cuarzo en Aplicación como Microbalanza QCM

## Quartz Crystals Piezoelectric in Application how Microbalance QCM

Antonio Arnau\*, Tomas Sogorb\*, Yolanda Jiménez\*, Juan Camilo Gómez\*

### **RESUMEN**

**E**n las últimas décadas se ha venido desarrollando el campo de los biosensores, adaptándolos para múltiples aplicaciones tales como: determinación de virus, bacterias, pesticidas, gases (CO<sub>2</sub>) y en general cualquier partícula contra la cual puedan ser diseñados anticuerpos específicos. En el presente artículo exponemos un trabajo con cristales de cuarzo, para los cuales buscábamos aplicaciones que pudieran ser llevadas a un campo comercial. Inicialmente se realizaron mediciones para determinar las concentraciones óptimas de entrecruzadores y anticuerpos para realizar la correcta modificación del cristal, que permitieran detectar partículas de carbaryl (sustancia utilizada en múltiples pesticidas). Luego se expone una revisión y recopilación de diferentes esquemas de inmovilización para unir moléculas a los electrodos de oro sobre la superficie del cristal y algunos procesos de regeneración del mismo. Por último se replantea el esquema inicialmente utilizado y se proponen dos nuevos esquemas para realizar su evaluación.

### **PALABRAS CLAVE:**

Microbalanza

Cristal de Cuarzo

QCM

Biosensores

Piezoeléctrico

·  
· Microbalanza Cristal de Cuarzo  
·  
· Pesticidas  
·  
· Virus  
·  
· Bacterias  
·  
· Inmovilización  
·  
· Regeneración

\* Departamento de bioelectrónica, Universidad Politécnica de Valencia UPV- España. E-mail: [bmjuang@eia.edu.co](mailto:bmjuang@eia.edu.co)

## **ABSTRACT**

*In the last years the biosensor had been suffered great changes, they are useful in differents areas, this can detect particles as viruses, bacterias, pesticides, gases and others substances. In this work, we had use quartz crystals, and then look for commercial applications. Initially we did tests for find optimums concentrations of antibody and cross match that correctly modified the crystal and detect carbaryl. Then, we exposes an extensive recompilation of techniques of immobilization and regeneration. Finally we reconsider the scheme used initially and proposes two new schemes.*

## **KEY WORDS:**

*Microbalance*

*Quartz Crystal Microbalance*

*QCM*

*Biosensors*

*Piezoelectric*

*Pesticide*

*Virus*

*Bacteria*

*Regeneration*

*Immobilization*

## **INTRODUCCIÓN**

Un biosensor lo podemos definir como un sistema capaz de determinar una variable biológica y convertirla a una señal que pueda ser detectada

por un sistema electrónico. Dentro de los sistemas utilizados para construir biosensores podemos mencionar los que se basan en la piezoelectricidad, que componen los piezoimmunosensores. Para la anterior finalidad se utilizan cristales piezoeléctricos dentro de los cuales es muy común encontrar cristales de cuarzo, gracias a su estabilidad en la frecuencia de resonancia, a los cambios de temperatura y algunas otras que no mencionaremos.

Este género de sensores se caracterizan porque vibran a una frecuencia determinada y cuando sobre ellos se deposita alguna masa, la frecuencia de resonancia disminuye en proporción a la masa depositada sobre él. Al medir estos cambios de frecuencia se puede determinar una relación que revele la cantidad de masa depositada. Esta relación fue descrita en 1959 por Sauerbray quien propuso la siguiente ecuación:

$$\Delta F = - 2.3 \times 10^{-6} F^2 \Delta M/A \quad (1)$$

Donde:  $\Delta F$  es el cambio de la frecuencia fundamental del cristal,

$F$  es la frecuencia de resonancia del cristal,

$A$  es el área cubierta (electrodos del cristal donde se depositan las masas) y

$\Delta M$  es la masa depositada.

Hoy en día la técnica comienza a ser ampliamente difundida dado que permite mediciones bastante pequeñas, actualmente su límite de detección se sitúa en  $10^{-12}$  g pero solo se logra en condiciones optimas, generalmente se encuentran aplicaciones próximas a los  $10^{-9}$  g. En el medio encontramos los sensores como unos discos de cuarzo que sobre su superficie tiene depositado un electrodo de oro circular de menor diámetro que el cuarzo, el espesor de los discos de cuarzo puede variar según la frecuencia de resonancia que se desee obtener para el sensor, de esta manera un sensor que tenga por frecuencia de resonancia 10 mega hertz tendrá un espesor de 300 micras y un diámetro de 10 milímetros.

**Figura 1**



Los cristales piezoeléctricos se pueden desempeñar en 2 tipos de medios: gaseosos o líquidos; el gaseoso algunos lo llaman vacío pero puede ser el medio ambiente, en líquido es una medida dentro de una solución de análisis. En nuestro caso se trabajó en aplicaciones de medios líquidos, que aunque son un poco más complicadas podrían ser realizadas exitosamente dado el instrumento de control diseñado por nuestro grupo de investigación. Las aplicaciones que buscábamos desarrollar comprendían la detección de moléculas de carbaryl presentes en muestras de agua o la detección de una cepa de bacterias presentes en la cerveza las que otorgan turbidez a la misma; la detección de carbaryl para confirmar la presencia de pesticidas en agua fue la opción desarrollada. Nuestro trabajo se apoyó en otro trabajo realizado anteriormente, una tesis doctoral en la cual se desarrollaron los anticuerpos monoclonales contra el carbaryl.(2)

La medición con cristales piezoeléctricos utiliza un biosensor basado en anticuerpos los cuales detectan la concentración del antígeno tanto por un ensayo competitivo indirecto o un ensayo directo. Los sensores actúan como un sistema oscilante con un adsorbente en su superficie que interactúa selectivamente bien sea con el analito o con los anticuerpos contra el analito, dependiendo del tipo de ensayo. Cuando el analito se adsorbe sobre el cristal se aumenta la masa del cristal y se presenta un decremento proporcional en la resonancia de la frecuencia de oscilación, esto en el caso del ensayo directo. Por lo contrario, cuando es el anticuerpo quien se pega

al cristal hablamos de un ensayo competitivo indirecto, que consiste en unir un antígeno modificado al cristal y en la solución de análisis se ingresan los anticuerpos para que si hay antígeno presente en la solución los anticuerpos se unan a él y si no lo hubiera se unen al antígeno presente en el cristal e igualmente se disminuya la frecuencia de resonancia.

En este trabajo utilizamos el segundo esquema, pues como nuestro antígeno era demasiado ligero no se presentaban cambios apreciables de la frecuencia de resonancia en el ensayo directo, pero si eran apreciables en el ensayo indirecto dado que el anticuerpo era una molécula mucho más pesada. El procedimiento exacto utilizado consistía en tomar el cristal y modificar la superficie del electrodo de oro con cistamina con el fin de que esta se uniera por su extremo sulfhidrilo al oro y en su otro extremo amino pudiera unir una proteína que contenía los antígenos modificados (conjugado) a los cuales se iban a unir los anticuerpos, según los parámetros del ensayo competitivo. Ver Fig. 3.

Tras haber utilizado este esquema de inmovilización realizamos múltiples medidas para determinar las concentraciones óptimas de conjugado y anticuerpo para la medición que se pretendía realizar. Posteriormente evaluamos otras alternativas de unir el conjugado al electrodo de oro entre las cuales podemos mencionar la inmovilización directa, avidin-biotin, monocapas auto ensambladas, proteína A. Como complemento a los diferentes métodos de inmovilización también era importante determinar como podría ser posible la regeneración del cristal que consistiría en separar ya sea los anticuerpos que se unieran al cristal tras haber realizado una medida ó retirar todo el material que estuviera unido al cristal tras el ensayo. Generalmente para lograr esta finalidad se utilizan cambios de PH extremo a partir de soluciones de Glicina- HCl, NaOH, Urea o solución de Dicromato; aunque en otras ocasiones se utilizan moléculas como el "thiocyanate" que separa el anticuerpo del antígeno, y en algunas otras ocasiones utilizan un péptido que compete

por los sitios activos del anticuerpo pero tras haberse unido también se puede separar rápidamente del anticuerpo dada su baja constante de afinidad. Todos estos métodos en mayor o menor medida logran su objetivo, pero consigo llevan inmersas algunas ventajas o desventajas sobre las otras metodologías y estas varían según el experimento que realicemos y lo que pretendamos de él. Por último, al final del artículo nos planteamos el interrogante de abandonar el esquema inicial en donde utilizábamos el conjugado para unir los antígenos al electrodo y nos planteamos la posibilidad de obviar este paso para unir más directamente el antígeno al electrodo de oro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Protocolo de modificación:

- 1 Adsorción de la cistamina (60 minutos)
- 2 Lavado con PBS (5 minutos)
- 3 Adsorción del conjugado hasta estabilización de la frecuencia (aprox. 60 minutos)
- 4 Lavado con PBS (5 minutos)
- 5 Adsorción de la BSA hasta estabilización de la frecuencia (30 minutos)
- 6 Lavado con PBS (5 minutos)
- 7 Adsorción del anticuerpo hasta estabilización de la frecuencia (60 minutos)
- 8 Lavado con PBS. (5 minutos)

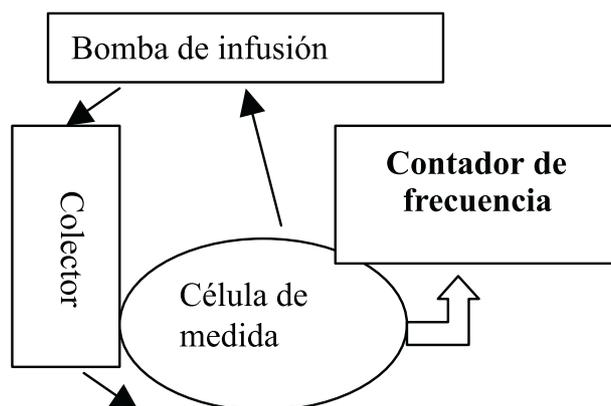
### Descripción del sistema de medida:

1. Una célula de medición: en la cual se encontraba alojado el cristal, expuesto a la solución únicamente por una de sus caras. En la célula había una tubería de entrada y otra de salida por donde entraban y salían las soluciones a las que se exponía el cristal. También hay 2 pequeños orificios por donde salen los conec-

tores de los electrodos al contador de frecuencia.

2. Un recipiente recolector: allí era donde se introducían y retiraban las soluciones a las cuales se sumergía el cristal. (se realizaba por medio de una jeringa)
3. Una bomba peristáltica: la cual hacía circular la soluciones a través de todo el sistema
4. Las mangueras de unión de todos los componentes anteriormente citados.
5. Un contador de frecuencias

Figura 2



### Reactivos Utilizados:

1. Buffer fosfato 10 mM pH 7.2-/.5 0.135 M de NaCl (PBS)
2. Conjugado OVA-CNA 1.2 mg/ml en PBS (sln original 26.6 micro molar), sln 210 nM
3. Anticuerpo LIBCNH36 3.1 mg/ml (solución original 20.6 micromolar), sln 530 nM
4. Solución de cistamina: 0.0044g de Cistamina Clorhidrato en 1 ml de agua bidestilada
5. Solución 200 nM de anticuerpo.

### Planificación de mediciones:

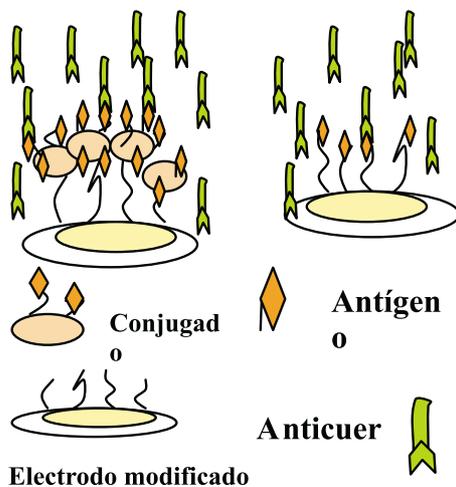
En el siguiente cuadro se presentan las mediciones planeadas a realizar, el símbolo de aprobado esta presente en las mediciones que se llevaron

a cabo, las X no se realizaron pues se planteo la posibilidad de replantear el esquema de la medición. Concentración nanomoles.

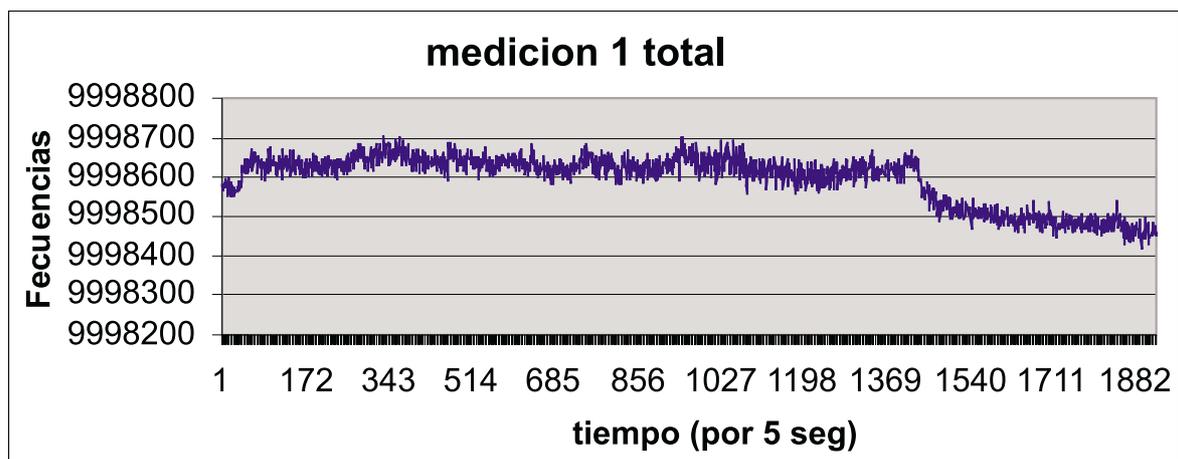
| -Conj | Ab® | 210 | 100 | 50 | 10 | 5 |
|-------|-----|-----|-----|----|----|---|
| 530   | ö   | ö   | ö   | ö  | ö  | X |
| 200   | X   | X   | X   | X  | X  | X |
| 100   | X   | X   | X   | X  | X  | X |
| 20    | X   | X   | X   | X  | X  | X |
| 5     | X   | X   | X   | X  | X  | X |

### Esquemas de inmovilizacion:

Figura 3



Gráfica No. 1



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Mediciones:

Los resultados los podemos observar principalmente en la grafica 4, en donde se pueden ver los cambios de la frecuencia versus el tiempo.

En la gráfica No. 1 podemos observar todos los datos de un procedimiento completo, en el cual se aprecian todas las etapas del proceso. Los primeros 60 datos corresponde al instante donde se conectaba el equipo de medición y esa ligera depresión no representa ninguna información útil. A partir del dato 70 podemos ver que la frecuencia tiene un comportamiento mas o menos estable hasta el dato 1400, aunque si observamos estrictamente esta región podemos encontrar unos segmentos donde se observan unos ligeros incrementos y posteriormente decaen nuevamente a la línea base, estos sucesos pueden ser debidos a: los cambios de la solución circulante, a que elementos se peguen débilmente a la monocapa y luego sean retirados con el lavado de PBS, sean sucesos normales dentro de la variación estándar de la frecuencia ó quizás por otros factores desconocidos. Sin embargo es necesario revisar y consultar estos sucesos.

A partir del dato 1400 es donde realmente podemos observar algún cambio importante, que es el instante donde se une el anticuerpo, este paso si es bastante apreciable pues la masa del anticuerpo ya es considerable y realmente ejerce un peso sobre el cristal, modificando su frecuencia de resonancia aproximadamente en 150 hertz. Es importante aclarar que en este ensayo la medición se realizó con la intención de saturar el cristal y de esta manera se obtuvo el máximo cambio de frecuencia posible. Las concentraciones exactas de anticuerpo y conjugado a las cuales el ensayo deja de estar saturado no fueron determinadas debido a que los ensayos fueron suspendidos mientras se evaluaban nuevas metodologías de inmovilizar el conjugado a los electrodos de oro, lo único que podemos asegurar es que a una concentración de 50 nanomolar de anticuerpo continuaba siendo una concentración de saturación; aunque la medición de 10 nanomolar fue realizada no se tiene en cuenta para afirmar nada, pues se preveía que el anticuerpo utilizado en ella ya se había desnaturalizado. La desnaturalización del anticuerpo fue debida a que el anticuerpo utilizado fue congelado y descongelado en varias oportunidades. Para evitar la desnaturalización del anticuerpo es recomendable realizar todas las mediciones en un mismo día, incluso es útil para disminuir posibles causas de error.

Tras las mediciones anteriores nos planteamos unir directamente el antígeno al electrodo de oro obteniendo un nuevo esquema de inmovilización Fig. 3 con lo cual se simplifica el protocolo de medición y la complejidad de cada medición, permitiendo descartar mas causas de error.

### **Inmovilizaciones:**

Dentro de los múltiples esquemas de inmovilización podemos encontrar muchas variables como: la estabilidad de la unión, nivel de empaquetamiento, la orientación que se logra, el tamaño y peso de la capa inmovilizada, la incapacidad de unión a uniones inespecíficas, la resistencia que pueda tener a ambientes agresivos, la sencillez o

complejidad del protocolo de inmovilización, la reproducibilidad de las capas, la cantidad de analito que sea capaz de unir y en general otras tantas consideraciones que son importantes en el momento de escoger una metodología determinada. Por estas razones no se puede afirmar un método como el indicado y presentamos algunos de los investigados.

#### *Inmovilización directa:*

La inmovilización es física y se produce debido a las propiedades hidrofóbicas, es sencilla de realizar pero fácilmente se puede hidratar dado que sus enlaces no son muy fuertes. (3)

#### *Inmovilización con Avidin-Biotin:*

El sistema actúa como un puente de anclaje entre la molécula de interés y el electrodo de oro. El sistema se puede implementar como una capa de tiol a la cual se unen las moléculas de avidin y luego a esta capa se une el analito que tiene unido la biotina, aunque también se puede hacer directamente pero parece ser que aquella metodología es un poco menos efectiva. Aunque el enlace no alcanza a ser un enlace covalente se sabe que es bastante fuerte y que puede resistir a cambios fuertes de PH. Las inmovilizaciones logradas con Avidin-Biotin logran una buena reproducibilidad pero en algunos casos pueden ser superadas por otros métodos.(4) Ambas moléculas son comerciales y bien documentadas pero son costosas.

#### *Inmovilización monocapas auto-ensambladas:*

Este tipo de configuraciones son obtenidas cuando se sumergen un sustrato apropiado dentro de una solución de surfactante y un solvente orgánico, el tipo de monocapas están representadas principalmente por disulfidos, sulfidos y por tiol, los mas estudiados son los alkanotioles, al utilizar cadenas alkyl de mas de 10 átomos de carbono permiten obtener capas muy ordenadas con pocos defectos y al mismo tiempo poseen grupos funcionales en su otro extremo que permi-

ten unir biomoléculas. Las uniones inespecíficas con los tioles parece ser suficientemente baja, aun así es cierto que se pueden presentar algunas uniones inespecíficas pero hay propuestas de que utilizan BSA (se producen todas las uniones inespecíficas que eran posibles y luego se adiciona el analito) para bloquear estos posibles sitios de unión y que de esta manera no se aprecian adicionales uniones inespecíficas. (3) En algunos casos en los que se utiliza mercaptoundecanol los resultados son muy buenos pero es necesario esperar bastante tiempo pero también la capa permanece estable incluso durante semanas (4). Otro aspecto es que los reactivos para formar la monocapa con mercaptoundecanol no se encuentran comercialmente por lo que deben ser sintetizados en el laboratorio y algunos de los solventes utilizados pueden ser tóxicos.

Otra opción es una monocapa con DSP (succinimidilpropionate) el cual es un ester que puede generar monocapas debido a su grupo disulfuro, el grupo NHS es remplazado por el grupo amina de una proteína dada (4). Con este recubrimiento es necesario hacer todas las pruebas el mismo día, pues pierde su actividad rápidamente. En este mismo estudio, cuando comparan 4 métodos llegan a la conclusión que el DSP produce una buena reproducibilidad.

Algunas desventajas de estos métodos están dadas por los protocolos empleados, los cuales son un poco complicados.

En las monocapas auto ensambladas podemos encontrar muchos conceptos que básicamente dependen de la molécula utilizada por lo cual no entraremos a profundizar específicamente. Pero en términos generales poseen buenas características.

### Proteína A:

Es bastante frecuente encontrar en la bibliografía que se utiliza la proteína A para unir anticuerpos al electrodo de oro, pues se afirma que al-

canza capas organizadas con suficientes grupos funcionales para unir los anticuerpos y adicionalmente estos se unen por su segmento Fc a la proteína A y de esta manera los sitios activos del otro extremo quedan direccionados y disponibles para unirse al antígeno (Con esta forma de unir los anticuerpos se afirman optimizar el número de sitios activos disponibles para la unión del antígeno. La máxima unión de los anticuerpos a la proteína A, se produce en el punto iso-eléctrico de esta, el cual se encuentra a un pH de 5.1. La constante de asociación de la proteína A es  $10^8 \text{ M}^{-1}$  debido a las fuerzas de van Waals, esta es la constante de unión al oro(5), en otro trabajo (6), mencionan que al introducir un grupo tiol (proveniente de la cisteína) en el dominio 5B perteneciente a la proteína A (La proteína posee 5 dominios que unen anticuerpos por su región Fc, los dominios son E,D,A,B y C) pueden potenciar su afinidad y mayor estabilidad en la unión de anticuerpos.

En otros trabajos se asevera que en cuanto a cristales piezoeléctricos, quien mejor se comporta en: sensibilidad, reusabilidad y estabilidad es la proteína A (6) (5) (7).

Es interesante el artículo de Konig y Gratzel (8), pues afirman que tras haber inmovilizado el anticuerpo y secar la superficie, almacenaron el cristal durante 8 semanas y este permanecía estable y sin detectable pérdida de actividad.

Un aspecto que falta referenciar mejor se refiere a las uniones inespecíficas que se puedan presentar debido a la proteína A. En el estudio de Antonio Arnau sobre el sensor de cuarzo se habla de que es necesario lograr una unión más fuerte de la proteína A al cristal.

Tras exponer las metodologías de inmovilización exponemos las siguientes conclusiones:

1. Determinar un esquema de inmovilización no es fácil debido a que cambia con aspectos tales como la aplicación que se pretende, las moléculas con las cuales va a interactuar, el

medio en el que se va a trabajar y los objetivos que se persigan con ella.

2. Los alkanotioles parecen ser moléculas adecuadas para crear monocapas, pero es necesario profundizar más en este tema, pues existen múltiples moléculas de este tipo.
3. Dentro de los alkanotioles encontramos el mercaptoundecanol, molécula que posee un tamaño adecuado y según lo consultado se comporta bien para organizar SAM (self-assembled monolayers).
4. La proteína A también parece ser una buena candidata, aunque como todos los anteriores esta sometida a múltiples opiniones. Para hacerla viable es mejor utilizar otro compuesto como un alkanotiol que permita unirla más fuertemente al electrodo de oro, debido a que la adsorción es una manera muy débil de unirla al electrodo de oro.
5. Últimamente, la metodología más utilizada ha sido la de combinar varios métodos, de esta manera se hace uso de las ventajas de cada uno de ellos para obtener mejores resultados.
6. La inmovilización directa es un método que debe ser descartado, debido a las débiles uniones que se logran con él y que probablemente es ineficaz cuando se utilizan procesos de regeneración.
7. Las uniones con avidin-biotin aun son muy utilizadas en algunas investigaciones, pero no es muy clara su efectividad. Lo que sí parece claro, es que permiten bastantes uniones inespecíficas.

## Regeneración:

Es importante hablar de la regeneración de los cristales por que de esta manera se reducen aun más los costos de la técnica, no solo en el aspecto de reutilización del cristal, sino también sobre el manejo de materias primas costosas como los anticuerpos o las enzimas, de las cuales es necesario optimizar su uso. También se convierte en una metodología más práctica en la cual un

mismo sensor se pueda utilizar en diferentes oportunidades evitando repetir, en muchas ocasiones, un protocolo de inmovilización. En cierta proporción también contribuye a mejorar las medidas, esto debido a que, si el protocolo de inmovilización de un anticuerpo es el mismo en cada una de las ocasiones, el resultado será diferente y se inmovilizarán diferentes cantidades de proteína en cada cristal. Por último, al regenerar el sensor, se da un paso más a que el sensor deje de convertirse en un sistema de laboratorio y permita ser utilizado en el campo de trabajo.

Debe tenerse en cuenta que hablar de regeneración no es un tema sencillo, debido a que aun hay diferentes problemas por resolver. Fundamentalmente debe dejarse claro que en la actualidad no existe un esquema estandarizado que regenere el cristal y no tenga consecuencias sobre su actividad, algunos métodos son mejores que otros y producen resultados satisfactorios, pero todavía dejan bastante que desear. Por otro lado, debido a que no todas las inmovilizaciones son iguales, hay que definir en que región se desea regenerar, por ejemplo: separar el antígeno del anticuerpo, separar el complejo anticuerpo-antígeno de la monocapa o retirar toda la monocapa; o en las ocasiones cuando quien se une a la monocapa es el antígeno, se obtienen nuevas opciones y combinaciones. También hay que tener muy presente que no todas las inmovilizaciones se ven afectadas por igual frente a cada una de las diferentes opciones de regeneración, por lo que hay que seleccionar una que sea óptima según nuestro esquema. Por último, no podemos olvidar los esquemas de inmovilización, dado que estos están bastante ligados con el problema de la regeneración, por ejemplo la monocapa que soporta las biomoléculas también debe ser resistente al protocolo de regeneración y mantener su estabilidad e integridad para lograr que las mediciones posteriores a la regeneración continúen siendo reproducibles, de lo contrario la regeneración acarrearía más perjuicios que beneficios.

Actualmente se utilizan múltiples protocolos para regenerar, entre ellos podemos mencionar:

### Glicina-HCl:

Es uno de los métodos que se aprovecha de cambios bruscos en el pH, se encuentran diferentes concentraciones y valores de pH a los que se utiliza la Glicina-HCl, pero comúnmente la concentración mas encontrada en la bibliografía es 100mM Glicina-HCl (pH 2.1). Para esta metodología es importante aclarar que a través de los diferentes trabajos se encuentran variadas opiniones de su efectividad para liberar los enlaces ó su agresividad para dañar el material que aun queda unido al cristal.

Storri y colaboradores(4) afirman que con la glicina obtienen buenos resultados principalmente con la avidin-biotin y luego con el DSP, y una regeneración pobre con el tiol dextran, en las cuales se separaban anticuerpos de las capas creadas sobre el electrodo de oro; en otros casos se utiliza Glicina-HCl para regenerar un sensor cubierto con proteína A, se afirma que el antígeno fue desplazado del anticuerpo, pero al regenerar el cristal la frecuencia no retorna a su valor inicial, al parece debido a que la proteína A adsorbía un poco de glicina, pero luego de poco tiempo la frecuencia se volvía a estabilizar y reutilizaban nuevamente el sensor(5). En definitiva, la Glicina-HCl no revierte totalmente la unión de Ag-Ab, pero si logra revertir un porcentaje aceptable (8); en ocasiones pueden quedar fragmentos de glicina unidos al cristal, pero hay un punto donde esto se torna estable y es posible utilizar el cristal.

### NaOH:

Esta es otra de las metodologías que se basan en cambios de pH para regenerar los cristales. En esta ocasión se somete el cristal a un pH muy básico para lograr liberar las uniones menos estables, pero en ocasiones es posible fragmentar uniones que deseamos conservar (9). La concentración de 100 mM de NaOH es una de las más comúnmente utilizadas (9) (10).

### Urea:

En múltiples ocasiones se ha descrito que someter el cristal a urea puede retirar gran porción de

los antígenos unidos, pero de igual forma se aclara que disminuye rápidamente la vida útil de un sensor, pues sigue siendo un medio fuerte. Este método es uno de los pocos que relativamente fácil, permite retirar material del cristal en un porcentaje aceptable. Pero finalmente termina dañando la monocapa. Es posible utilizar este tipo de regeneración en un promedio de 8 regeneraciones.

### Thiocyanate:

Se afirma que utilizando tiocianato (0.5 M, pH 5.1) es posible separar un antígeno de un anticuerpo (11). Según los resultados obtienen que el tiocianato únicamente afectaba el anticuerpo en un 6% y regeneraba el 82% de los enlaces pero quedaba bastante cantidad remanente de la enzima utilizada en este trabajo sobre el cristal y producía un background bastante alto (uniones inespecíficas, que corrían el riesgo de incrementar falsas mediciones). El background que se crea podría ser variable dependiendo del tipo de antígeno utilizado por lo que es interesante estudiar esta posibilidad.

### Competición de péptido:

Este método de regeneración se basa en que utilizan un péptido pequeño que compite por los sitios activos del antígeno, pero también por su tamaño el péptido tiene baja constante de afinidad y prontamente se separa, dejando el sitio activo nuevamente libre. Esta técnica incrementa a 18 o 20 ciclos el uso de un mismo sensor, dicen los autores que desarrollaron este trabajo, que con esta metodología se lograba la total desorción del antígeno unido al anticuerpo sin resorber el antígeno. Al incrementar la vida útil de un cristal se gana tiempo y anticuerpo específico para preparar nuevos cristales, aunque también hay que tener en cuenta que es necesario fabricar un nuevo péptido, el péptido de competición, que en cierto modo también incrementa el costo de cada ensayo.

### Retirar cualquier recubrimiento:

Ocurren casos en que regenerar un sensor pueda significar retirar todo lo que haya unido a él. Pero

en algunos otros casos se habla de regenerar con otros métodos, y cuando estos vayan perdiendo efectividad porque la capa ha estado sometida a muchos lavados, se retira todo el material sobre su superficie y nuevamente realizan un protocolo de inmovilización completamente nuevo.

Para limpiar el cristal de todo lo que tenga unido lo sumergen en una solución 1.2N NaOH luego en 1. 2N Cl. seguido de una inmersión en HCL concentrado y en cristales que sean difíciles de limpiar se tratan con solución limpiadora de dicromato y se obtiene prácticamente un cristal nuevo. (5)

*Otras soluciones no tan exitosas:*

1. NaOH 10 mM
2. 50% etanol (10)
3. 75% metanol (10)
4. 10 mM HCl
5. 100 mg/l atrazina (10)
6. 0.2 M glicina hidrociorada
7. 0.2 M etanolamina (8)

## **CONCLUSIONES:**

1. Los métodos de regeneración tampoco son estándares, y se puede afirmar que aun no se dispone de una metodología que sea completamente eficiente y no afecte las especies inmovilizadas.
2. Los métodos que utilizan cambios en el pH dependen mucho de que tan bien estén inmovilizadas las moléculas al electrodo de oro, pues si son enlaces débiles rompen todos los enlaces.
3. Parece muy claro que cambios en el pH por debajo de 4.5 y por encima de 11.8, desnaturalizan los anticuerpos y dañan algunas moléculas; por lo cual regenerar con Glicina-HCl no es muy adecuado.
4. Esquemas como la inmovilización directa no permiten la regeneración con Glicina-HCl dado

que como posee enlaces muy débiles, cualquier tipo de material es retirado.

5. Es necesario buscar mas posibilidades de regenerar dado que las hasta ahora encontradas no son las mas adecuadas o no son las mas conocidas y estudiadas.
6. En algunas ocasiones es mejor utilizar un cristal que ha sido regenerado en 1 u 2 ocasiones, pues ya el cristal es bastante estable y no va a presentar nuevas uniones inespecificas.

## **NUEVOS ESQUEMAS**

Tras evaluar los esquemas de inmovilización seguidos en las primeras ocasiones, se llego a la conclusión de que quizás podría ser mas fácil y posiblemente obtener igual efectividad, inmovilizando directamente los haptenos en la superficie del electrodo de oro. Ver Figura 2.

Para unir los haptenos inicialmente se proponen 2 opciones:

1. La primera consiste en utilizar la cistamina como una cadena corta que se una al electrodo de oro por medio de su extremo sulfhidrido y en su otro extremo con el grupo amino reaccione con el grupo carboxilo del hapteno y se forme un enlace amida covalente
2. La segunda opción parte de la propuesta anterior, consiste en unir un reactivo bifuncional a la cistamina; el objetivo es lograr distanciar la interacción especifica antígeno-anticuerpo del electrodo de oro, a la vez que exponer ordenadamente las moléculas de Ag al Ac. Con esto se pretende minimizar los impedimentos estericos y las posibles uniones inespecificas del anticuerpo al electrodo de oro.

La *cistamina* es frecuente encontrarla en algunos trabajos donde se utiliza para crear una monocapa auto ensamblada, pero no es la molécula mas común. Puede deberse a que su estructura solo posee 2 átomos de carbono y forma una cadena muy corta y se utilizan preferentemente tiocom-

puestos de mayor longitud. Sin embargo la cistamina puede formar monocapas ordenadas y fuertemente unidas al electrodo de oro. La cistamina no es complicada de utilizar y se encuentra disponible comercialmente.

El reactivo bifuncional utilizado es el ASBA (4-(p-Azidosalicilamido) butylamine), una molécula de mediano tamaño que permite crear un puente de unión un poco mas grande entre el electrodo de oro y el hapteno, este compuesto lo seleccionamos debido a que su extremo azida fenil hidroxilo reacciona con grupos amino como el de la cistamina, y su otro extremo amino reacciona con los grupos carboxilo del hapteno.

Las reacciones propuestas crean enlaces covalentes para unir fuertemente las moléculas que comprenden la monocapa, pues el propósito es que se pueda regenerar la superficie del cristal, incluso utilizando medios agresivos como los cambios bruscos de pH. Siempre y cuando las moléculas unidas al oro no dependan de su actividad biológica es posible utilizar los cambios bruscos de pH, por ejemplo los anticuerpos sufren bastante con estos cambios de pH y se desnaturalizan, pero el hapteno utilizado solo depende de su conformación estructural y esta se mantiene.

## **AGRADECIMIENTOS:**

Es importante reconocer el gran apoyo y confianza que nos brindó la Universidad Politécnica de Valencia, incluyendo igualmente al personal del Laboratorio Integrado de Bioingeniería como otra dependencia de la Universidad.

## **REFERENCIAS:**

1. Skladal P, Minunni M, Mascini M, Kolar V, Franek M. Characterization of monoclonal antibodies to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a piezoelectric quartz crystal microba-

- lance in solution. J Immunol Methods. 1994 Nov; 176 (1): 117-25.
2. Abad A. Producción de anticuerpos monoclonales y desarrollo de inmunoensayos para el plaguicida carbaryl. Laboratorio integrado de Bioingeniería. Universidad de Valencia. 1998.
3. Tombelli S, Mascini M. Piezoelectric Quartz Crystal Biosensor: Recent Immobilisation Schemes. Analytical Letters 2000; 33 (11): 2129-51.
4. Storri S, Santoni T, Minunni M, Mascini M. Surface modifications for the development of piezoimmunosensors. Biosens Bioelectron. 1998 Mar; 3 (3-4): 347-57.
5. Guilbault GG, Hock B, Schmid R. A piezoelectric immunobiosensor for atrazine in drinking water. Biosens Bioelectron. 1992; 7(6): 411-9.
6. Ren X, Kobatake E, Aizawa M. A new type of reusable piezoimmunosensor fabricated by a recombinant IgG-binding protein. Analyst 2000; 125: 669-71.
7. König B, Gratzel M. A novel immunosensor for herpes viruses. Anal Chem. 1994 Feb; 66 (3): 341-4.
8. König B, Gratzel M. Analytica Chimica 1993; 280: 37-41.
9. Skladal P, Minunni M, Mascini M, Kolar V, Franek M. Characterization of monoclonal antibodies to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a piezoelectric quartz crystal microbalance in solution. J Immunol Methods 1994 Nov; 176 (1): 117-25.
10. Steegborn C, Skladal P. Construction and characterization of the direct piezoelectric immunosensor for atrazine operating in solution. Biosens Bioelectron 1997; 12 (1): 19-27.
11. Claycomb RW, Delwiche MJ. Biosensor for on-line measurement of bovine progesterone during milking. Biosens Bioelectron 1998 Nov; 13 (11): 1173-80.