

## Desarrollo de biosensor piezoelectrico para diagnóstico de enfermedades

*Zalazar, Martín*

AUTOR: Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Entre Ríos, Ruta provincial N° 11 - Km 10, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

CONTACTO: [martinzalazar@bioingenieria.edu.ar](mailto:martinzalazar@bioingenieria.edu.ar)

### Resumen

La microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) es un dispositivo altamente sensible a las pequeñas variaciones de masa que ocurren en su superficie. Un biosensor puede definirse como un dispositivo analítico en el que un receptor biológico es inmovilizado sobre la superficie de un transductor; cuando un analito diana es reconocido por el receptor biológico, la interacción bioquímica es directamente convertida por el transductor en una señal cuantificable. Los biosensores se han adaptado a múltiples aplicaciones: determinación de virus, bacterias, pesticidas, gases y en general, cualquier partícula contra la cual puedan ser diseñados receptores específicos. Las QCMs como biosensores son parte de una técnica de monitoreo rápido, bajo costo, alta reproducibilidad y bajos límites de detección de la sustancia de interés. El presente proyecto de investigación propone desarrollar un biosensor para la determinación de marcadores bioquímicos o moleculares para la evaluación de la salud ocular. Esta propuesta se basa en la integración entre diseño, simulación, fabricación y caracterización de un biosensor piezoeléctrico para el diagnóstico de enfermedades. La ejecución del plan de trabajo, mediante el cual se llevará adelante el proyecto, permitirá desarrollar herramientas diagnósticas que contribuirán a la predicción de la evolución de la enfermedad y al diseño de estrategias terapéuticas específicas.

**Palabras clave:** biosensor, microbalanza de cristal de cuarzo, biomoléculas, microelectronica, prototipo electrónico y 3d

## Objetivos propuestos

### General

Diseñar, simular, fabricar y caracterizar prototipo de biosensor piezoeléctrico para el diagnóstico de enfermedades.

### Específicos

- 1- Modelar y simular microsensado de masa como biosensado.
- 2- Fabricar y caracterizar sensor de masa de cuarzo.
- 3- Desarrollar conocimiento en funcionalización de superficies de materiales para la fabricación de biosensores.
- 4- Fabricar Biosensado para la detección de biomoléculas.
- 5- Integrar biosensado a diseño microelectrónico basado en tecnología CMOS.
- 6- Fabricar y caracterizar microsensado piezoeléctrico de masa basado en ALN.
- 7- Evaluar la funcionalidad de un dispositivo piezoeléctrico para el seguimiento de procesos biológicos.
- 8- Evaluar aplicabilidad de piezoeléctricos biocompatibles (PVDF) como materiales osteogénicos/osteoinductivos, así también como aceleradores de cicatrización de heridas

## Objetivos cumplidos

Se cumplió con la totalidad de los objetivos en tiempo y forma. El único objetivo no cumplido fue el de Fabricar y caracterizar un microsensado piezoeléctrico de masa basado en ALN. El motivo principal por el cual estas actividades no pudieron ser realizadas fue la falta de tiempo para su abordaje. Esta falta de tiempo estuvo ampliamente justificada por el insumo de tiempo extra que demandaron los grandes avances en los demás objetivos. El hecho de obtener un prototipo funcional, testeado y caracterizado de un biosensado de proteínas y su potencial patentamiento, justifica este no cumplimiento del objetivo mencionado. Además, se avanzó considerablemente en los experimento in vivo con animales de laboratorio para evaluar la osteogeneración basada en materiales piezoeléctricos.

Sumado a estos hechos, los resultados de la participación en congresos nacionales (SABI '15 y '17) e internacionales (ISECM '15) y en concursos de innovación y tecnología (INNOVAR '17 y Startupsummit '17 Novartis) superaron ampliamente las expectativas del grupo de investigación. Se generaron lazos y potenciales socios estratégicos que se espera capitalizar en el corto/mediano plazo.

## Marco teórico y metodológico (síntesis)

Las QCMs como biosensores son parte de una técnica de monitoreo rápido, bajo costo, alta reproducibilidad y bajos límites de detección de la sustancia de interés. El presente proyecto de investigación propone llevar a cabo el desarrollo de un microsensado de masa funcionalizado con biomoléculas específicas (biosensado) para la determinación de marcadores bioquímicos o moleculares, como proteínas o ácidos nucleicos para la detección. La propuesta se basa en la integración entre diseño, simulación, fabricación y caracterización de un prototipo de biosensado piezoeléctrico para el diagnóstico de enfermedades.

Para el diseño se emplearán modelos computacionales desarrollados en el grupo para el ensayo de este tipo de tecnologías que permitirá determinar parámetros óptimos de funcionamiento y diseño. Se desarrollará la electrónica asociada y la integración del diseño en busca de la reducción del tamaño mediante el diseño de un chip microelectrónico. Se caracterizará el biosensado y se lo funcionalizará con

biomoléculas específicas. Finalmente se evaluará el desempeño del prototipo en modelos experimentales *in vitro*.

Los biosensores basados en microrresonadores piezoeléctricos constituyen una tecnología moderadamente explorada en el campo de la detección de biomoléculas. Su desarrollo abre una perspectiva interesante pudiéndose integrar a diferentes dispositivos y así perfeccionar su funcionalidad y ampliar su campo de aplicación.

El creciente uso de biosensores y el posicionamiento estratégico de la nanobiotecnología permiten abordar las problemáticas desde otro ángulo, con el consecuente desarrollo de nuevos conocimientos. Se trata de un proyecto multidisciplinario que incluye áreas tan diversas como la mecánica computacional, la electrónica, la microelectrónica, la nanotecnología, la medicina y la biología celular y molecular. La ejecución de este plan de trabajo permitirá desarrollar herramientas diagnósticas que contribuirán a la predicción de la evolución de enfermedades y al diseño de estrategias terapéuticas específicas.

## Metodología

### 1. Modelar y simular microsensors de masa como biosensor

El equipo de investigación tiene desarrollado modelos computacionales (FEM y Mason) los cuales se utilizaron como base para modelar los sensores propuestos considerando la fijación de proteínas/ aptámeros en un medio acuoso y diferentes geometrías:

### 2. Fabricar y caracterizar sensor de masa de cuarzo

Se adquirieron 10 cristales de cuarzo (corte AT) con electrodos depositados en sus caras principales. Empleando herramientas de modelado 3D, se diseñó un soporte para la fijación del resonador de cuarzo (cavidad resonante). El mismo se construyó empleando tecnología Polyjet® de impresión 3D. El diseño garantizó la hermeticidad necesaria para que el sensor pueda ser empleado en medios acuosos.

El objetivo fue la obtención de las características funcionales y geométricas más relevantes de los resonadores a partir de los resultados experimentales; se determinó la frecuencia de resonancia, el factor de acoplamiento electromagnético, la figura de mérito y el factor de calidad del sensor.

3. Desarrollar conocimiento en funcionalización de superficies de materiales para la fabricación de biosensores.

Para lograr la afinidad requerida para identificar y cuantificar un analito deseado, es necesario inmovilizar agentes reactivos en la superficie del biosensor. Este proceso se conoce como funcionalización del sensor. Existen diversas clases de agentes reactivos que han sido utilizados para funcionalizar biosensores. Entre los más extensamente utilizados se encuentran: los anticuerpos y los aptámeros. Como resultado de este estudio, se optó por el uso de aptámeros para funcionalizar la superficie y se utilizó trombina como molécula diana.

### 4. Fabricar Biosensor para la detección de biomoléculas

Se fabricará un gabinete ergonómico para la fijación del piezoeléctrico utilizando la impresora 3D. El diseño buscará garantizar la hermeticidad necesaria para que el sensor pueda ser empleado en un medio acuoso.

Se obtuvo la respuesta en frecuencia del biosensor piezoeléctrico. Se midió la impedancia y fase del sensor en función de la frecuencia para determinar su frecuencia de resonancia. Las mediciones fueron realizadas con el equipamiento antes mencionado. Se obtuvo la frecuencia de resonancia, el factor de acoplamiento electromagnético, la figura de mérito, y el factor de calidad.

### 5. Integrar biosensor a diseño microelectrónico basado en tecnología CMOS.

Pensando en la factibilidad comercial del diseño se trabajó en la integración de la electrónica necesaria para la excitación y acondicionamiento de señal buscando que los sensores estén integrados con la electrónica.

Por otro lado, el enorme desarrollo de la industria electrónica ha llevado a desarrollar nuevos sensores y aplicaciones de sensores compatibles con esta tecnología que sigue en crecimiento, con la idea de fabricación en masa, abaratando costos.

6. Fabricar y caracterizar microsensar piezoeléctrico de masa basado en AlN.

Pensando en la factibilidad comercial del diseño se trabajará en la integración de la electrónica necesaria para la excitación y acondicionamiento de señal buscando que los sensores estén integrados con la electrónica. Uno de los materiales mayormente utilizado para aplicaciones electroacústicas es el AlN debido a su excelente calidad para la fabricación de resonadores acústicos. Este piezoeléctrico debe ser fabricado sobre un sustrato que en muchos casos es empleado también para los electrodos de excitación.

7. Evaluar la funcionalidad de un dispositivo piezoeléctrico para el seguimiento de procesos biológicos.

El polivinilideno fluoruro (PVDF) y sus copolímeros son los polímeros (biocompatibles) con mayor efecto piezoeléctrico. Una de las mayores ventajas de los films piezoeléctricos sobre las cerámicas piezoeléctricas es la baja impedancia acústica, cercana a la del agua y a la de varios medios orgánicos, convirtiéndolos en materiales con un gran potencial para aplicaciones biomédicas.

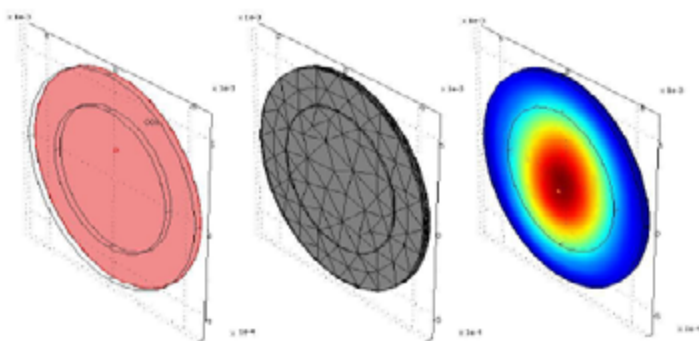
8. Evaluar aplicabilidad de piezoeléctricos biocompatibles como materiales osteogénicos/osteoinductivos así también como aceleradores de cicatrización de heridas.

Debido a la potencialidad del uso de materiales electroactivos (piezoeléctricos) en aplicaciones biológicas y biomédicas, el objetivo de esta evaluación es ampliar el conocimiento sobre el papel de la carga superficial del soporte piezoeléctrico en la respuesta celular.

## Síntesis de resultados y conclusiones

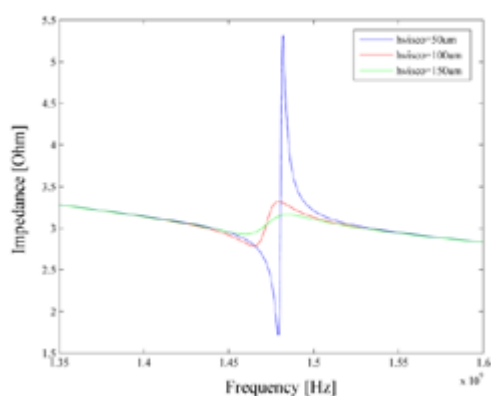
### 1. Modelar y simular microsensar de masa como biosensar

El modelado FEM de este sistema se muestra en la Figura 1, en la cual se exhibe el aspecto físico del disco con material depositado, su respectivo mallado y la respuesta vibracional. Se utilizaron mallados que variaron entre 5000 y 8000 elementos, considerando los diferentes espesores de material depositado.



**Fig 1:** Aspecto físico del disco de cuarzo con deposición de 20 $\mu$ m de parylene (rojo)(izq.), mallado (centro) y respuesta vibracional (der.).

Con el fin de analizar el comportamiento de una capa viscoelástica, se llevó a cabo la respuesta de frecuencia del sistema para un film de estreptavidina con espesores de 50 nm, 100 nm y 150 nm como se muestra en la Figura 2:



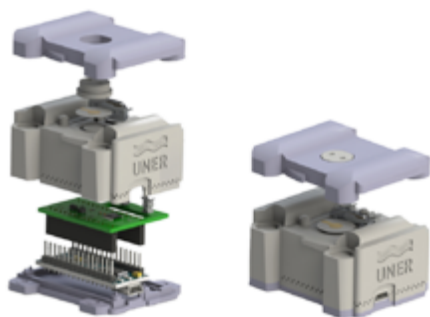
**Fig. 2:** Respuesta en frecuencia de sensor de AlN para films de estreptavidina de 50nm, 100nm y 150nm.

## 2. Fabricar y caracterizar sensor de masa de cuarzo

Se llegó a un prototipo funcional del biosensor caracterizándolo con microscopía de barrido electrónico SEM (SMP ITF), funcionalización y análisis de la respuesta en frecuencia. Estos resultados motivaron la presentación de una propuesta de patentamiento de la innovación (biosensor de proteínas) y la presentación a concursos de innovación.

### 2.1. Diseño

Se realizó la fabricación del primer prototipo de balanza de cuarzo. El sistema se modeló en SolidWork (Fig.3).



**Fig. 3.** Modelo de la OpenQCM combinado con el módulo de disipación.

Un módulo de disipación se diseñó para integrarse con una microbalanza de código abierto (OpenQCM, <http://openqcm.com/>). El principio de funcionamiento del módulo de disipación se basa en la tasa de disminución de las oscilaciones generadas por un cristal, después de una interrupción rápida del voltaje de excitación. El voltaje de decaimiento generado se puede modelar como una señal sinusoidal amortiguada en forma exponencial, por lo que la frecuencia de resonancia y el factor de disipación pudieron evaluarse simultáneamente.

El sistema consistió en un microcontrolador que interactúa con una computadora a través de comunicación USB (Fig. 4). El sistema consta de dos partes principales: digital y analógica. La parte digital no solo registra la frecuencia de la señal de entrada, sino que también controla la conmutación de potencia y señal. Cuando la señal se conecta al circuito analógico, la envolvente sinusoidal amortiguada es procesada por el detector de envolvente y para luego ser digitalizada por el microcontrolador ADC.

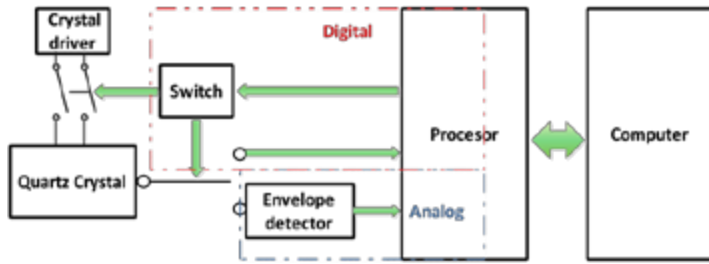


Fig. 4: Diagrama de bloques del sistema QCM con módulo de disipación.

## 2.2. Hardware

El módulo de disipación se adaptó para funcionar con una placa micro Arduino, ya que es el núcleo del OpenQCM original. La conmutación se implementó mediante un conmutador analógico controlado digitalmente que utiliza el circuito integrado (CI) 74HCT4053. Cuando el pin de control cambia el nivel lógico, el interruptor desconecta el cristal y simultáneamente conecta la salida de cristal al circuito del detector de envolvente. El circuito del detector de envolvente consiste en un demodulador AM LTC5507. Este CI puede operar en frecuencias que van desde 100 kHz hasta 1 GHz. El esquema del sistema (Fig. 5) se realizó con un software de diseño de PCB libre (Ealge v7.2, CadSoft).

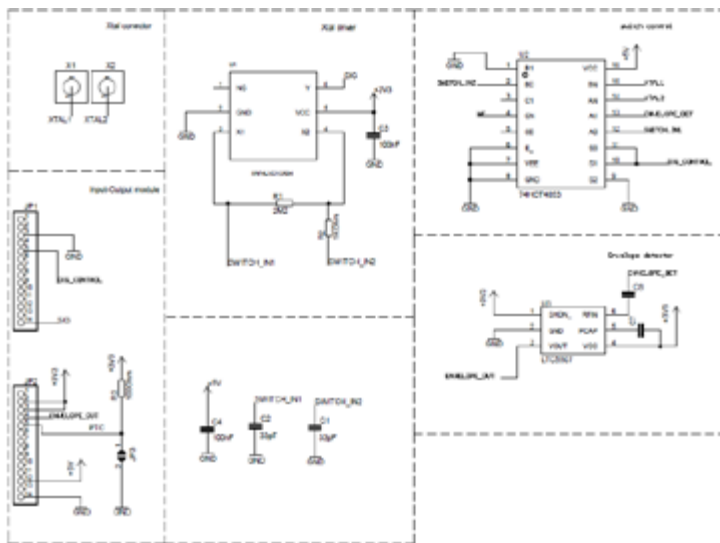
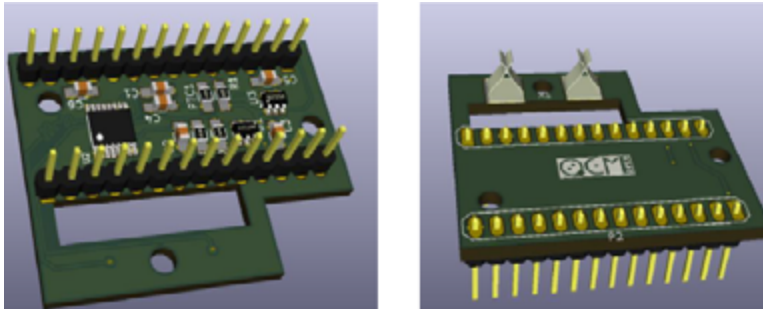


Fig. 5: Esquema del sistema QCM con módulo de disipación. El módulo de entrada-salida facilita la conexión con la placa Arduino. El control del interruptor desactiva la excitación del cristal y conecta la salida de cristal al detector de envolvente de acuerdo con el estado DIG\_CONTROL. El detector de envolvente cuantifica la envolvente del amortiguador sinusoidal y la salida se digitaliza mediante el ADC del microcontrolador para calcular el factor de disipación.

### 2.2.1. Placas QCM en KiCad

Se desarrolló el primer modelo de la placa incluyendo el módulo de medición de disipación utilizando el multiplexor 74htc4053 (Figura 6). Durante el proceso de experimentación se encontró que el 74htc4053 no presentaba buenas características de conducción cuando se realizaba la medición de la disipación del sistema. Por esto se planteó un nuevo modelo de placa utilizando un circuito TS5A23159.



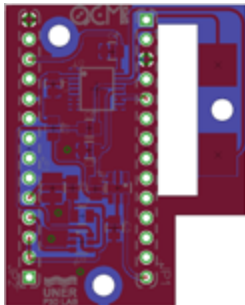
**FIGURA 6.** Placa módulo de disipación v1.

### 2.3. Software

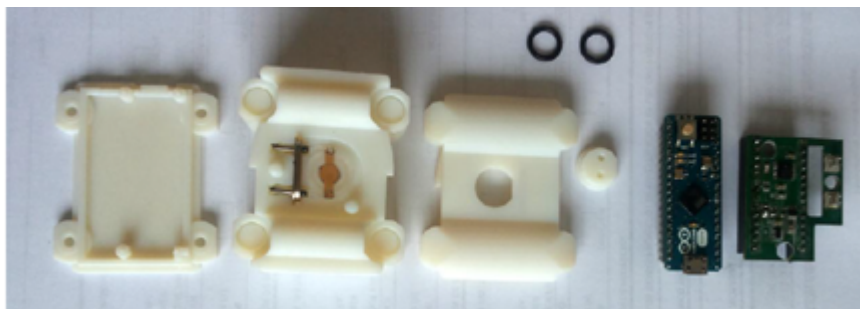
La interfaz de usuario original para el sistema QCM se desarrolló en Java JDK8. La GUI se modificó para introducir un botón de bloqueo de cambio de control (DIG\_CONTROL). Además, la GUI podrá compilarse en un archivo ejecutable independiente.

### 2.4. Fabricación

La incorporación de pocos elementos SMD facilitó un diseño de PCB de doble cara, PTH (plated-through-holes), con dimensiones reducidas (Fig. 7). La placa PCB fue producida usando la fresadora de PCB ProtoMatS103 de LPKF. Esta tecnología proporciona prototipos PCB precisos, rápidos y simples, logrando ancho y espacio de pistas de 100  $\mu\text{m}$ . Todos los componentes de la OpenQCM y la integración con el módulo de disipación diseñado se muestran en la Fig. 8.



**Fig. 7:** Diseño de PCB para la QCM con el módulo de disipación.



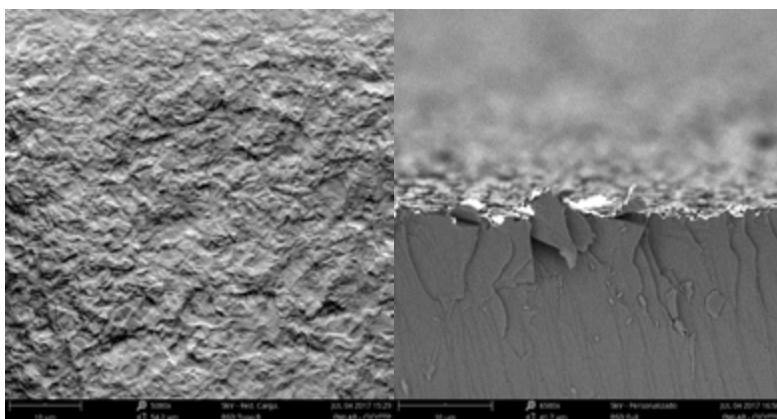
**Fig. 8:** Sistema fabricado de la OpenQCM combinado con el módulo de disipación.

## 2.5. Caracterización

Se caracterizó la microbalanza obteniendo el corrimiento en frecuencia y la disipación del sistema, tanto en un medio gaseoso (aire) como líquido (agua). Inicialmente se utilizó el método de decaimiento y posteriormente el de respuesta en frecuencia.

### 2.5.1. SEM

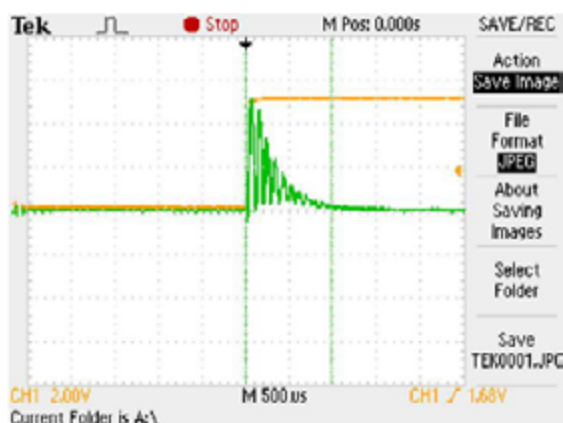
Con el objetivo de evaluar las características de la superficie del sensor propiamente dicho (cristal de cuarzo), se obtuvieron imágenes utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) del Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología a la Producción (CONICET), sito en la ciudad de Diamante, Entre Ríos. Las imágenes de la superficie y el perfil del cristal se pueden observar en la Fig.9:



**Fig 9:** Rugosidad del electrodo en una de las caras principales cristal de cuarzo (izq.), y perfil del cristal en donde se puede apreciar el espesor del depósito de oro (der.).

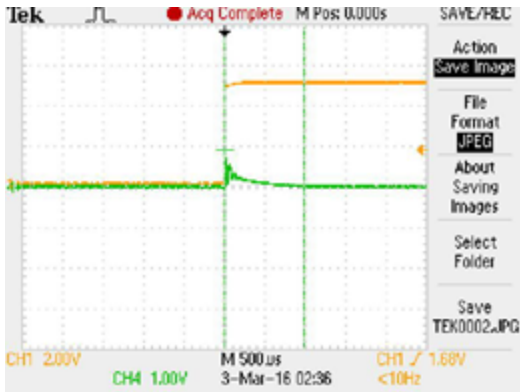
### 2.5.2. Primeros resultados experimentales

Se realizaron pruebas con el módulo de disipación con aire (Figura 10) y agua (Figura 11) con el cual se registró el decaimiento de la señal con osciloscopio. Se puede apreciar una alta amortiguación del agua en la oscilación del cristal en comparación con el aire.



**Fig. 10:** Decaimiento del Sistema en interfaz aire.

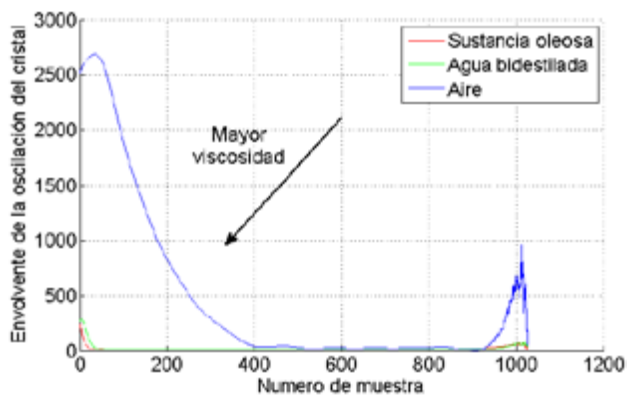




**Fig. 11.** Decaimiento del Sistema en interfaz agua.

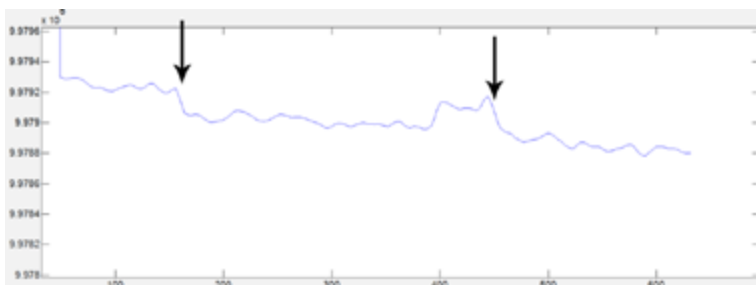
### 2.5.3. Mediciones en soluciones acuosas

Se utilizaron soluciones acuosas con diferentes características y los resultados se contrastaron con mediciones en un medio gaseoso (aire). Se utilizó el método de decaimiento y posteriormente el de respuesta en frecuencia (Figs. 12-14).



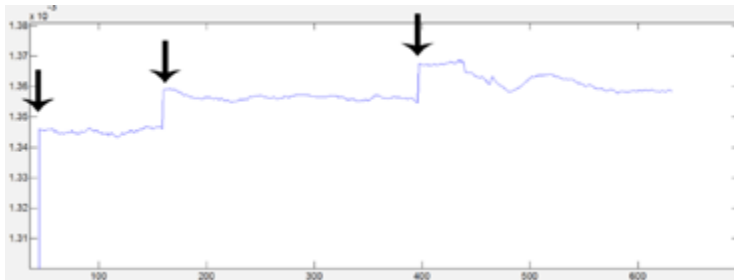
**Fig. 12:** Método de decaimiento

### Frecuencia vs tiempo



**Fig. 13:** Método de respuesta en frecuencia #1

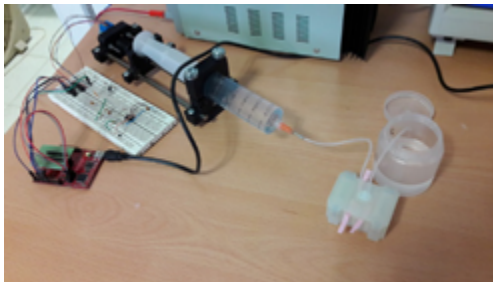
### Disipación vs tiempo



**Fig. 14:** Método de respuesta en frecuencia #2

#### 2.5.4. Test de hermeticidad

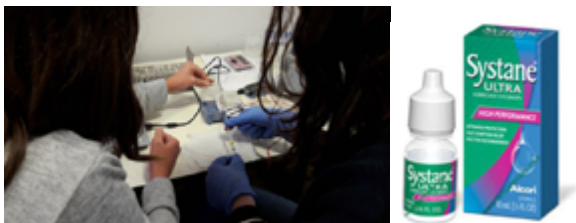
Se realizó un nuevo setup para evaluar la hermeticidad del dispositivo considerando que se hallaron algunas pérdidas de líquido (las cuales fueron solucionadas a la brevedad). El setup consistió de una bomba infusora controlada con un microprocesador como se puede observar en la figura 15:



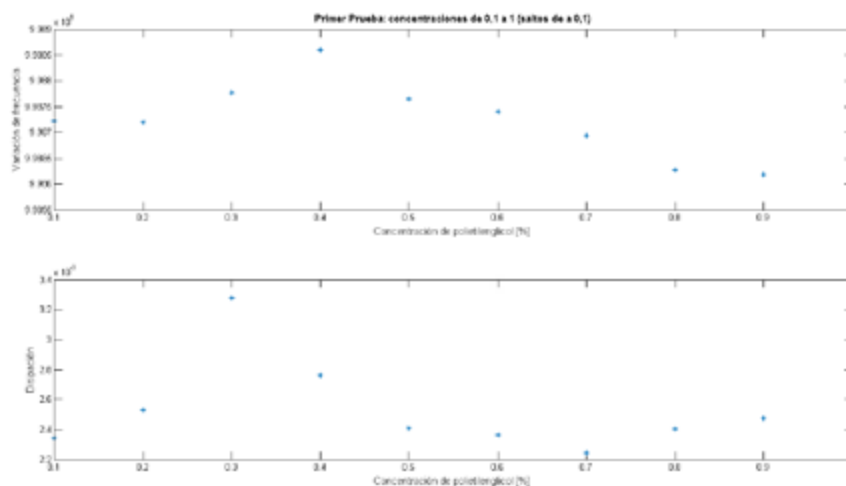
**Fig. 15:** Setup para evaluar hermeticidad.

#### 2.5.5. Medición de lágrimas artificiales

A partir de los buenos resultados obtenidos, se propuso abordar un experimento contemplando diferentes tipos de lágrimas artificiales. Para esto, se prepararon diferentes concentraciones de polietilenglicol en agua destilada, ya que éste es uno de los componentes principales en un gran número de lágrimas artificiales. El setup desarrollado se muestra en la figura 16 y las respuestas obtenidas en la figura 17:



**Fig. 16:** Setup para evaluar lágrimas artificiales (izq.) y lágrima artificial comercial (der.).



**Fig. 17:** Resultados preliminares de la medición de lágrimas artificiales.

## 2.6. Nuevo diseño de QCM basado en Arduino DUE

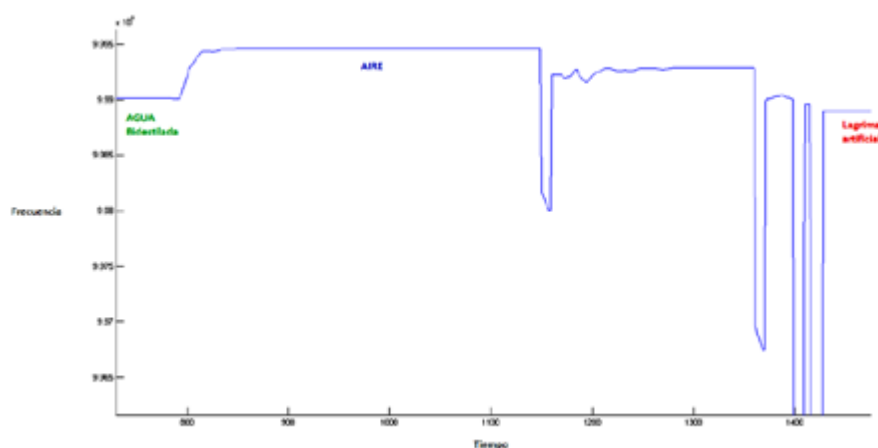
Uno de los inconvenientes más importantes del diseño primario del módulo de medición de disipación radicó en la baja capacidad de procesamiento y la baja capacidad de almacenamiento del chip que utiliza la placa arduino micro. Debido a lo expuesto previamente, se llevó a cabo un nuevo diseño de la QCM basado en una placa Arduino DUE, la cual es más potente. Este nuevo diseño tiene la capacidad de manejar 2 sensores simultáneamente (Figura 18).



**FIGURA 18.** Nuevo diseño de QCM basado en Arduino DUE

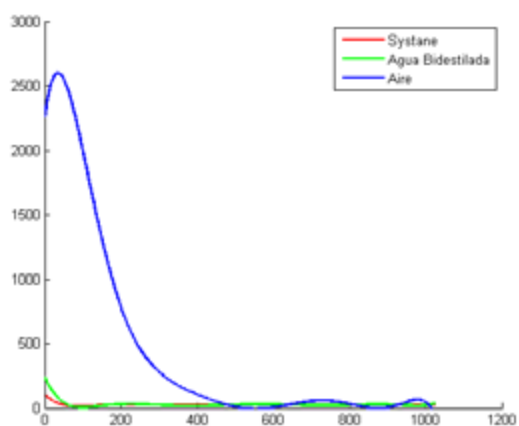
### 2.6.1. Medición de disipación del sistema en lágrima artificial

Finalizada la parte electrónica con la nueva placa Arduino, incluyendo el ADL5511 y la etapa diferencial, se procedió a cuantificar una lagrima artificial Systane ultra®. En la Figura 19, se puede apreciar el cambio de la frecuencia de resonancia del sistema ante distintas interfaces.



**FIGURA 19.** Cambio de la frecuencia de resonancia del cristal durante aire, agua, y lagrime artificial

Se aprecia que la lágrima artificial presenta mayor disipación que la gota de agua y la interfaz con aire. Luego, se obtuvo el decaimiento del Sistema con aire, agua y lagrime artificial comercial y se utilizó un algoritmo de regresión por cuadrados mínimos (Figura 20).



**FIGURA 20.** Decaimiento del Sistema con aire, agua y lágrima artificial comercia con fiteado de las curvas.

### 3. Desarrollar conocimiento en funcionalización de superficies de materiales para la fabricación de biosensores

Esta etapa del proyecto consistió en el proceso de funcionalización de la QCM. La misma se diagramó teniendo como principal propósito el de adquirir conocimientos y experiencia en funcionalización de superficies. En ese sentido surgió el desafío de lograr que el microsensar identifique una biomolécula particular, mediante la sensibilización de la superficie del transductor, es decir, a partir de la unión de con un biorreceptor que posea afinidad por dicha biomolécula. Esto significó la transformación del microsensar a biosensar.

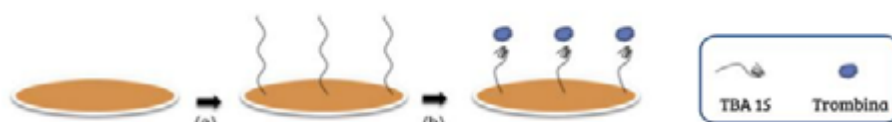
### 3.1. Selección del biorreceptor

En primer lugar, se analizaron posibles biorreceptores aplicables a este trabajo. Tal como se mencionó anteriormente, es fundamental que cumplan ciertos requisitos. Tienen que poseer una afinidad selectiva hacia el analito que se quiere detectar y deben permanecer estables a lo largo del tiempo. Dentro de las posibilidades, se evaluaron dos moléculas (anticuerpos y aptámeros) ya que, además de cumplir con los requisitos mencionados cuentan con extensa bibliografía disponible para su estudio. A partir del análisis de las ventajas y desventajas tanto de anticuerpos como de aptámeros, se optó por la selección de los aptámeros como biorreceptores.

Una ventaja importante que destaca a los aptámeros en el desarrollo de biosensores es la estabilidad que presentan durante su vida útil, mayor que la de los anticuerpos, que es generada por su naturaleza química. Además, pueden ser desnaturalizados mediante aumento de la temperatura o del pH, y tienen la capacidad de retornar a su estado activo aplicando las condiciones óptimas de trabajo (buffer, temperatura, etc.). Los anticuerpos, en cambio, ante un episodio de desnaturalización generalmente pierden la capacidad de reconocimiento y por lo tanto su función en un biosensor.

Específicamente se seleccionó al aptámero antirombina y, en consecuencia, se eligió la proteína trombina como molécula diana. La trombina es una serina proteasa que expone dos exositos electropositivos para la interacción específica del sustrato, el exosito de reconocimiento de fibrinógeno y un exosito más fuertemente electropositivo para la unión a heparina. El aptámero antitrombina es una secuencia de ADN con 15 oligonucleótidos (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'), por lo cual se lo conoce como TBA15 (TBA, por su sigla en inglés "thrombin-binding aptamer" y 15, por sus quince bases). El mismo posee en un extremo un grupo tiol, que le permite unirse al oro mediante un enlace covalente, y tiene la capacidad de plegarse en una estructura cuádruple que se une a la trombina en el exosito de fibrinógeno. Además, la asociación de la trombina con este aptámero es un sistema modelo para el desarrollo de dispositivos biosensores que implican aptámeros como molécula de reconocimiento.

El proceso de funcionalización de la QCM con el TBA15, esquematizado en la Figura 21, consiste en conseguir la inmovilización del aptámero sobre la superficie del electrodo del oro de la QCM, para que luego sea posible el sensado de la molécula diana (por ejemplo trombina).



**Fig. 21:** Funcionalización de una superficie de oro, modificado de [12]. (a) Unión del TBA al oro. (b)

### 3.2. Unión de la trombina con el aptámero.

Este proceso implica realizar una modificación química de la superficie o, dicho de otra manera, provocar una alteración en el material de los electrodos que pueda proporcionarle nuevas propiedades físico-químicas superficiales. La técnica empleada para la inmovilización del TBA15, es la unión por enlace covalente de estos aptámeros modificados con tiol (-SH) sobre la superficie de oro. En este caso se obtiene una monocapa autoensamblada o SAM (del inglés, self-assembled monolayer), debido a que el grupo tiol se encuentra en un solo extremo del aptámero; este extremo se une covalentemente al oro (Au) y se genera la monocapa de aptámeros, mientras que el otro extremo queda libre para unirse a la trombina. Las principales ventajas de usar un enlace Au-S directo para unir la molécula receptora

al electrodo incluyen una reacción rápida y covalente y, por ende, la formación de una monocapa muy estable. En base al estudio de la amplia bibliografía disponible sobre funcionalización con aptámeros, se desarrolló el protocolo de funcionalización.

#### 4. Fabricar Biosensor para la detección de biomoléculas

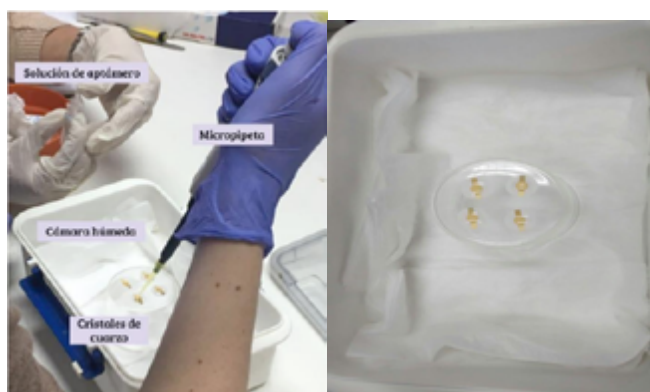
##### Protocolo de funcionalización

A continuación se detallan las etapas del protocolo elaborado y llevado a cabo para la funcionalización. En total fueron 4 los cristales expuestos a este procedimiento.

**A. Preparación de la solución de Aptámero:** se hidrataron los aptámeros con 1.1 ml de TE (tris-EDTA), para obtener una concentración de 60  $\mu$ M, en base a las especificaciones del fabricante. Posteriormente, se fraccionó la solución en 12 tubos eppendorf, cada uno con 20  $\mu$ l.

**B. Reducción tior:** una vez que el aptámero fue resuspendido, fue necesario reducir el extremo tior para que pueda unirse al oro, ya que el aptámero tal como lo provee el fabricante tiene protegido este extremo. Para ello, a cada eppendorf con la solución de aptámero se le añadió 40  $\mu$ l de TCEP. Luego se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Para la preparación del solución buffer se diluyó 0,0086g de TCEP en 15[ml] de agua ultrapura, luego se conservó a 4 °C, por recomendación del fabricante.

**C. Unión del aptámero al electrodo:** la superficie del electrodo de oro de la QCM fue cubierta completamente con la solución de aptámero. Posteriormente se incubó toda la noche a una temperatura de 4°C, en una cámara húmeda. Esta última se elaboró con un recipiente de plástico con tapa, en cuyo interior se colocó papel absorbente humedecido con agua ultrapura. En la Figura 22 (izquierda) se puede observar el momento en el que se cubrieron los electrodos con la solución de aptámero, mientras que en la Figura 22 (derecha) se muestran los cristales con la solución de aptámero sobre su superficie, ubicados en la cámara húmeda, listos para la incubación.



**Fig.22:** Etapa C del protocolo de funcionalización (izq.). Cristales con la solución de aptámero en su superficie, previo a la incubación (der.).

**D. Enjuague:** se enjuagaron los sobrantes de aptámeros con 3 ml de agua mili Q a temperatura ambiente para descartar lo que no se unió al electrodo.

**E. Unión aptámero - trombina:** se colocaron 50  $\mu$ l de solución de trombina sobre el electrodo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y cubierto con un recipiente para aislarlo del ambiente (Figura 23). Luego se enjuagó con 3 ml de PBS, para retirar la trombina que no se unió a los aptámeros.



**Fig.23:** Etapa E del protocolo de funcionalización, incubación con solución de trombina.

Previamente se resuspendió la trombina. Para reconstituir todo el vial el fabricante recomienda usar 8.1 ml de buffer PBS, así se obtiene una concentración de 7.4  $\mu\text{g/ml}$  (200 nM), esta preparación se debe guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A partir de la bibliografía consultada se optó por trabajar con una concentración 120 nM, para lograrla se tomaron 30  $\mu\text{l}$  de la solución de trombina y se añadió 20  $\mu\text{l}$  de PBS, se obtuvo así 50  $\mu\text{l}$  de solución de trombina 120 nM.

### **Sistemas de adquisición**

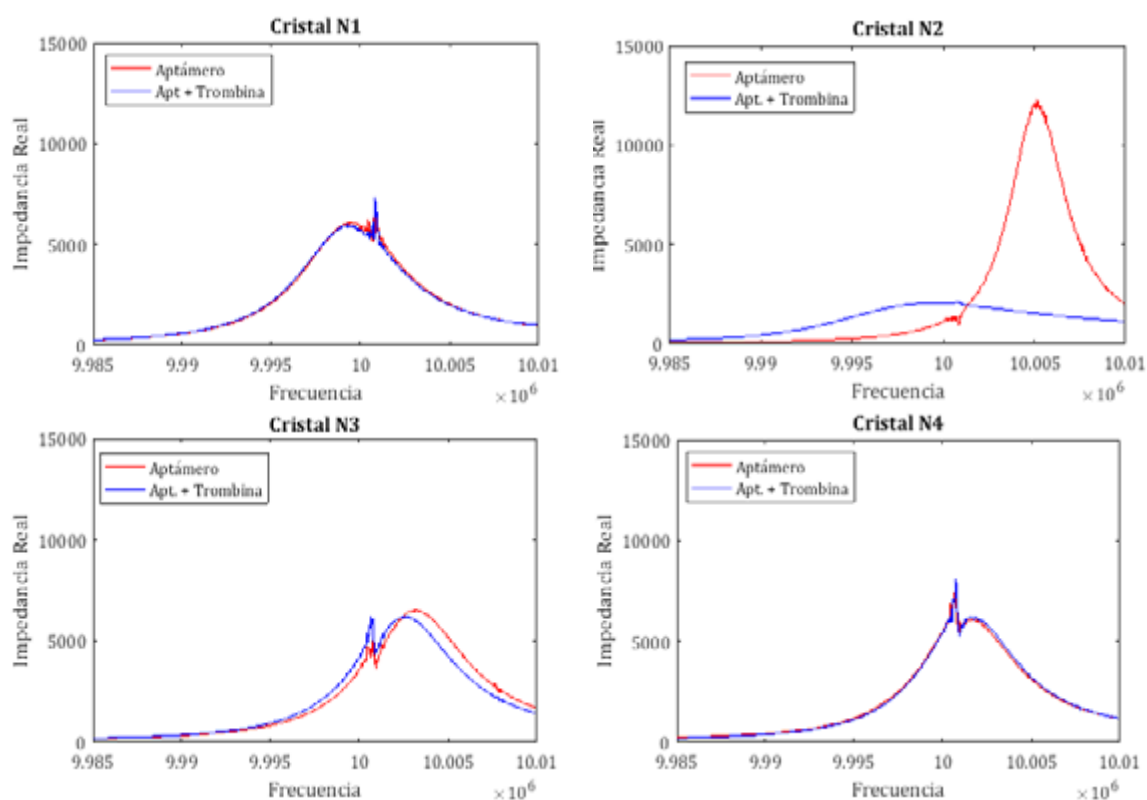
Se emplearon dos sistemas de adquisición diferentes para efectuar las mediciones propuestas. Por un lado, se utilizó la placa multipropósito Digilent Analog Discovery 2 TM, empleada anteriormente para las mediciones de soluciones de PEG. Por otra parte, se empleó un equipo más sofisticado, el analizador de impedancia “1260 Impedance/Gain-Phase Analyzer” de la empresa Solartron.

El 1260 Impedance/Gain-Phase Analyzer de Solartron (Figura 24), es un analizador de respuesta de frecuencia muy potente y preciso, con múltiples aplicaciones. Proporciona una amplia gama de posibilidades para la medición de impedancia y respuesta en frecuencia. Es utilizado por muchos investigadores para diferentes experimentos, donde la integridad de la medición y la fiabilidad experimental son de suma importancia. Puede detectar y cuantificar cambios muy sutiles en el comportamiento de la muestra, brindando un amplio rango de frecuencias para analizar la muestra, que va desde 10  $\mu\text{Hz}$  a 32 MHz, con una resolución de 0.015 ppm. Las mediciones con este analizador de impedancia fueron posibles gracias al Laboratorio de Nanociencias y Nanotecnología del Centro Atómico Constituyentes (Comisión Nacional de Energía Atómica), ubicado en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, que cedió su espacio y equipamiento para trabajar.



**Fig. 24:** “1260 Impedance/Gain-Phase Analyzer”, Solartron.

A continuación, en la Figura 25, se exhiben las curvas correspondientes a los cuatro cristales con los que se trabajó, dejando de lado la respuesta del sensor sin funcionalizar para obtener una mejor visión del comportamiento que presentaron en cada caso. En estas gráficas se observan las curvas de la medición de los cristales con la solución de aptámero (Medición 2, curva de color rojo) y luego de incubar con trombina (Medición 3, curva de color azul).

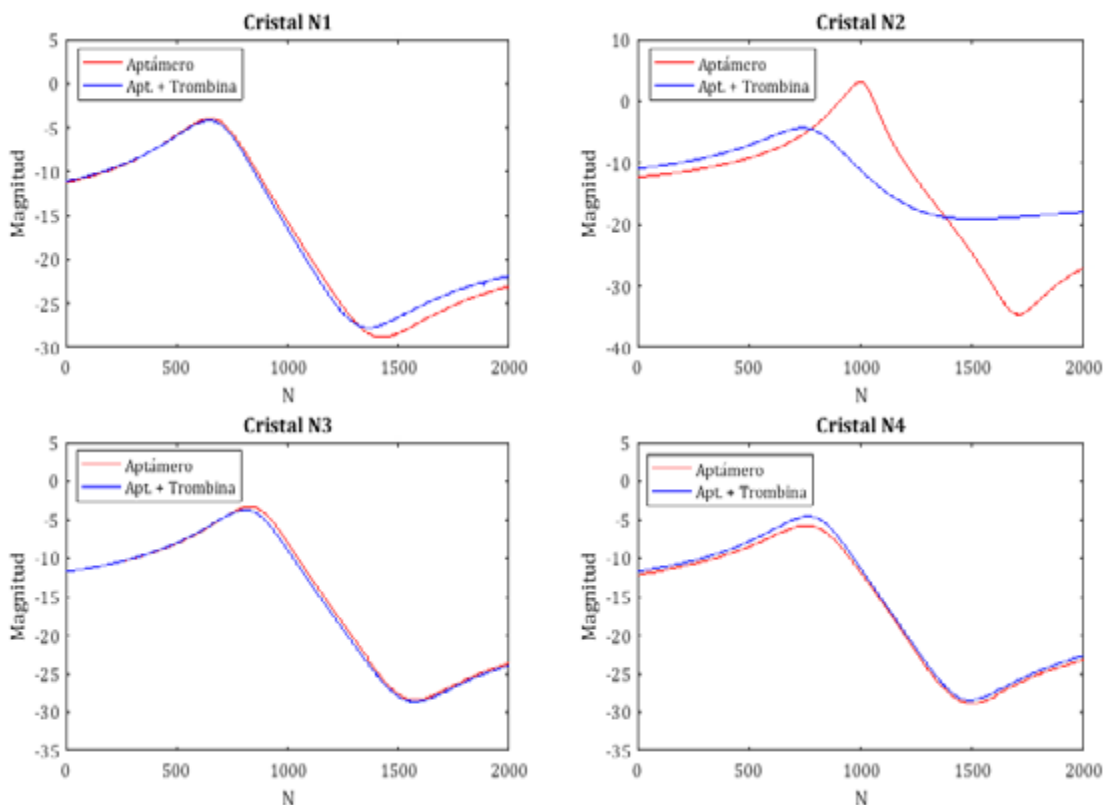


**Fig. 25:** Curvas de impedancia real vs. frecuencia de los cristales N1, N2, N3 y N4. En rojo, curva de la medición luego de la incubación con aptámeros. En azul, curva obtenida luego de la incubación con trombina.

### Sistema de adquisición Digilent Analog Discovery 2 TM

A continuación se dan a conocer los resultados obtenidos con el sistema de adquisición Digilent Analog Discovery 2 TM en función del número de muestra, registrado luego de realizar la sensibilización de la superficie del sensor. Las curvas corresponden a los valores obtenidos después de la inmovilización del aptámero (Medición 2, en rojo), y luego de la unión aptámero – trombina (Medición 3, color azul).





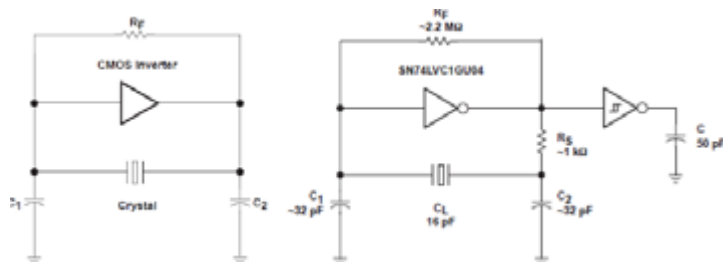
**FIGURA 26:** Curvas de magnitud vs. frecuencia de los cristales N1, N2, N3 y N4. En rojo, curva de la medición luego de la incubación con aptámeros. En azul, curva obtenida luego de la incubación con trombina

### 5. Integrar biosensor a diseño microelectrónico basado en tecnología CMOS.

Inicialmente se estudió el principio de funcionamiento del transistor MOSFET, canal N y canal P, y del inversor CMOS. Posteriormente se abordó el diseño de una de las partes más importantes de la QCM: el “crystal driver”. Este circuito es el encargado de estimular el cristal para que vibre según las necesidades de la aplicación.

#### Diseño

Para implementar el estimulador del cristal debemos respetar las consideraciones de Barkhausen. Utilizaremos una configuración conocida como oscilador de PIERCE como se muestra en la figura 27 (izq), y una variante utilizando el circuito Schmitt trigger (derecha).



**Fig.27:** a. Oscilador de Pierce y b. variante con Schmitt trigger.

### Simulación

Se realizó el diseño y simulación en el software LTSPICE IV, en la figura 28 se muestran capturas del circuito y la simulación. En verde se observa la entrada y en azul la salida.

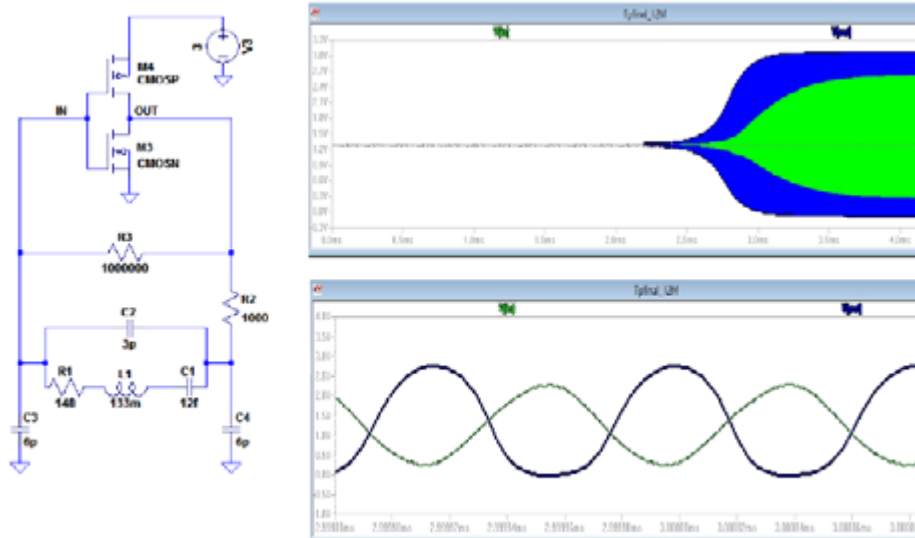


Fig. 28: a. Circuito de estimulación del cristal. b. Capturas de la simulación.

Se logró con éxito el diseño, simulación y layout de dos circuitos estimuladores para un cristal de cuarzo de una microbalanza. Se afianzaron conceptos y uso de software específico, se realizó trabajo en equipo y se logró enviar a fabricar el chip para luego utilizarlo en el proyecto de investigación (Fig. 29).

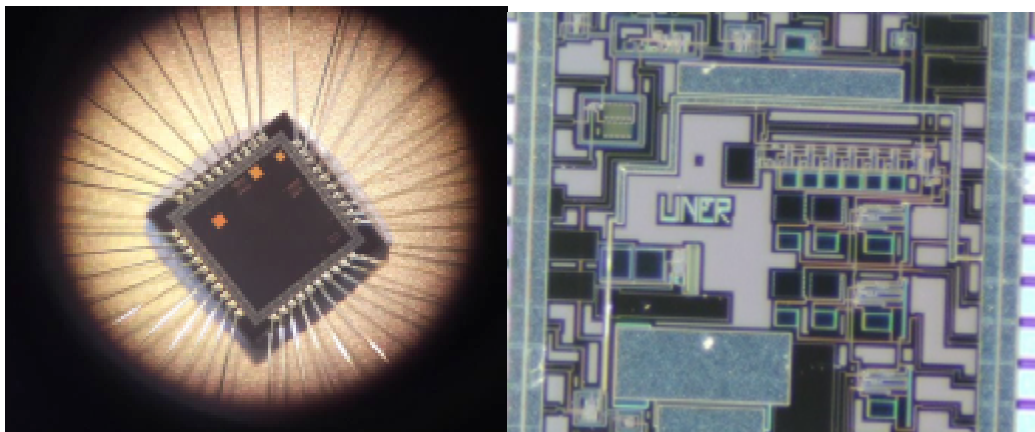


Fig. 29: Chip fabricado.

## 6. Fabricar y caracterizar microsensado piezoeléctrico de masa basado en AlN

Las actividades relacionadas con este objetivo no se lograron concretar por las razones antemencionadas: escasez de tiempo y logros previos mercedores de tiempo y dedicación.

## 7. Evaluar la funcionalidad de un dispositivo piezoeléctrico para el seguimiento de procesos biológicos

### Técnicas de aumento óseo

Una de las principales aplicaciones de las técnicas de aumento óseo es en el área de implantes dentales. Los implantes dentales sólo pueden ser colocados si existe la suficiente cantidad de hueso de soporte que permita estabilizarlos. El aumento óseo permite efectuar tratamientos de implantes que de otra manera no se considerarían para algunos pacientes. Existen diversos enfoques, materiales y técnicas quirúrgicas que permiten el aumento óseo, entre ellas:

- GBR (Guided Bone Regeneration).
- Injertos de partículas de hueso.
- Injertos de bloques.
- Expansión de cresta.
- Osteogénesis por distracción.

### Aplicaciones de materiales piezoeléctricos en regeneración de tejidos

La utilización de materiales piezoeléctricos como andamio para ingeniería de tejidos permite la estimulación eléctrica sin necesidad de utilizar electrodos, fuentes externas o baterías implantadas, eliminando la posibilidad de acumular productos de electrólisis. Los materiales deben ser biocompatibles y tener un coeficiente piezoeléctrico razonable. Los materiales más usados en este campo fueron tradicionalmente los piezocerámicos, destacándose el PZT (zirconato titanato de plomo) en aplicaciones de regeneración de nervios, a pesar de su toxicidad por la presencia de plomo. Algunas alternativas libres de plomo son ZnO (óxido de zinc), BT (titanato de bario), KNN (niobato de sodio potasio), LNKN (niobato de litio sodio potasio) y BNNT (nanotubos de nitruro de boro), que exhiben cierta toxicidad relacionada a la disolución de iones en fluidos biológicos.

## 8. Evaluar aplicabilidad de piezoeléctricos biocompatibles (PVDF) como materiales osteogénicos/osteointeractivos, así también como aceleradores de cicatrización de heridas

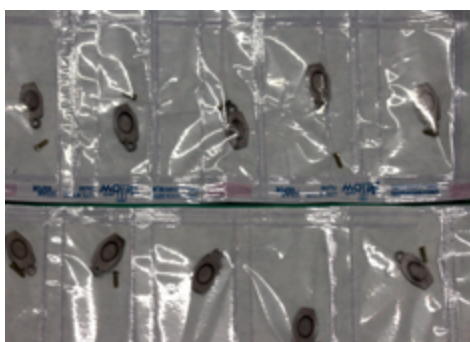
Se propuso en este desarrollo la utilización de PVDF en forma de membrana delgada o film como andamio (scaffold) laminar para regeneración ósea en tratamiento de lesiones y deformidades de cabeza y cara (sustitución de hueso craneofacial), que son producidas por graves traumatismos, cáncer o enfermedades congénitas. La utilización del andamio se puede proyectar también a otras aplicaciones como regeneración de huesos planos y otras que requieran grandes superficies y espesores pequeños. Se plantearon las primeras etapas del proyecto, que corresponden a la caracterización del material y su posterior evaluación mediante ensayos in vivo.

Se buscó hacer énfasis en la planificación de las etapas tempranas del proyecto sin perder de vista las perspectivas del mismo ni su aplicación final. En este sentido, se detallan los procedimientos efectuados en la cirugía correspondiente al “estudio comparativo del aumento óseo en tibia de conejo utilizando obturadores de Cr-Co microfijados junto a membrana de PVDF”. Este estudio buscó comparar a lo largo del tiempo el crecimiento óseo en tibia de conejo. Para ello se utilizaron cuatro conejos machos de raza “Nueva Zelanda”, uno como control y el resto para el estudio comparativo a lo largo del tiempo.

Una vez realizada la radiografía el conejo fue llevado a la sala de procedimientos, donde se efectuó la cirugía (Fig. 30). En el procedimiento participaron cuatro personas: una cirujana, dos asistentes y una fotógrafa, todos ellos con experiencia en este tipo de cirugía. La fotógrafa estaba al tanto del protocolo y tomaba tres fotografías en serie por cada hito destacado del procedimiento (incisión, presentación de las membranas, fresado para microtornillo, introducción de la membrana de PVDF, y membrana de CoCr (Fig 31) atornillada en el sitio).



**Fig. 30:** Anestesia en procedimiento quirúrgico.



**Fig. 31:** Membranas de CoCr esterilizadas.

### **Evaluación a los 60 días**

A los 60 días se procedió al eutanasiamiento de los conejos y se evaluaron las tibias realizando los siguientes estudios:

- Radiografías:
  - Densidad ósea
- TAC:
  - Volumen del callo
  - Grosor capa fibrosa
- Análisis histológico:
  - Conteo de células (osteocitos, osteoblastos, fibroblastos)
  - Caracterización de tejidos presentes
  - Tejido presente en la interfase con el film de PVDF

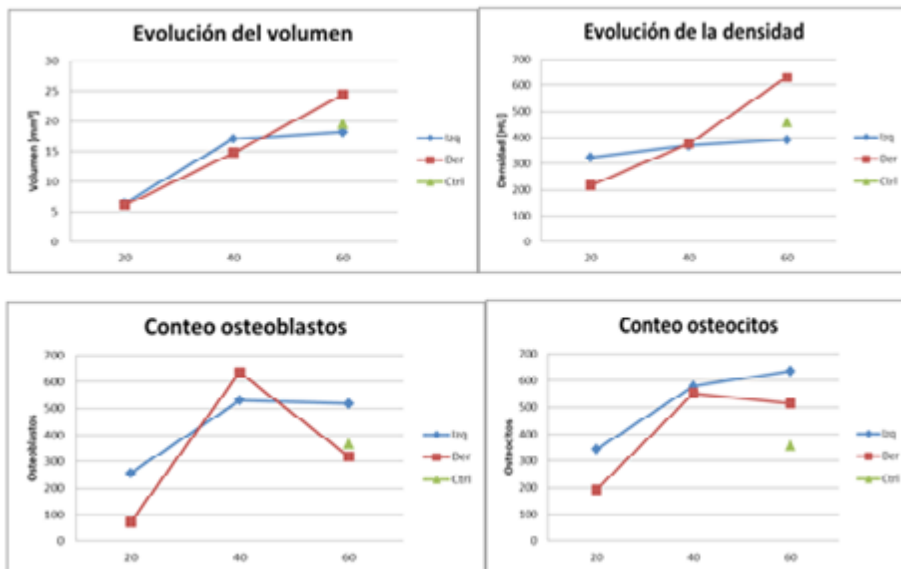
### **Resultados**

Como lo muestra la figura 32, el callo óseo generado, fue importante y se puede visualizar claramente con la lupa estereoscópica.



**Fig. 32:** Callo óseo formado a los 60 días.

El conteo celular y la TC arrojaron información clave para la interpretación de los resultados del experimento. En la figura 33 se evidencia el crecimiento del callo óseo en el tiempo (sup. izq.), el aumento de la densidad ósea (sup.der.), la evolución de los osteoblastos (inf.izq.) y la evolución de los osteocitos (inf. der.).



**Fig. 33:** Evolución del callo óseo formado a los 20, 40 y 60 días.

En la figura 34 se puede observar la reconstrucción de la tibia en 3D a partir de las imágenes 2D de la TAC (izq) y el conteo celular a partir de una sección de tibia (der.).

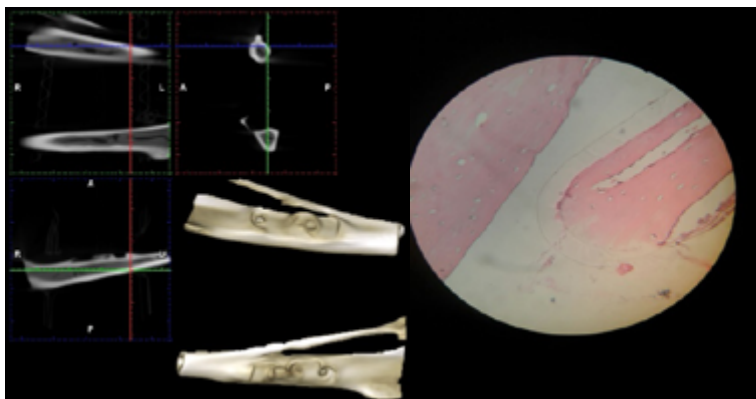


Fig. 34: Tibia 3D (izq.) y conteo celular (der.).

## Conclusiones

En líneas generales, se ha cumplido con la gran mayoría de las actividades propuestas para los años previstos siguiendo los lineamientos establecidos. Si bien se optó por finalizar anticipadamente con el proyecto, las metas alcanzadas superaron lo previsto.

El **avance más importante** se ha dado con el desarrollo del biosensor para el cual se ha propuesto una aplicación innovadora. Lo importante de esta aplicación fue que se originó como resultado de la interacción generada con el medio a través de actividades de difusión, reuniones, charlas y servicios. Las mismas constituyeron un vínculo vital con el sector, que comenzó a madurar a fin de 2015. El problema solucionado es el diagnóstico de patologías oculares con datos objetivos, independientemente del profesional que realice el estudio. El biosensor mide las propiedades físicas del fluido lagrimal y detecta la presencia de distintas sustancias químicas.

Según el estudio de mercado realizado y en boca de los oftalmólogos entrevistados, “con este dispositivo se mejoraría la confianza en el diagnóstico de este tipo de enfermedades que, actualmente al ser evaluadas con métodos subjetivos, carecen de exactitud”. Además se realizó un estudio de patentabilidad; a partir de estos resultados favorables se comenzó el proceso de patentamiento por parte de la FI-UNER con el objetivo de enviar lo antes posible la solicitud de patente.

Sumado a estos hechos, los resultados de la participación en congresos nacionales (SABI '15 y '17) e internacionales (ISECM '15) y en concursos de innovación y tecnología (INNOVAR '17 y Startupsummit '17 Novartis) superaron ampliamente las expectativas del grupo de investigación. Se generaron lazos y potenciales socios estratégicos que se espera capitalizar en el corto/mediano plazo.

## Indicadores de producción

La producción científica/tecnológica alcanzada se puede medir con los siguientes indicadores:

- Formación de recursos humanos.
- Publicaciones en revistas de difusión científica.
- Presentaciones en congresos nacionales e internacionales.
- Desarrollo tecnológico transferido: Proyecto “Biosensor portable para la evaluación de la salud ocular”. Los problemas de superficie ocular son de alta prevalencia mundial. Este dispositivo permite la evaluación de la lágrima para abordar problemas de superficie ocular. Se podrá evaluar la lágrima en cada consultorio/clínica, mejorando así la eficacia en el control de la salud ocular. Permite otorgar resultados claros, objetivos y reproducibles a partir de una muestra simple, en tiempo real y con alta

especificidad; las técnicas actuales, arrojan resultados subjetivos dependientes de la experiencia del profesional. El problema solucionado es el diagnóstico de patologías oculares con datos objetivos, independientemente del profesional que realice el estudio. El biosensor mide las propiedades físicas del fluido lagrimal y detecta la presencia de distintas sustancias químicas.

- Patente en trámite. "DISPOSITIVO BIOSENSOR Y METODO PARA DETECCION DE CONCENTRACIONES DE NGF EN LAGRIMA". Zalazar M, Mista C, Torres R. 2017. La presente invención se refiere a un dispositivo biosensor y método para la detección de concentraciones de XX en lagrime, el cual utiliza como transductor a una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), buscando con ello obtener un diagnóstico rápido sobre una toma de muestra de lágrima simple, logrando con el método de la presente invención detectar bajas concentraciones de xx conocido como xx, y siendo una de las biomoléculas más interesantes a evaluar en la lágrima. Asimismo el dispositivo, del tipo portable, permite la evaluación de la lágrima para abordar problemas de superficie ocular, a saber: medición de volumen, fluidez y biomarcadores específicos de la lágrima, mejorando la eficacia en el control de la salud ocular, permitiendo la evaluación de la lágrima en cada consultorio/clínica.

## Bibliografía

- Q. Huang and M. Oberle, "A 0.5-mW Passive Telemetry IC for Biomedical Applications," *IEEE Journal of Solid-state Circuits*, vol. 33, pp. 937-946, 1998.
- O'Sullivan, C., Guilbault, G., Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications, *Biosensors & Bioelectronics*, 14:663–670, 1999.
- Mecea, V., From Quartz Crystal Microbalance to Fundamental Principles of Mass Measurements, *Analytical Letters*, 38:753-767, 2005.
- Wu, D., Tsai, Y., Yen, Y., Robust design of quartz crystal microbalance using finite element and Taguchi method, *Sensors and Actuators B*, 92:337–344, 2003.
- Buck, R. et al., Piezoelectric chemical sensors, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 76, No. 6, 1139–1160, 2004.
- Measurement Specialties, Inc., Piezo Film Sensors-Technical Manual, 1999.
- Roh, Y. et al., Characterization of All the Elastic, Dielectric, and Piezoelectric Constants of Uniaxially Oriented Poled PVDF Films, *IEEE*, 2002.
- Sokhanvar, S. et al., Investigating The Effect Of The Orthotropic Property Of Piezoelectric PvdF, *Transactions of the CSME/ SCGM*, Vol. 31, No. 1, 2007.
- Dubois, M., Muralt, P., Properties Of Aluminum Nitride Thin Films For Piezoelectric Transducers And Microwave Filter Applications, *Applied Physics Letters*, Vol. 74, No. 20, 1999.
- Kang, J., Lee, M. S., Copland, J. a., Luxon, B. a., & Gorenstein, D. G. (2008). Combinatorial selection of a single stranded DNA thioaptamer targeting TGF-β1 protein. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18, 1835–1839.
- Matharu, Z., Patel, D., Gao, Y., Haque, A., Zhou, Q., & Revzin, A. (2015). Detecting Transforming Growth Factor - β Release from Liver Cells Using an Aptasensor Integrated with Micro fluidics.
- Zichi, D. A., & Schneider, D. J. (2003). (19) United States (12), 1(60).
- Barcellos-Hoff, M. H., & Akhurst, R. J. (2009). Transforming growth factor-beta in breast cancer: too much, too late. *Breast Cancer Research: BCR*, 11, 202.
- Anscher et al. Tgf β as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. 1993.
- Barthelemy et al. Increased TGF beta plasma level in patients with lung cancer. 2002.
- Tsushima et al. Circulating tgf-b1 as a predictor of liver metastasis after resection in colorectal cancer. 2001.

- Shen, J., Li, S., & Chen, D. (2014). TGF- $\beta$  signaling and the development of osteoarthritis. *Bone Research*, 2(14002).
- Blaney Davidson, E. N., van der Kraan, P. M., & van den Berg, W. B. (2007). TGF-B and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15, 597–604.
- Zalazar, M., Guarnieri, F., “Quartz Crystal Microbalance: Design and Simulation”, *Mecánica Computacional Vol XXVIII*, 2123-2136, 2009.
- Zalazar, M., Guarnieri, F., “Analysis and Evaluation of Piezoelectric Sensors Behaviour”, *Mecánica Computacional*, Vol XXIX, 6665-6684, 2010
- Tingrui Pan. Antonio Baldi. Babak Ziaie Remotely adjustable check-valves with an electrochemical release mechanism for implantable biomedical microsystems. *BirckNanotechnologyCenter.Other Nanotechnology Publications Purdue Libraries* 2007
- Zalazar, M., Gurman, P., Park, J., Kim, D., Hong, S., Stan, L., Divan, R., Czpałewski, D. and Auciello, O., “Integration of Piezoelectric Aluminum Nitride and Ultrananocrystalline Diamond Films for Implantable Biomedical Microelectromechanical Devices”, *Appl. Phys. Lett.* 102, 104101 (2013).
- Zalazar, M. and Guarnieri, F., “Diamond-Based Thin Film Bulk Acoustic Wave Resonator for Biomedical Applications”, *Journal of Physics: Conference Series* 477, 012009, 2014.
- P. Gurman, M. Zalazar, J. Park, and O. Auciello, “Design, Fabrication and Characterization of Ultrananocrystalline Diamond (UNCD) Membranes for Drug Delivery Devices”, Abstract for Contributed Talk at MRS Fall Meeting: Diamond Electronics and Biotechnology–Fundamentals to Applications VI Symposium, Boston, MS, 2012.
- P. Gurman, M. Zalazar and O. Auciello, “A New Generation of UNCD Based Drug Delivery Devices”, XXI International Materials Research Congress, Mexico, 2012.
- M. Zalazar, P. Gurman, O. Auciello and F. Guarnieri, “Design, Fabrication and Characterization of Ultrananocrystalline Diamond (UNCD) Membranes for Drug Delivery Devices”, New Diamond and Nano Carbons Conference, San Juan, Puerto Rico, 2012.
- Zalazar, M., Gurman, P., Park, J., Kim, D., Hong, S., Stan, L., Divan, R., Czpałewski, D. and Auciello, O., “Integration of Piezoelectric Aluminum Nitride and Ultrananocrystalline Diamond Films for Implantable Biomedical Microelectromechanical Devices”, New Diamond and Nano Carbons Conference, Novotel Clarke Quay, Singapore, 2013.
- Sassetti, F., Zalazar, M., Vottero, M. and Guarnieri, F., “Análisis de Tensiones Deformaciones en un Actuator para Dispositivo BioMEMS Utilizando FEM”, *Mecánica Computacional*, Vol XXXIII, 2773-2784, 2014.
- Pérez, M., Zalazar, M., Vottero, N., Schaumburg, F. and Guarnieri, F. “A 13.56 MHz RFID Microtransponder for Active Micro-valve for the treatment of Glaucoma XIX Congreso Argentino de Bioingeniería SABI 2013, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina, ISBN 978-978-23950-7-0, 2013.
- Pérez, M. Zalazar, M., Vottero, N., De La Plaza, A. and Guarnieri, F. “A 13.56MHz RFID Microtransponder for Active Micro-valve for the treatment of Glaucoma”, III Congreso de Microelectrónica aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura. Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina, 2012.
- Dubois, M., Mural, P., Properties Of Aluminum Nitride Thin Films For Piezoelectric Transducers And Microwave Filter Applications, *Applied Physics Letters*, Vol. 74, No. 20, 1999.



**PID 6161**

**Denominación del Proyecto**

Desarrollo de biosensor piezoeléctrico para el diagnóstico de enfermedades

**Director del proyecto**

ZALAZAR, Martín

**Codirector**

RETA, Juan Manuel

**Unidad Ejecutora**

Facultad de Ingeniería

**Dependencia**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Contacto**

[martinalazar@bioingenieria.edu.ar](mailto:martinalazar@bioingenieria.edu.ar)

**Integrantes del Proyecto**

Acosta, María G.; Cuenca, Gonzalo; Deccó, Alfredo; Escobar, Sergio O.;  
Filomena, Eduardo; Martina, Mauro S. Mista, Christian A.; Paravani, Enrique V.;  
Zuchuat, Jéssica I.; Peñalva, Albano (colaborador)

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

10/09/2015 y 09/09/2018

Aprobación del Informe Final por Resolución CS N° 358/18 (13/12/2018)

[<< VOLVER AL INICIO](#)