

Biosensores Cantilever

Nardo Ramírez Frómata

Departamento de Desarrollo, Dirección de Diagnóstico Microbiológico,
Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC)
Ave. 25 esq. 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: nardo.ramirez@cnic.edu.cu

ENFOQUE

RESUMEN

Numerosos artículos recientes confirman el potencial de los biosensores microcantilever para aplicaciones ambientales y biomédicas, así como su funcionalidad multifacética, lo cual indica su singularidad comparada con los diseños de los sensores más tradicionales. A diferencia de muchos tipos de transductores para sensores químicos, los microcantilever son simples dispositivos mecánicos: diminutas vigas o resortes batientes, cuyas dimensiones son: grosor entre 0.2 y 1 μm , ancho: entre 20 y 100 μm , y largo: entre 100 y 500 μm . Ellos están conectados al extremo de un soporte apropiado para su conveniente manipulación. El presente artículo es un comentario especializado sobre las más recientes aplicaciones de los biosensores cantilever en el campo de las ciencias biológicas, físicas y químicas. También se presentan al lector algunas de las potencialidades de estos biosensores que proporcionan información detallada sobre interacciones moleculares específicas. Además, se hace referencia al principio de funcionamiento, los logros y las tendencias de esta eficaz herramienta.

Palabras claves: biosensor, cantilever, electromecánico, interacciones moleculares

Biotecnología Aplicada 2006;23:316-319

ABSTRACT

Cantilever Biosensors. An increasing number of recent reports confirms the potential of MC sensors for environmental and biomedical applications, and the multiple functions of the MCs indicate their uniqueness as compared with more traditional sensor designs. Unlike many other types of transducers for chemical sensors, MCs are simple mechanical devices. They are tiny plates or leaf springs, typically 0.2-1 μm thick, 20-100 μm wide, and 100-500 μm long, which are connected on one end to an appropriate support for convenient handling. This paper is a specialized comment on the latest applications of cantilever biosensors in the field of Biological, Physical and Chemical Sciences. Likewise, the reader is provided with some of the potentials of these biosensors which offer detailed information on specific molecular interactions. Furthermore, reference is made to its functioning principle, achievements and the tendencies of this efficient tool.

Key words: biosensor, cantilever, electromechanical, molecular interactions

Introducción

Una gran parte de los sistemas micro electromecánicos y nanoelectromecánicos convencionales (MEMS y NEMS, respectivamente) se usan para detectar y sensar. El principio para sensar difiere según el dispositivo, en dependencia de lo que se desea detectar y de la precisión que se necesita. Entre los principios de sensado que dependen de las propiedades mecánicas, están el capacitivo, el piezo resistivo y el de frecuencia de resonancia.

Los investigadores comenzaron a utilizar los *cantilever* micromaquinados, como sondas de fuerza en la microscopia de fuerza atómica (MFA). De inmediato se percataron de su extrema sensibilidad frente a varios factores ambientales, tales como el ruido acústico, la temperatura, la humedad y la presión ambiental. Sin embargo, en 1994, dos equipos de investigadores: uno del Laboratorio Nacional Oak Ridge y el otro de IBM, convirtieron el mismo mecanismo que causaba la indeseada interferencia, en una plataforma para una nueva familia de biosensores. Ellos encontraron que un cantilever de MFA estándar podía funcionar como un microcalorímetro al ofrecer una sensibilidad del orden de 10^{-15} Joule y una mejora sustancial con respecto a las técnicas tradicionales. Midiendo el cambio en la frecuencia de resonancia de los microcantilever, los investigadores pudieron demostrar que son dispositivos sensibles a los cambios

de masa, con un mejor rendimiento que los sensores piezoeléctricos gravimétricos convencionales. Estos investigadores, quienes disponían de instrumentación para MFA, mostraron un interés sustancial en los cantilever como una nueva plataforma para una variedad de biosensores químicos y físicos.

Avances recientes en las tecnologías de microfabricación han impulsado nuevas aplicaciones para microherramientas y nanoherramientas. Los microcantilever y nanocantilever se han empleado como una nueva clase de biosensores: reconocen proteínas con extrema sensibilidad y detectan cantidades pequeñas de materiales, especialmente bacterias patógenas, cualidad importante para el diagnóstico médico y para supervisar el suministro de alimentos. Los sistemas microelectromecánicos y nanoelectromecánicos dirigidos, también pueden servir como detectores biológicos multifuncionales, altamente sensibles e inmunoespecíficos.

Cantilever

Los cantilever (del inglés, 'voladizo, tabla de salto o trampolín') son biosensores nanomecánicos, producidos por tecnología estándar de microfabricación de silicio, que tienen dimensiones en la gama del micrómetro al nanómetro (Figuras 1 y 2). La flexibilidad de los cantilever, conjuntamente con las técnicas para

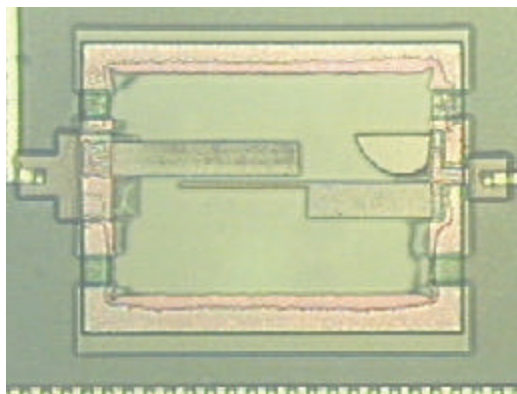


Figura 1. Nanorresonador para el proyecto Nanomass.

supervisar su flexión, han hecho de estos una herramienta versátil para la microscopía de exploración y para la detección de moléculas.

La tecnología estos sensores está establecida y bien documentada como una técnica multifuncional, altamente sensible, y un método en tiempo real, útil para una variedad de aplicaciones, que incluye los biosensores de gas para detectar explosivos plásticos, y los biosensores líquidos para detectar microorganismos enteros en estudios del ADN y de las proteínas.

Configuración de la medición

Al integrar un piezo resistor en cada cantilever en una configuración del tipo del puente de Wheatstone, es posible interpretar directamente un cambio de resistencia como un cambio del voltaje. La configuración del puente de Wheatstone puede consistir en un par de cantilever para utilizar uno como referencia. La salida de esta configuración es la señal diferencial entre el cantilever de medición y el cantilever de referencia. Esta configuración mejora eficazmente la relación señal-ruido y elimina el ruido que provocan los enlaces no específicos, las fluctuaciones térmicas y las vibraciones.

Los enlaces no específicos a una superficie es un problema general que se debe reducir al mínimo en todos los análisis. Al utilizar un cantilever como

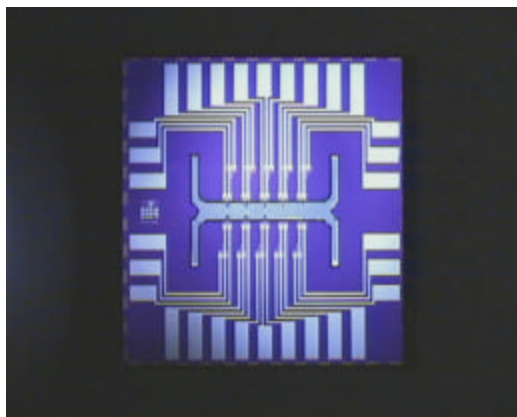


Figura 2. Arreglo de diez microcantilever integrados en un microcanal.

referencia, no se eliminan por completo los enlaces no específicos, pero sí es posible controlar su influencia en la detección.

Principio de funcionamiento: detección de interacciones moleculares

La inmovilización de moléculas sobre la superficie del cantilever es un requisito previo para su uso como sensor nanomecánico (Figuras 3 y 4). La selección de la molécula depende de la aplicación deseada, ya sea en la fase líquida o en la fase gaseosa. Las moléculas inmovilizadas hacen al cantilever específicamente sensible a otras moléculas con las cuales tenga afinidad. La interacción molecular sobre la superficie del cantilever hace que este se flexione, como resultado de la tensión superficial inducida por la interacción [1].

La tensión superficial inducida por interacciones moleculares, generalmente no se observa en la superficie de un material común. Sin embargo, cuando la reacción ocurre en la superficie de un cantilever flexible, la tensión superficial lo fuerza a flexionarse. El cantilever es un sensor de la tensión y se flexiona como respuesta a los cambios de energía libre en su superficie.

Lectura eléctrica

Tradicionalmente, la flexión del cantilever ha sido monitoreada, usando la técnica de “palanca óptica”, que tiene su origen en las técnicas de microscopía de exploración. Desarrollos recientes han logrado sensores cantilever con piezo resistores integrados. Estos biosensores se caracterizan por ofrecer una lectura eléctrica completa de la flexión del cantilever. Esta cualidad permite eliminar la compleja alineación del láser, realizar mediciones en líquidos opacos, y reducir el coste de la instrumentación.

Una característica particular de este principio de lectura eléctrica es la posibilidad de crear dispositivos portátiles para aplicaciones de análisis descentralizados, es decir, no hay que llevar las muestras hasta el laboratorio central.

1. Cantilever technology. 2006.[Sitio en Internet]. Disponible en: http://www.Cantion.com/cantilever_technology.htm. Último acceso:12 octubre 2006.

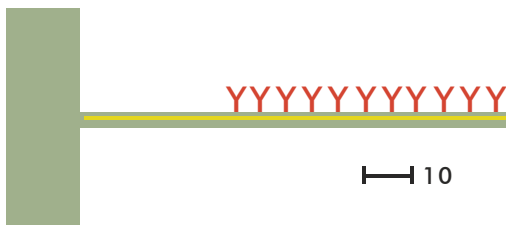


Figura 3. Cantilever (con piezoresistor integrado) sin detección.

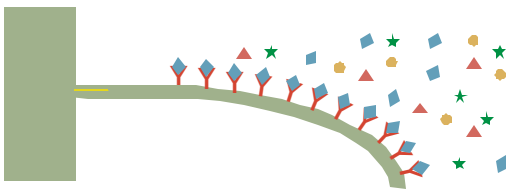


Figura 4. Cantilever con detección. Presencia de moléculas inmovilizadas sobre su superficie.

El piezo resistor integrado cambia su valor cuando se le aplica una fuerza; es un elemento sensor que posibilita medir la flexión del cantilever, por debajo de la escala manométrica. Generalmente, es difícil manejar cantilever por medio de la lectura piezo-resistiva en líquidos, debido al aislamiento poco efectivo entre el piezo resistor y el líquido.

La información obtenida

Los análisis acerca de la interacción molecular con los cantilever micromecánicos y nanomecánicos pueden proporcionar la información detallada sobre interacciones moleculares específicas. La interacción ocurre en la superficie de los cantilever donde una de las moléculas que interactúa ha sido inmovilizada. La exposición del *chip* a uno o más enlaces afines a la molécula inmovilizada proporciona la información que se relaciona con:

La concentración de la molécula

La señal de estado estacionario del cantilever y/o el índice de enlace a la superficie, dependen de la concentración de la molécula afín a la molécula inmovilizada presente en la solución. Las soluciones se pueden preparar con moléculas purificadas o la molécula afín a la molécula inmovilizada puede ser parte de una mezcla compleja.

La cinética de la interacción

La supervisión en tiempo real de la interacción molecular permite determinar la velocidad de una interacción específica. Cuando la muestra sustituye a la solución tampón corriente en la celda de flujo, las moléculas de la muestra se enlazan al “socio inmovilizado” en la superficie de un cantilever. Una vez que la muestra salga de la celda de flujo y sea remplazada por una solución tampón, las moléculas enlazadas en la superficie comenzarán a disociarse de su “socio inmovilizado”.

Para todos los análisis, la selectividad, la gama dinámica y otras características de funcionamiento del ensayo, se determinan en gran parte por la selección de la molécula de enlace unida a la superficie.

Medición de una señal

El voltaje diferencial de salida del puente de Wheatstone se supervisa en tiempo real. Cuando se coloca una muestra sobre el sensor, ocurre una interacción específica en la superficie del cantilever. La fuerza cambiará la tensión superficial y como resultado se flexionará el cantilever. Al plotear la respuesta contra el tiempo durante la interacción molecular, se obtiene una medida cuantitativa del progreso de la interacción. La amplitud y el tiempo de reacción antes de que se obtenga un nuevo estado estable, se usan para extraer información de la concentración y de las interacciones cinéticas.

Aplicaciones

Para detectar reacciones bioquímicas en la superficie del cantilever, una cara de este tiene que estar cubierta con una película detectora que reaccione con las moléculas bajo investigación. Esta nueva técnica de detección, basada en los cantilever, es muy sensible. Los biosensores basados en cantilever tienen un enorme

potencial, especialmente en el campo del análisis bioquímico. La técnica de detección puede ser utilizada para construir rápidos y sencillos detectores bioquímicos, pero debe permitir también nuevos estudios de interacciones moleculares sencillas, debido a la elevada sensibilidad mecánica de los microcantilever (Figura 5).

Como tecnología, los biosensores cantilever son aplicables a una gran cantidad de tareas específicas [2]:

1. Investigación acerca de las ciencias de la vida: estudio de los fundamentos de la interacción entre las moléculas biológicas u otras. Desarrollo de un nuevo análisis sobre la plataforma con aplicaciones potenciales en dispositivos manuales.

2. El diagnóstico *in vitro*: permite analizar las muestras químicas y biológicas mediante métodos mucho más rápidos, sensibles y libres de etiquetas, es decir, no se necesitan trazadores o marcadores para la identificación final.

3. Descubrimiento de fármacos: estudio de la interacción entre pequeñas moléculas y receptores específicos. Hacer análisis multiplexados o para incrementar el paralelismo y el contenido de los resultados de los análisis.

4. Control de agua fresca: detectar iones metálicos pesados en agua fresca. Desarrollo de ensayos para uso descentralizado para el control de resina u otros compuestos relacionados, en el suministro de agua fresca [3].

Logros

Los avances de la nanotecnología permiten desarrollar sistemas portátiles para aplicaciones biológicas, físicas y químicas, y alcanzar niveles de detección ultrasensibles con muy bajo consumo de reactivos y analitos.

Por medio de los biosensores nanomecánicos se han podido detectar cambios de masa del orden de 1.10^{-12} gramos, lo cual se corresponde con una variación de 1 Hz en la frecuencia de resonancia del sistema [4].

Un ejemplo de la aplicación de los osciladores micromecánicos en la detección de una sola célula, lo constituye un sensor de masa que se basa en la medición de la frecuencia resonante, compuesto por un sensor cantilever de nitruro de silicio de baja tensión para la detección de *Escherichia coli* (*E. coli*). Este sensor presenta anticuerpos de enlace con la sensibilidad suficiente para detectar una célula. La etapa de enlace implica la interacción entre los anticuerpos de *E. coli* O157:H7 inmovilizados sobre la superficie del cantilever y el antígeno O157 presente en la superficie de *E. coli* patógena O157:H7. La carga total adicional del enlace específico de las células de *E. coli* se detectó midiendo un cambio de la frecuencia resonante del

2. Nanomechanics for bio/chemical detection. 2006. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.mic.dtu.dk/Research/NSE/BioProbe/Introduction.aspx>. Último acceso: 4 septiembre 2006.

3. Nanomechanical cantilever. 2006. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.Cantion.com/applications.htm>. Último acceso: 12 octubre 2006.

4. Nanomechanical sensor. 2006. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://monet.physik.unibas.ch/nose/inficon/>. Último acceso: 4 noviembre 2006.

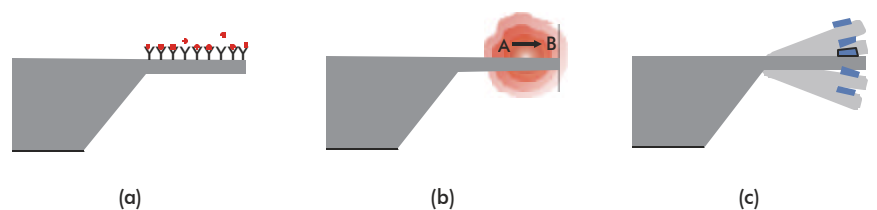


Figura 5. Empleo de cantilever para la detección de cambio de tensión superficial (a), cambios de temperatura (b) y de masa (c).

oscilador micromecánico. De los espectros medidos de la frecuencia resonante del cantilever, en aire, antes y después de la unión célula-anticuerpo, se calculó que la masa de una sola célula de *E. coli* puede ser de 665 fg, la cual se corresponde con otros informes [5].

Un grupo de trabajo multidisciplinario de la Universidad de Aarhus, Dinamarca, reporta que utilizando un cantilever con un elemento piezo resistivo interno lograron detectar una secuencia de una cadena de ADN [6].

La aplicación de los cantilever micromecánicos y nanomecánicos ha posibilitado el estudio de interacciones moleculares en tiempo real, la detección de bacterias enteras de forma rápida al no requerir del tiempo de crecimiento de estas, así como de toxinas y residuos de antibióticos en productos alimenticios. Uno de los campos en que ha habido una rápida y amplia aplicación de los sensores nanomecánicos, es en la detección de agentes químicos contaminantes, tanto en los alimentos como en el medio ambiente.

Además, se ha desarrollado un sistema para la inmovilización múltiple y simultánea de moléculas en secciones separadas sobre un arreglo de cantilever de forma simple. Esta configuración incrementa de manera notable la eficiencia de cualquier medición química. Resulta una ventaja que un cantilever sea tratado con la misma molécula, ya que permite coleccionar una mayor cantidad de datos por cada medición, lo cual incrementa la confiabilidad de esta [7].

Existe una configuración que consiste en un arreglo de 33 microcantilever para la detección de ADN con el empleo del polímero SU-8 soporte. Las propiedades mecánicas de este sistema, tales como la constante *spring*, frecuencia de resonancia y factor de calidad, se caracterizan como una función de las dimensiones y el medio. Al comparar esta tecnología con la de los cantilever comerciales a base de silicio, quedó demostrada que la sensibilidad mejoró en un factor de 6 [8].

En la literatura es posible encontrar múltiples aplicaciones de los biosensores nanomecánicos: detección bioquímica [9], detección de ADN [10], de proteínas [11], de pesticidas [12] y de explosivos TNT [13].

Sistema sensor cantilever SU-8 con lectura integrada

Convencionalmente, los cantilever se han fabricado de silicio, y un sistema óptico conocido de la microscopia de fuerza atómica. Estos se han empleado para la detección. Esta nueva aplicación presenta como soporte el polímetro SU-8, y la lectura se realiza mediante un sensor de fuerza integrado, de oro [14].

Diseño de una nariz artificial

Sistema portátil capaz de identificar varios vapores de compuestos orgánicos volátiles. Es un sistema automático de flujo de gas, que transporta el analito a la cámara de análisis, la cual contiene un arreglo de cantilever nanomecánicos. La adquisición de datos y el control se realiza por medio de una computadora personal [15].

Conclusiones

El campo de la microtecnología y de los sistemas microelectromecánicos (MEMS) ha crecido exponencialmente durante las dos últimas décadas del siglo XX. Recientemente los investigadores han centrado su trabajo en la búsqueda de materiales alternativos a la ya tradicional tecnología basada en el silicio. Uno de los materiales más prometedores para los nuevos diseños de micro-sistemas y nanosistemas es el polímetro SU-8. Entre sus útiles propiedades se destacan su fotosensibilidad, su transparencia a la luz visible, su bajo módulo de Young (también conocido como módulo de elasticidad, es un parámetro mecánico que proporciona una medida de la rigidez de un material sólido), así como su elevada biocompatibilidad. Su propia estructura lo convierte en un material estable desde el punto de vista químico y térmico, que permite la realización de microestructuras muy finas con una excelente relación de elementos como: señal-ruido óptima. El uso del SU-8 también permite que el proceso de fabricación de los cantilever, basado en el micromaquinado de superficies sea mucho más simple, barato y versátil. Esto hace que la integración de nuevas funcionalidades sea más fácil y permita el desarrollo de una amplia variedad de cantilever, tanto en formas como en aplicaciones.

5. Single cell detection with micro-mechanical oscillators. 2006. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://scitation.aip.org/getabs/servlet/GetabsServlet?prog=normal&id=JVTBD90000190000600282500001&idtype=vips&gifs=yes>. Último acceso: 4 noviembre 2006.

6. Piezoresistive cantilevers. 2006. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://cat.inist.fr/?Modele=afficheN&cpsid=17066108>. Último acceso: 4 noviembre 2006.

7. Nordstrom M, Calleja M, Boisen A. Polymeric micro-channel-based functionalisation system for micro-cantilever. Ultramicroscopy 2005;105:281-6.

8. Calleja M, Nordstrom M, Álvarez M, Tamayo J, Lechuga LM, Boisen A. Highly sensitive polymer-based cantilever-sensors for DNA detection. Ultramicroscopy 2005;105:215-22.

9. Larvik NV, Sepaniak MJ, Datskos PG. Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors. Rev Sci Instrum 2004;75:2229-50.

10. Fritz J, Baller MK, Lang HP, Rothuizen H, Vettiger P, Meyer E, Untherodt HG, Gerber CH, Gimzewski JK. Translating biomolecular recognition into nanomechanics. Science 2000;288:316-8.

11. Arntz Y, Seeling JD, Lang HP, Zhang J, Hunziker P, Ramseyer JP, Meyer E, Hegner M, Gerber CH. Label free protein assay based on a nanomechanical cantilever array. Nanotechnology 2003;14:86-90.

12. Álvarez M, Calle A, Tamayo J, Lechuga LM, Abad A, Montoya A. Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT. Biosens Bioelectron 2003;18:649-53.

13. Pinnaduwage LA, Thundat T, Gehl A, Wilson SD, Hedden DL, Lareau RT. Desorption characteristics of uncoated silicon microcantilever surfaces for explosive and common non explosive vapors. Ultra microscopy 2004;100:211-6.

14. Johansson A, Calleja M, Rasmussen PA, Boisen A. SU-8 cantilever sensor system with integrated readout. Sensors Actuators A 2005;123-124:111-5.

15. Artificial nose. 2006. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://monet.physik.uni-bas.ch/nose/index.html>. Último acceso: 2 noviembre 2006.

Recibido en noviembre de 2006. Aprobado en noviembre de 2006.