

## APPLICAZIONI BIOLOGICHE DEI RISONATORI AL QUARZO A ONDE ELASTICHE TRASVERSALI

Andrea Bettucci

Sapienza Università di Roma – Dipartimento di Scienze di Base Applicate per l'Ingegneria, Roma, andrea.bettucci@uniroma1.it

### SOMMARIO

I risonatori al quarzo a onde elastiche trasversali – usualmente identificati con la sigla QCM (dall'inglese *Quartz Crystal Microbalance*) o indicati, meno comunemente, con l'acronimo TSMR (dall'inglese *Thickness Shear Mode Resonators*) – costituiscono versatili sensori acustici per la determinazione in tempo reale delle variazioni di massa e dell'energia elastica dissipata nel materiale in contatto con la superficie del risonatore. Data la loro estrema sensibilità, tali sensori vengono sempre più impiegati in ambito biologico per la determinazione delle proprietà viscoelastiche di fluidi biologici, per lo studio dell'assorbimento di biomolecole e per l'analisi delle forze di interazione tra la membrana cellulare e substrati di diversa natura. Questo articolo è una breve e aggiornata rassegna delle principali applicazioni dei risonatori di tipo QCM in campo biologico.

### 1. Introduzione

La richiesta di sistemi per l'analisi di superfici *in situ* è fortemente aumentata in questi ultimi anni parallelamente allo sviluppo delle nanotecnologie. In ambito biologico, in particolare, vi è un sempre maggiore interesse verso la realizzazione di biosensori che siano da un lato siano semplici dal punto di vista costruttivo e dell'elettronica di supporto e, contemporaneamente, permettano una rapida, selettiva, ma aspecifica, misura e controllo di eventi biologici che si verificano in particolari condizioni [1]. Questo tipo di biosensori viene correntemente usato in biomedicina, nella clinica diagnostica, nel monitoraggio ambientale per il controllo di inquinanti così come in applicazioni industriali nel controllo, ad esempio, della contaminazione batterica nella produzione di cibi e bevande[2].

I risonatori al quarzo a onde elastiche trasversali, comunemente noti con la sigla QCM (*Quartz Crystal Microbalance*), costituiscono dei sensori acustici di alta frequenza ( $\approx 5\text{MHz}$ ) che soddisfano i requisiti sopra descritti e che, in misura sempre crescente, vengono utilizzati in ambito biologico [3].

### 2. I risonatori QCM

Un risonatore acustico a onde elastiche trasversali di tipo QCM è costituito da un sottile disco di quarzo con taglio AT – ovvero ottenuto da un minerale di quarzo tagliato con un angolo di  $35.25^\circ$  rispetto alla direzione dell'asse ottico – sulle cui facce sono depositati degli elettrodi, generalmente d'oro. A causa della natura piezoelettrica del cristallo di quarzo, una tensione alternata applicata agli elettrodi provoca una deformazione trasversale, cosicché le due superfici del disco si vibrano spostandosi parallelamente l'una all'altra ma in direzioni opposte [4].

La frequenza di risonanza di un risonatore QCM decresce linearmente in funzione della massa depositata su una delle superfici del cristallo di quarzo secondo la relazione (legge di Sauerbrey [5]):

$$(1) \quad \Delta m = -\frac{C}{n} \Delta f_n \quad [\text{g/cm}^2]$$

dove  $\Delta f_n$  (Hz) è la variazione in frequenza del modo risonante di ordine  $n$ ,  $\Delta m$  rappresenta la densità areica di massa depositata sulla superficie;  $C$  indica la costante di sensibilità di massa del risonatore e dipende dalle caratteristiche elastiche di

quest'ultimo: ad esempio, per un cristallo risonante a 5 MHz,  $C=17,7 \text{ ng/Hz}\cdot\text{cm}^2$  a  $20^\circ\text{C}$ . L'Eq. (1) è valida unicamente quando la massa è depositata in maniera uniforme sulla superficie del risonatore, è inferiore alla massa del cristallo di quarzo ed è costituita da un materiale non viscoso: la massa depositata, cioè, viene supposta accrescere semplicemente lo spessore del trasduttore. Date queste caratteristiche, i risonatori QCM furono inizialmente impiegati in sistemi di deposizione di film sottili al fine di verificare in tempo reale lo spessore del film [6].

A partire dagli anni 80 è iniziato lo studio sulla possibile utilizzazione dei risonatori QCM per caratterizzare sottili film di liquido e, di conseguenza, sono iniziate le sperimentazioni per applicazioni in campo biologico [7-9]. Se da una parte la natura viscosa dei film biologici a contatto con il trasduttore, provocando una dissipazione di parte dell'energia elastica nel film, fa perdere validità all'Eq. (1), dall'altra la misura dell'energia dissipata permette di per sé una caratterizzazione del film liquido.

L'energia elastica dissipata,  $D$ , nel film liquido in contatto con il traduttore, è una quantità adimensionale data da:

$$(2) \quad D = \frac{1}{Q} = \frac{E_{dissip}}{2\pi E_{imm}}$$

essendo  $Q$  il fattore di merito del trasduttore + liquido,  $E_{dissip}$  l'energia dissipata in un periodo ed  $E_{imm}$  rappresenta l'energia immagazzinata nel sistema oscillante. Il fattore  $D$  può essere misurato o tramite misure di impedenza elettrica del sistema liquido+trasduttore (mediante *network analyzer*) [10], o tramite l'analisi del decadimento temporale dell'ampiezza di vibrazione del trasduttore (mediante un sistema impulsato di eccitazione del trasduttore) [11]. I due metodi sono equivalenti [12], sebbene, per fluidi newtoniani, l'analisi impedenzometrica permetta di correlare la resistenza  $R$  del circuito equivalente del trasduttore alla viscosità del liquido consentendo misure reologiche di alta precisione [13]. Nella Fig. 1, ad esempio, è riportato, in funzione della temperatura, l'andamento del prodotto viscosità  $\times$  densità della parte plasmatica del sangue umano, che si comporta come un liquido newtoniano, ricavato tramite metodo impedenzometrico applicato a un trasduttore QCM risonante a 5 MHz in contatto con il plasma: il decremento del prodotto viscosità  $\times$  densità al crescere della temperatura del

plasma è ascrivibile quasi esclusivamente alla dipendenza della viscosità del plasma dalla temperatura, risultando la densità del plasma praticamente costante nell'intervallo di temperatura considerato.

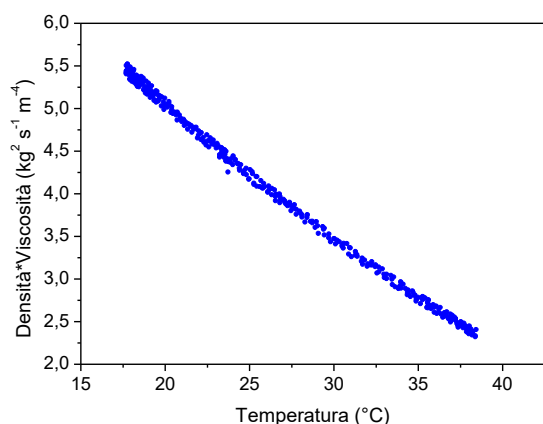


Figura 1 – Andamento in funzione della temperatura del prodotto densità × viscosità del plasma umano ricavato dall'analisi dell'impedenza elettrica di un trasduttore QCM risonante a 5 MHz.

### 3. Applicazioni biologiche dei risonatori QCM

L'estrema sensibilità dei risonatori QCM all'energia elastica dissipata nel film liquido in contatto, li ha resi strumenti assai versatili per applicazioni bioanalitiche come, ad esempio, lo studio in tempo reale dell'adsorbimento e del desorbimento di proteine, nonché per la determinazione dello spessore e del livello di idratazione di film proteici [14]. Sono state anche studiate le potenzialità dei risonatori QCM per il controllo della crescita di bi-strati lipidici, costituenti un modello della membrana cellulare [15], e per lo studio dell'interazione di tali bi-strati con proteine [16], DNA [17] e peptidi [18].

I risonatori QCM vengono anche utilizzati nello studio della dinamica cellulare; essi infatti, poiché gli spostamenti sulla superficie del sensore, in condizioni sperimentali standard, sono dell'ordine di qualche nanometro, costituiscono dei perfetti mezzi non invasivi per il controllo in tempo reale dell'adesione e dell'accrescimento di cellule sulla superficie del trasduttore [19], e per lo studio della cinetica di questi processi [20].

La profondità di penetrazione dell'onda elastica nel liquido a contatto con il trasduttore QCM,  $\delta$ , definita come lo spessore del liquido nel quale l'ampiezza di vibrazione decresce di un fattore  $1/e$  rispetto al valore assunto sulla superficie del trasduttore, dipende dalla viscosità e densità del liquido,  $\eta$  e  $\rho$  rispettivamente, e dalla frequenza di risonanza dell' $n$ -esimo modo di vibrazione del trasduttore,  $f_n$ , secondo la relazione [13]:

$$(3) \quad \delta = \sqrt{\frac{\eta}{\pi \rho f_n}} \quad [\text{m}]$$

Ad esempio, per un risonatore QCM risonante alla frequenza fondamentale ( $n = 1$ ) di 5 MHz,  $\delta \approx 250$  nm; questa lunghezza è confrontabile con l'altezza basale di uno strato monocellulare depositato sulla superficie del trasduttore stesso, talché, dalle variazioni del comportamento elastico del trasduttore, è possibile inferire informazioni sul processo di adesione cellula-substrato [21].

### 4. Conclusioni

I trasduttori a onde elastiche trasversali, mostrano un comportamento elastico fortemente influenzato dalla presenza di film liquidi viscosi in contatto con la loro superficie. Questa proprietà rende interessanti tali trasduttori per applicazioni di ricerca nella biologia cellulare come, ad esempio, la determinazione delle proprietà viscoelastiche di fluidi biologici, lo studio dell'assorbimento di biomolecole e delle interazioni tra cellula e substrato.

### 5. Bibliografia

- [1] Cooper M. A., *Non-optical screening platforms: the next wave in label-free screening?*, Drug Discov Today **11** (2006), pp. 1068–1074
- [2] Cooper M. A. and Singleton V. T., *A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions*, J. Mol. Recognit. **20** (2007), pp. 154–184
- [3] Marx K. A., *The quartz crystal microbalance and the electrochemical QCM: Applications to studies of thin polymer films, electron transfer systems, biological macromolecules, biosensors, and cells*, Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors 5, Springer (2006), pp. 371–424.
- [4] Rodahl M., Kasemo B., *Frequency and dissipation-factor responses to localized liquid deposits on a QCM electrode*, Sensor Actuat B-Chem **37** (1996), pp. 111–116.
- [5] Sauerbrey G. Z., *Use of quartz vibrator for weighing thin films on a microbalance*, Z. Phys. **155** (1959), pp. 206–222
- [6] Lu, C. S., Lewis, O., *Investigation of film-thickness determination by oscillating quartz resonators with large mass load*, J. Appl. Phys. **43** (1972), pp. 4385–4390.
- [7] Nomura T., Iijima M., *Electrolytic determination of nanomolar concentrations of silver in solution with a piezoelectric quartz crystal*, Anal Chim Acta **131** (1981), pp. 97–102.
- [8] Bruckenstein S., Shay M., *Experimental aspects of use of the quartz crystal microbalance in solution*, Electrochimica Acta **30** (1985), pp. 1295–1300.
- [9] Ferreira G. N., da-Silva A. C., Tomé B., *Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance*, Trends Biotechnol **27** (2009), pp. 689–697.
- [10] Johannsmann D., *Viscoelastic, mechanical, and dielectric measurements on complex samples with the quartz crystal microbalance*, Phys Chem Chem Phys **10** (2008), pp. 4516–4534.
- [11] Rodahl M., Kasemo B., *Frequency and dissipation-factor responses to localized liquid deposits on a QCM electrode*, Sensor Actuat B-Chem **37** (1996), pp. 111–116.
- [12] Zhang Y., Du B., Chen X., Ma H., *Convergence of dissipation and impedance analysis of quartz crystal microbalance studies*, Anal Chem **81** (2009), pp. 642–648.
- [13] Bandy H L., Martin S. J., Cernosek R. W., *Modeling the response of thickness-shear mode resonator under various loading conditions*, Anal. Chem. **71** (1999), pp. 2205–2214.
- [14] Höök F, Kasemo B, Nylander T, Fant C, Sott K, et al., *Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mepp-1 protein film during adsorption and cross-linking: a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study*, Anal Chem **73** (2001), pp. 5796–5804.
- [15] Keller C.A., Kasemo B., *Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance*, Biophys J **75** (1998), pp. 1397–1402.
- [16] Lee H.S., Contarino M., Umashankara M., Schön A., Freire E, et al., *Use of the quartz crystal microbalance to monitor ligand-induced conformational rearrangements in HIV-1 envelope protein gp120*, Anal Bioanal Chem **396** (2010), pp. 1143–1152.
- [17] Marques B. F., Schneider J. W., *Sequence-specific binding of DNA to liposomes containing di-alkyl peptide nucleic acid (PNA) amphiphiles*, Langmuir **21** (2005), pp. 2488–2494.
- [18] Cho N. J., Cho S. J., Hardesty J. O., Glenn J. S., Frank C. W., *Creation of Lipid Partitions by Deposition of Amphipathic Viral Peptides*, Langmuir **23** (2007), pp. 10855–10863.
- [19] Wegener J., Janshoff A., Galla H. J., *Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines*, Eur Biophys J **28** (1998), pp. 26–37.
- [20] Saitakis M., Gizeli E., *Acoustic sensors as a biophysical tool for probing cell attachment and cell/surface interactions*, Cell Mol Life Sci **69** (2012), pp. 357–371.
- [21] Li F., Wang J.H., Wang Q.M., *Monitoring cell adhesion by using thickness shear mode acoustic wave sensors*, Biosens Bioelectron **23** (2007), pp. 42–50.