

Estudio voltamétrico de la inmovilización de anticuerpos anti-*Escherichia coli* ATCC 25922 en electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea

Voltammetric study of antibody immobilization anti-*Escherichia coli* ATCC 25922 on naked gold electrodes and modified with thiourea

Pedro R Matheus R, Nathaly A Hernández P, Pedro J Navarro D*, Emily N Pacheco P.

Laboratorio de Análisis Instrumental. Departamento de Análisis y Control.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis. * Laboratorio de Electroquímica. Facultad de Ciencias.
Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.
Teléfono:0274-2403438.e-mail:pmateus@ula.ve

RESUMEN

Se realizó el estudio voltamétrico de la inmovilización de anticuerpos anti-*Escherichia coli* ATCC 25922 en electrodos de oro desnudos y electrodos de oro modificados con tiourea. Las cepas de *Escherichia coli* fueron cultivadas durante 24 horas en medio tripticasa de soya, provenientes del Laboratorio de Microbiología del Agua de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes en Mérida-Venezuela. Los resultados obtenidos muestran que ocurre la inmovilización de los anticuerpos anti-*E. coli* tanto en la superficie de los electrodos de oro desnudos, así como en los modificados con tiourea, ya que en ambos casos ocurre la detección de *Escherichia coli*. Al comparar ambos resultados, podemos decir que en oro desnudo el potencial de pico anódico es menor que en oro modificado con tiourea, +0,158V y +0,251V respectivamente; igual comportamiento ocurre con las corrientes de pico anódicas, $0,127 \times 10^{-4} \text{A}$ y $0,156 \times 10^{-4} \text{A}$ respectivamente. Un mayor potencial implica que la presencia de la monocapa de tiourea en el electrodo, hace que se dificulte la transferencia de electrones desde el anticuerpo al electrodo. Así mismo, los resultados obtenidos permiten sugerir un método para la inmovilización de moléculas biológicas en superficies de oro modificadas. De igual forma, el método utilizado permitió demostrar la especificidad de la unión anticuerpo-antígeno (anticuerpo-*E.coli*), al agregar volúmenes de *Klebsiella pneumoniae*, demostrando que el inmunosensor tiene la capacidad de reconocer la presencia o ausencia de *E. coli* en un medio, así como conocer si un anticuerpo es específico o no para un determinado antígeno.

Palabras claves: Electroquímica, voltimetría, inmovilización, inmunosensores, cepa ATCC 25922, especificidad, selectividad.

ABSTRACT

The voltammetric study of immobilization of anti-*Escherichia coli* antibodies ATCC 25922 was carried out on naked gold electrodes and gold electrodes modified with thiourea. The strains of *Escherichia coli* were cultivated for 24 hours in trypticase soybean medium, from the Laboratory of Microbiology of Water of the Faculty of Pharmacy and Bioanalysis of the University of Los Andes in Merida-Venezuela. The results obtained show that the immobilization of the anti-*E. coli* antibodies occurs on both the surface of the naked gold electrodes as well as those modified with thiourea, since in both cases the detection of *Escherichia coli* occurs. When comparing both results, we can say that in naked gold the anodic peak potential is lower than in gold modified with thiourea, +0.158V and +0.251V respectively; similar behavior occurs with the anodic peak currents, $0.127 \times 10^{-4} \text{A}$ and $0.156 \times 10^{-4} \text{A}$ respectively. Higher potential implies that the presence of the thiourea monolayer in the electrode makes it difficult to transfer electrons from the antibody to the electrode. Likewise, the results obtained suggest a method for the immobilization of biological molecules on modified gold surfaces. Likewise, the method used demonstrated the specificity of antibody-antigen (antibody-*E.coli*) binding, by adding volumes of *Klebsiella pneumoniae*, demonstrating that the immunosensor has the ability to recognize the presence or absence of *E. coli* in a medium, as well as to know if an antibody is specific or not for a certain antigen.

Key words: Electrochemistry, voltammetry, immobilization, immunosensors, strain ATCC 25922, specificity, selectivity.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una bacteria de la flora habitual del intestino y representa uno de los microorganismos más importantes en el humano, debido a que agrupa una gran variedad de cepas que causan padecimientos extra-intestinales e intra-intestinales. La Organización Mundial de la Salud ha identificado a *Escherichia coli*, como el mayor microorganismo de interés por su gran capacidad como patógeno y supervivencia bajo condiciones adversas, razones por lo que se ha establecido un programa continuo de vigilancia sanitaria, específicamente en enfermedades transmitidas por alimentos (1-3). En la actualidad, son requeridas técnicas sensibles, rápidas y económicas cuyo resultado sea utilizado como alarma para la detección de algunos microorganismos. La detección inmunológica de bacterias, virus, parásitos y toxinas ha demostrado ser más sensible, específica y reproducible, debido en gran parte a la producción de anticuerpos específicos de manera rápida y económica. En este aspecto, el desarrollo de biosensores, específicamente inmunosensores, ha favorecido la detección de diversos microorganismos en el área alimentaria, bioanalítica y medioambiental (4-8). Por consiguiente, el diseño de inmunosensores se ha basado en una serie de pasos que permitan la detección del microorganismo de interés; estos pasos son: selección y preparación del transductor, selección del biorreceptor inmunológico (anticuerpo), inmovilización del biorreceptor inmunológico en la superficie del transductor y transducción del evento de bioeconamiento (unión antígeno-anticuerpo) (8-10).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras microbiológicas utilizadas en esta investigación fueron cepas de *E. coli* ATCC 25922 sembradas en medio de cultivo Tripticasa de Soya e incubadas durante 24 horas, provenientes del Laboratorio de Microbiología del Agua de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela). Se utilizó Agar BHI para inocular y activar las cepas bacterianas. Para realizar el conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) e inocular las últimas dos diluciones seriadas para la siembra por extensión, se utilizó Agar tripticasa de soya. El buffer utilizado en este estudio fue fosfato 0,1M. Se utilizaron reactivos de grado analítico y agua ultrapura (*Millipore*) con una resistividad específica de 18 Ω .cm. Para la preparación de la suspensión microbiana fue utilizado Patrón 0,5 de Mc Farland que corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea

de *E. coli* de $1,5 \times 10^8$ bacterias/mL (11). Todos los procedimientos ejecutados durante este trabajo fueron realizados bajo condiciones de esterilidad y por separado para cada una de las cepas utilizadas, según las normas establecidas en el Laboratorio de Microbiología del Agua antes mencionado. Para las medidas electroquímicas, se utilizó un celda construida en vidrio que consta de un sólo compartimiento, con una tapa también de vidrio, con tres orificios para introducir los electrodos, y otros dos orificios para la entrada y salida de gases; esta celda está conectada a un cilindro de Nitrógeno y al potencióstato analizador Autolab–USB modelo PGSTAT12/30 conectado a un PC Pentium 4. Como electrodos de trabajo se usaron hilos de oro con 99,99% de pureza, de 0,50mm de diámetro y una longitud aproximada de 15mm e hilos de oro modificados con tiourea 5mM (Au/SAM/TOU), como electrodo auxiliar se utilizó un hilo de platino con 99,9% de pureza y como electrodo de referencia Ag/AgCl, en solución saturada de KCl3M. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente, presión atmosférica y atmósfera saturada de Nitrógeno. El material de vidrio fue previamente lavado con solución sulfocrómica (10g. de $K_2Cr_2O_7$ disueltos en 90mL de agua y 360mL de ácido sulfúrico); debe tenerse extremo cuidado al manipular esta solución. Seguidamente el material fue lavado con abundante agua destilada y finalmente con agua ultrapura ($18M\Omega$).

- **Preparación de las superficies de oro**

Los electrodos de hilo de oro se pasaron por llama suave hasta el rojo vivo, se llevaron a temperatura ambiente y posteriormente, se pulieron con gamma-alúmina 3 (0.05micron, Buehler) sobre lana para pulir. Se lavaron con agua de $18M\Omega$, se pasaron por ultrasonido durante 20 minutos en mezcla etanol- H_2O (2:1) y finalmente se secaron al aire.

- **Caracterización y determinación del área efectiva del electrodo**

Se llevó a cabo mediante la realización de voltametrías cíclicas en medio ácido, sometiendo el electrodo de oro desnudo a un barrido de potencial desde +0,5V hasta +1,4V en ácido sulfúrico 0,5M a $100mV.seg^{-1}$. El área efectiva del electrodo se determinó integrando el área bajo el pico catódico característico del oro y próximo a +0,9V tomando como referencia el valor de $482\mu C.cm^{-2}$ para una monocapa de óxido adsorbida sobre oro policristalino (10).

- **Formación de monocapas autoensambladas de tiourea (SAM/TOU)**

El electrodo de hilo de oro, una vez calculada su área efectiva, se sumergió a temperatura ambiente y durante 24 horas, en una disolución 5mM de tiourea preparada en etanol-H₂O (2:1) para formar una monocapa sobre oro SAM/TOU. Seguidamente se lavó con una mezcla etanol-H₂O (2:1) durante 5 minutos y luego se secó al aire.

- **Inmovilización del anticuerpo anti-*E.coli* ATCC 25922**

Se realizó mediante incubación de los electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea, en disoluciones del anticuerpo anti-*E.coli* ATCC 25922 (50µL) preparadas en 1mL de solución buffer NaH₂PO₄/KCl 0,1M a pH 6,20, durante 1, 2 y 4 horas a temperatura ambiente. Una vez seleccionado el tiempo de incubación, se procedió a realizar las diferentes medidas voltamétricas.

- **Control electroquímico de la formación de las monocapas autoensambladas de tiourea**

Para comprobar la formación de la monocapa de tiourea sobre la superficie de los electrodos de oro, se efectuaron voltametrías cíclicas en KOH 0,5M como electrolito soporte y corriente de N₂. Estas voltametrías se realizaron en un intervalo de potencial desde -1,2V hasta -0,2V, a velocidad de barrido de 100mV.seg⁻¹.

- **Ensayos electroquímicos**

Los electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea con el anticuerpo (Au/SAM/TOU/AC) inmovilizado en ellos, se colocaron en la celda electroquímica, previamente desoxigenada mediante burbujeo con corriente de N₂ y a temperatura ambiente, conteniendo 5mL de solución de KCl 0,01M o buffer NaH₂PO₄/KCl 0,1M a pH 6,20, realizando las voltametrías cíclicas correspondientes. Antes de medir la respuesta del antígeno *E. coli*, se realizaron diferentes voltametrías con el fin de obtener las condiciones óptimas de trabajo, con respecto a velocidad de barrido, burbujeo de N₂, pH del buffer y solución electrolítica (experimentos no presentados). Además se varió la cantidad de anticuerpo y se realizaron diferentes procedimientos de modificación del electrodo Au/SAM/TOU con el anticuerpo inmovilizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Afinidad de los electrodos de hilo de oro limpios por los anticuerpos anti- *E.coli* ATCC 25922**

Una vez determinado el tiempo de burbujeo de N_2 y la velocidad de barrido, se procedió a analizar la afinidad del oro por las moléculas biológicas en estudio. Es bien sabido que los complejos de oro se han utilizado en diversas metodologías para obtener moléculas oro-proteína u oro-ADN, facilitando así la detección y cuantificación de las mismas. Diversos autores han realizado diferentes ensayos de afinidad detectando antígenos o anticuerpos de interés biológico o bien secuencias de ADN determinantes de un patógeno. En conclusión, cualquier molécula biológica que pueda actuar como antígeno o anticuerpo, puede ser utilizada como analito en estudio (12-14). En nuestro caso para comprobar la afinidad del oro en relación al anticuerpo seleccionado contra la *E. coli*, se realizaron voltametrías cíclicas en KCl 0,01M (30mL) en oro desnudo agregando cantidades determinadas de anticuerpo a la solución electrolítica, donde se pudo observar que a medida que se aumentaba la concentración de anticuerpo, la señal de oxidación del oro aproximadamente a + 0,25V fue disminuyendo como se observa en los voltamogramas de la figura 1. Este fenómeno se evidencia en diversas investigaciones donde los autores reportan que los complejos de oro pueden marcar o unirse a cualquier molécula biológica proteica (antígeno o anticuerpo), principalmente si contiene en su secuencia de aminoácidos grupos tioles o puentes disulfuro (12-14). De acuerdo a lo observado en la figura 1, se puede asumir que existe afinidad entre el electrodo de oro y el anticuerpo anti-*E.coli*, permitiendo que ocurra la adsorción a la superficie de dicho electrodo, haciendo que éste bloquee al electrodo e impida el flujo de electrones con tanta facilidad, por lo que la corriente de oxidación disminuye a medida que la concentración del anticuerpo aumenta. La corriente de pico anódica aparece a +0,158V y tiene un valor aproximado de $0,127 \times 10^{-4}A$.

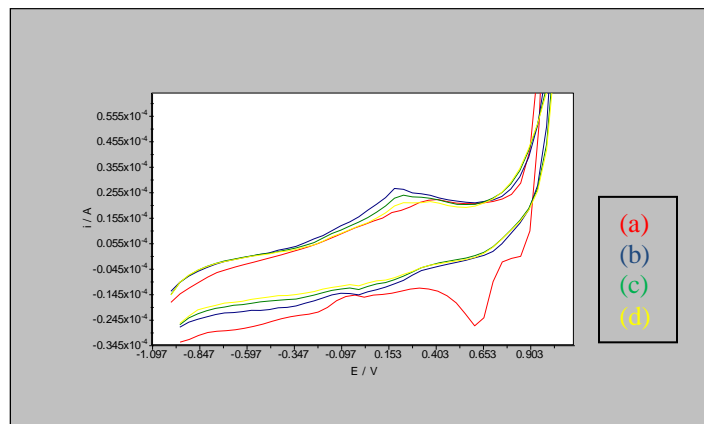


Figura 1. Voltamogramas cíclicos en KCl 0,01M de un electrodo de hilo de oro. Para: (a) oro desnudo, (b) oro desnudo con 200µL de anticuerpo, (c) oro desnudo con 500µL de anticuerpo y (d) oro desnudo con 1000µL de anticuerpo. Ventana de potencial – 1,0 a +1,0V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100mV/s. Atmósfera de N₂.

- **Modificación de la superficie de oro con monocapas autoensambladas de tioles y anticuerpos anti-*E.coli* ATCC 25922**

Posterior a la formación de la monocapa de tiourea se procedió a seleccionar el tiempo de incubación del electrodo Au/TOU en la solución del anticuerpo anti-*E.coli* (50µL en 1mL de solución buffer NaH₂PO₄/KCl 0,1M) a pH 6,20 y temperatura ambiente, para lo cual se realizaron voltametrías cíclicas en KCl 0,01M en una ventana de potencial desde – 1,0 a 0,0V vs Ag/AgCl bajo corriente de N₂. Analizando la figura 2 se puede decir que la inmovilización del anticuerpo generó una pequeña elevación de la corriente en comparación con los valores de corriente obtenidos con el electrodo oro/tiourea (voltamograma a). Este efecto también fue observado por Zuzuregui y colaboradores, en la inmovilización de polimixina B, donde se originó un aumento de la corriente respecto a la curva base de oro, lo cual atribuyeron a las cargas presentes en la molécula peptídica (15). En relación a los voltamogramas (b), (c) y (d) de los electrodos modificados incubados en anticuerpo, no se observaron diferencias significativas, por tanto se seleccionó el tiempo de incubación de una hora, ya que fue el menor tiempo establecido para la inmovilización del anticuerpo.

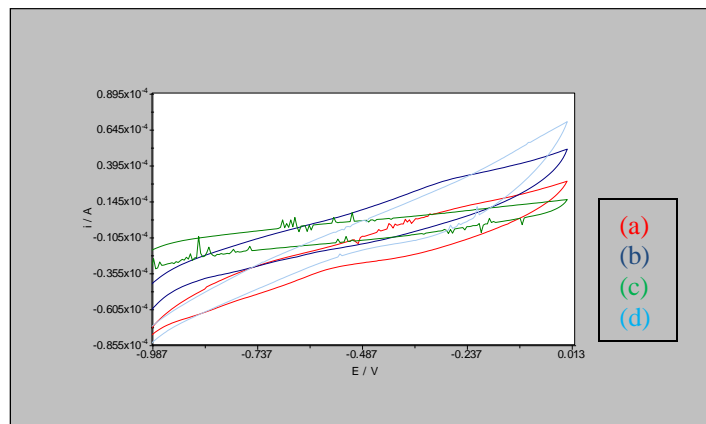


Figura 2. Voltamograma cíclico en KCl 0,01M de un electrodo de hilo de oro/ tiourea. Para: (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/Ac 1 hora, (c) Au/TOU/Ac 2 horas y (d) Au/TOU/Ac 4 horas. Ventana de potencial desde – 1,0 a 0,0V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100mV/s. Atmósfera de N₂.

- **Afinidad de los electrodos de hilo de oro por el anticuerpo anti-*E.coli* y la adición posterior de *Escherichia coli* ATCC 25922**

Diversos autores han realizado diferentes ensayos de afinidad detectando antígenos o anticuerpos de interés biológico o bien secuencias de ADN determinantes de un patógeno. En conclusión, cualquier molécula biológica que pueda actuar como antígeno o anticuerpo, puede ser utilizada como analito en estudio (12-14). Con el fin de comprobar si la adsorción del anticuerpo a la superficie del electrodo de oro sería influenciada por la adición posterior de su antígeno correspondiente (*Escherichia coli*), se realizaron voltametrías cíclicas agregando a la solución electrolítica (KCl 0,01M) un volumen constante de anticuerpo y diferentes volúmenes de antígeno. Al observar los voltamogramas de la figura 3, podemos asumir que al agregar el anticuerpo (1000 μ L) ocurrió la adsorción del mismo sobre la superficie del electrodo de oro. Posteriormente, al agregar la *Escherichia coli* ocurre la formación del inmunocomplejo, es decir, unión antígeno-anticuerpo, disminuyendo la corriente de pico anódica ubicada a +0,234V y siendo adsorbidos ambos en la superficie del electrodo. Este fenómeno también fue descrito por Keel y colaboradores en el 2010 al observar la interacción del antígeno PSPB (Proteína B Específica de la Preñez) con los anticuerpos co-inmovilizados con una enzima sobre la superficie de un electrodo de oro. Al formar grandes complejos antígeno-anticuerpo, estos limitaban el acceso del sustrato específico al sitio activo de la enzima, provocando por tanto una disminución en la señal eléctrica medida producto

de una inhibición de la corriente catódica proporcional al aumento de concentración de la proteína (16). En nuestro caso, disminuyen ambas corrientes de pico (anódica y catódica).

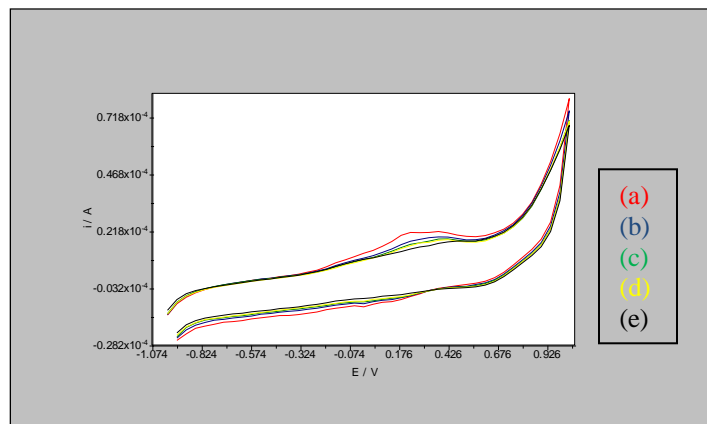


Figura 3. Voltamogramas cíclicos en KCl 0,01M de un electrodo de hilo de oro. Para: (a) oro desnudo con 1000 μ L de anticuerpo, (b) oro desnudo con 1000 μ L de anticuerpo agregando 1mL de disolución de *E. coli* (aprox. 3,0x10⁸ UFC/mL), (c) oro desnudo con 1000 μ L de anticuerpo agregando 2mL de disolución de *E. coli* (aprox. 6,0x10⁸ UFC/mL), (d) oro desnudo con 1000 μ L de anticuerpo agregando 3mL de disolución de *E. coli* (aprox. 9,0x10⁸ UFC/mL) y (e) oro desnudo con 1000 μ L de anticuerpo agregando 4mL de disolución de *E. coli* (aprox. 12,0x10⁸ UFC/mL). Ventana de potencial -1,0 a +1,0V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100mV/s. Atmósfera de N₂.

- **Afinidad de los electrodos de hilo de oro modificados con tiourea por el anticuerpo anti-*E.coli* y la adición posterior de *Escherichia coli* ATCC 25922**

En la figura 4 se observan las voltametrías cíclicas del electrodo de oro/tiourea incubado por una hora en una mezcla de 1mL de solución buffer NaH₂PO₄/KCl 0,1M y 50 μ L de anticuerpo, agregando posteriormente *Escherichia coli* en volúmenes determinados. Se puede evidenciar la presencia del anticuerpo inmovilizado en el electrodo Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac (voltamograma b). De acuerdo a lo observado podemos decir que al poner en contacto el electrodo de oro/tiourea con el anticuerpo ocurre la detección de éste a +0,251V, evidenciándose un aumento en la corriente de pico anódica de aproximadamente 0,156x10⁻⁴A, en comparación al electrodo de oro/tiourea (voltamograma a). Una vez que se agregó el antígeno (*Escherichia coli*) a la solución electrolítica, se pudo observar que la respuesta electroquímica del inmunocomplejo (corriente de pico anódica) fue disminuyendo, a medida que se

incrementaba la concentración de la *E. coli* hasta llegar casi a la saturación (voltamogramas c, d y e). Los picos de corrientes catódicas mostraron el mismo comportamiento. Podemos suponer que la inmovilización del anticuerpo en el electrodo de oro/thiourea no es estable y al agregar el antígeno correspondiente, se produce la unión antígeno-anticuerpo y se adsorbe el inmunocomplejo en la superficie del electrodo, observándose una disminución de la corriente anódica ocasionada por el bloqueo del electrodo por parte del anticuerpo inmovilizado, este fenómeno impide el flujo normal de electrones, por lo que la corriente del pico de reducción disminuye en comparación al electrodo de oro/thiourea/anticuerpo (voltamograma b). Por tanto, es detectada la presencia del inmunocomplejo inmovilizado en la superficie del electrodo modificado a medida que se aumenta la concentración de *Escherichia coli*, hasta que el anticuerpo llega a saturarse, voltamogramas (d) y (e). Este efecto también fue reportado por Molina y col. en el 2009, quienes realizaron estudios en electrodos de carbón vítreo modificados con Zeolita tipo "A" (17).

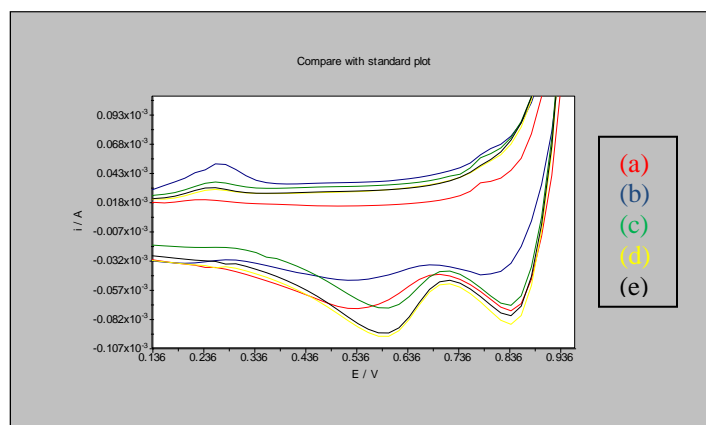


Figura 4. Voltamograma cíclico en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1M de un electrodo de hilo de oro/thiourea. Para: (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ durante 1 hora, (c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ durante 1 hora agregando 1mL de *E.coli* (aprox. $3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ durante 1 hora agregando 2mL de *E.coli* (aprox. $6,0 \times 10^8$ UFC/mL), y (e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ durante 1 hora agregando 3mL de *E.coli* (aprox. $9,0 \times 10^8$ UFC/mL). Ventana de potencial desde +0,136 a +0,936V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100mV/s. Atmósfera de N_2 .

- **Estabilidad de la unión anticuerpo-antígeno al electrodo modificado con tiourea a pH 6,20**

Una vez realizadas las voltametrías agregando hasta 5mL de antígeno, se procedió a renovar la solución electrolítica (sin cantidades de *E. coli*), y se realizaron barridos secuenciales al electrodo Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl pH 6,20/Ac. 1 hora/5mL de *E.coli* (aprox. 1,5 x10⁹ UFC/mL), con el fin de corroborar la estabilidad de la unión anticuerpo-antígeno en la superficie del electrodo de oro modificada. Al observar la figura 5 se puede apreciar una señal de oxidación a aprox. +0,350V, además de que no hubo diferencia significativa entre los barridos consecutivos (voltamogramas d, e, f y g); tampoco se observó desprendimiento del inmunocomplejo inmovilizado, por tanto se corroboró la estabilidad de la unión anticuerpo-antígeno en la superficie del electrodo de oro modificado hasta por cuatro barridos consecutivos.

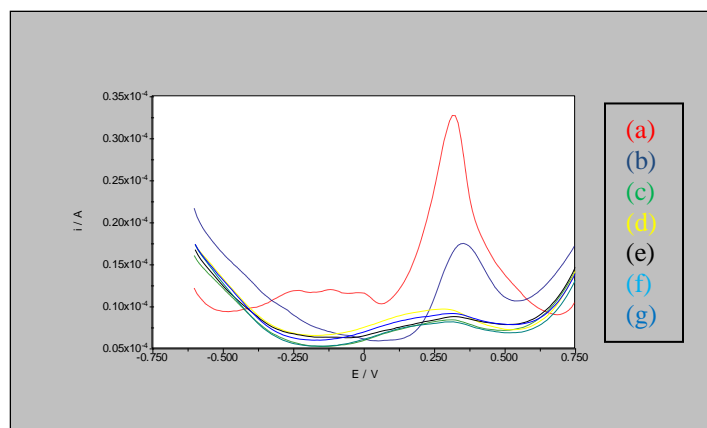


Figura 5. Voltametrías de pulso diferencial en NaH₂PO₄/KCl 0,1 M pH 6,20. Para: (a) línea discontinua electrodo Au/TOU, (b) línea discontinua Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora, (c) línea discontinua Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora/5mL de *E.coli* (aprox. 1,5 x10⁹ UFC/mL), (d) Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora/5mL de *E.coli* (aprox. 1,5 x10⁹ UFC/mL) (primer barrido), (e) Au/TOU/ NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora/5mL de *E.coli* (aprox. 1,5 x10⁹ UFC/mL) (segundo barrido) (f) Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora/5mL de *E.coli* (aprox. 1,5 x10⁹ UFC/mL) (tercer barrido) y (g) Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora/5mL de *E.coli* (aprox. 1,5 x10⁹ UFC/mL) (cuarto barrido). Ventana de potencial desde -0,6 hasta +0,75mV/s. Atmósfera de N₂.

- **Especificidad de la unión anticuerpo-antígeno**

Con el fin de comprobar la especificidad del electrodo modificado con el anti-*E.coli*, se realizaron voltametrías de pulso diferencial agregando cantidades determinadas de solución de *Klebsiella pneumoniae*, la cual no es específica para el anticuerpo utilizado. En la figura 6 se puede observar una señal de oxidación a aprox. +0,350V y que a medida que se va agregando la cepa *Klebsiella pneumoniae*, no hay disminución de la corriente de pico anódica, es decir, ésta no se ve afectada por la adiciones de *Klebsiella pneumoniae*, asumiendo que la *Klebsiella pneumoniae* no se une al anticuerpo y por tanto, no es inmovilizada en la superficie del electrodo modificado. Sin embargo, observamos que a medida que se agregan volúmenes de *Klebsiella pneumoniae*, las corrientes de pico anódicas aumentan, a diferencia de lo observado en la figura 5, donde la presencia de la *E. coli* hace que disminuya la corriente de pico anódica, pudiendo concluir que además de ser un biosensor específico para la unión anticuerpo-antígeno (anti-*E.coli*), también puede ser selectivo para reconocer la presencia o ausencia de *E. coli* en un medio, así como para saber si un anticuerpo es específico o no para un determinado antígeno.

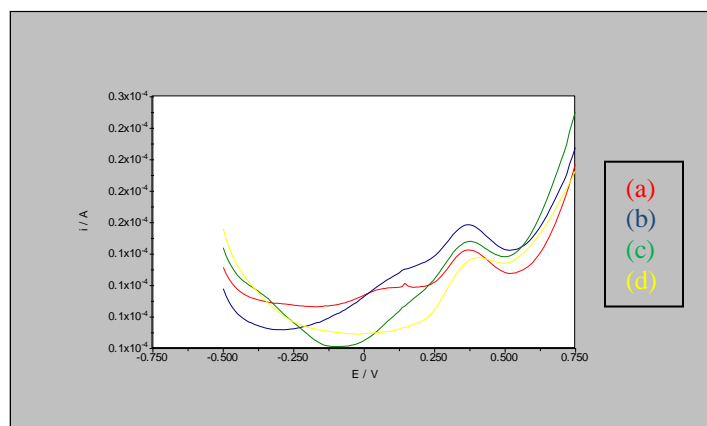


Figura 6. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1M pH 6,20. Para: (a) electrodo $\text{Au}/\text{TOU}/\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora, (b) $\text{Au}/\text{TOU}/\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 1mL de *Klebsiella pneumoniae* (aprox. $3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (c) $\text{Au}/\text{TOU}/\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 2mL de *Klebsiella pneumoniae* (aprox. $6,0 \times 10^8$ UFC/mL), (d) $\text{Au}/\text{TOU}/\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 3mL de *Klebsiella pneumoniae* (aprox. $9,0 \times 10^8$ UFC/mL). Ventana de potencial desde -0,50 hasta +0,75V. Atmósfera de N_2 .

CONCLUSIONES

- 1.- Los resultados obtenidos muestran que ocurre la inmovilización de los anticuerpos anti-*E. coli* sobre la superficie de los electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea, ya que en ambos casos ocurre la detección de *Escherichia coli*. Al comparar ambos resultados, podemos decir que en oro desnudo la corriente de pico anódica aparece a +0,158 V y tiene un valor aproximado de $0,127 \times 10^{-4}$ A. En el caso del oro modificado con tiourea, podemos decir que al poner en contacto el electrodo de oro/tiourea con el anticuerpo ocurre la detección de éste a +0,251 V, observándose una corriente de pico anódica de aprox. $0,156 \times 10^{-4}$ A. Un mayor potencial implica que la tiourea inmovilizada en el electrodo, hace que se dificulte la transferencia de electrones desde el anticuerpo al electrodo. En cuanto a las corrientes medidas en ambos casos, habría que tomar en cuenta otros parámetros para optimizar las condiciones de trabajo, debido a que los valores de corrientes anódicas obtenidos se encuentran muy cercanos entre sí.
- 2.- La utilización de anticuerpos específicos permite diferenciar y detectar específica- y selectivamente *Escherichia coli* mediante la unión antígeno-anticuerpo.
- 3.- El tiempo requerido para el análisis de muestras utilizando el biosensor diseñado en esta investigación (previamente preparado con la monocapa tiourea/anticuerpo), aproximadamente 1 hora, representa una ventaja frente a las técnicas microbiológicas clásicas (aproximadamente 48 horas), simplificando el proceso de análisis de muestras complejas.
- 4.- La metodología utilizada en esta investigación puede ser recomendada para la elaboración de un biosensor selectivo a *Escherichia coli* y para reconocer específicamente este patógeno en muestras complejas con múltiples microorganismos.
- 5.- Los resultados obtenidos permitieron sugerir un método para la inmovilización de moléculas biológicas en superficies de oro modificadas. De igual forma, el método utilizado en esta investigación permitió analizar la especificidad de la unión anticuerpo-antígeno (anticuerpo-*E.coli*), al agregar volúmenes de *Klebsiella pneumoniae*, demostrando que el biosensor tiene la capacidad de reconocer la presencia o ausencia de *E. coli* en un medio, así como conocer si un anticuerpo es específico o no para un determinado antígeno, resultados alentadores en el desarrollo de biosensores para la detección de patógenos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Laboratorios de Microbiología del Agua de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y de Electroquímica de la Facultad de Ciencias, ambos de la Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela), por facilitar el material microbiológico, los equipos y reactivos necesarios para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Gutiérrez M, Urbina D, Matiz A, Puello M, Mercado M, Parra M, et al. Comportamiento de la diarrea causada por virus y bacterias en regiones cercanas a la zona ecuatorial. *Colomb. Med.* 2005; 36(Supl. 3): 6-14.
2. Koneman E, Allen S, Janda W. Diagnóstico microbiológico. 4 ed. Washington DC: Editorial JB Lippincott Company; 1992.
3. Blanco J, Blanco M, Blanco J, Mora A, Alonso M, González E, et al. Enterobacterias: Características generales. Género *Escherichia*. En: Vadillo S, Piriz S, Mateos E. Manual de microbiología veterinaria. Barcelona, España: Editorial McGraw-Hill Interamericana; 2002.
4. Hu R, Luan J, Kharasch E, Singamaneni S, Morrissey J. Aromatic functionality of target proteins influences monomer selection for creating artificial antibodies on plasmonic biosensors. *ACS Appl. Mater Interfac.* 2017; 9(1):145-151.
5. Xu M, Wang R, Li Y. Electrochemical biosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Talanta.* 2017; 162:511-522.
6. Abdalhai M, Fernandes A, Xia X, Musa A, Ji J, Sun X. Electrochemical genosensor to detect pathogenic bacteria (*Escherichia coli* O157:H7) as applied in real food samples (Fresh Beef) to improve food safety and quality control. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63(20):5017-25.
7. Wang Ch, Kim J, Zhu Y, Yang J, Lee G-H, Lee S, et al. An aptameric graphene nanosensor for label-free detection of small-molecule biomarkers. *Biosens and Bioelec.* 2015; 71:222-229.
8. Zacco E. Diseño de nuevos materiales de afinidad universal. Aplicación en sensores. Grupo de Sensores y Biosensores. Barcelona, España, Departamento de Química, Universidad Autónoma de Barcelona; 2006.
9. Matheus P, Abad J, Navarro P, Beldandria O, Hernández N, Fernández VM. Efecto de la polietilenimina en la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*) inmovilizada en electrodos de oro modificados con

- monocapas autoensambladas de tioles (SAMs). Avanc. Quím. 2009; 4(1):37-43.
10. Matheus P, Abad J, Fernández V.M. Modificación de superficies de oro para la inmovilización orientada de peroxidasa de rábano recombinante. Rev. Técn. Fac. Ing. Univ. Zulia. 2007; 30(3):225-35.
 11. Roldán M, Chinen Y, Otero J, Miliwebsky E, Alfaro N, Burns P, Rivas M. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. Rev. Argen. Microb. 2007. Disponible en: <http://www.scielo.com> [Consultado el 13 de julio de 2013].
 12. Costa A, González M, Escosura A. Complejos de oro como marca de moléculas. [Trabajo Especial de Grado]. Universidad de Oviedo-Plaza de Riego; 2005.
 13. Annapurna J, Schraa S, Anwar Hussein A. Equilibrium binding constants and facile dissociation of novel serum albumin-dicyanoaurate(I) complexes. J. Biol. Inorg. Chem. 1998; 3:9-17.
 14. Coffey M, Shaw C, Eidsness M. Reactions of Auranofin and *Et3P AuCl* with bovine serum albumin. Inorg. Chem. 1986; 25:333-339.
 15. Zuzuarregui A. Desarrollo de un sistema de detección de endotoxinas basado en la optimización e implementación de un protocolo de biofuncionalización sobre un biosensor electroquímico de diseño específico. [Tesis Doctoral]. Universidad de Navarra. 2013.
 16. Keel K, Tosar J, Laíz J. Desarrollo de superficies modificadas oro-anticuerpo anti-PSPB para su uso como biosensor en la detección de preñez bovina. Rev. Lab. Tecnol. Uru. 2010; 5:29.
 17. Molina A, Villavicencio C, Fernández L. Evaluación de un electrodo de carbón vítreo modificado con Zeolita tipo "A" en la adsorción de 2-clorofenol. Avanc. Quím. 2009; 4(2):63-72.