

INMOVILIZACIÓN ORIENTADA DE ANTICUERPOS anti-Escherichia coli O157:H7 SOBRE SOPORTES DE ORO MODIFICADOS CON TIOUREA

TARGETED IMMOBILIZATION OF anti-Escherichia coli O157:H7 ANTIBODIES ON THIOUREA-MODIFIED GOLD SUPPORTS

Pedro Matheus Romero, Jessiree Azuaje Quintero, Idelmar Carrillo Monterrey, Génesis Colina Nieto

Laboratorio de Análisis Instrumental. Departamento de Análisis y Control. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela 5101
prmatheus23@gmail.com

Recibido: 16-04-2024

Aceptado: 15-05-2024

RESUMEN

Se realizó el diseño y la preparación de un biosensor electroquímico para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica conservada en agar durante 4 años en medio de cultivo BHI. La detección fue realizada mediante voltametrías cíclicas (VC) utilizando como soporte un hilo de oro (electrodo de oro) con 99,99% de pureza, 0,50mm de diámetro y 15mm de longitud, al que se le realizó una limpieza con diferentes lijas y se pulió con gamma-alúmina 3 (0,05micrón). Seguidamente se realizó la modificación de la superficie del electrodo de oro, sumergiéndolo en una disolución 5mM de tiourea, preparada en etanol-H₂O (2:1), formándose monocapas autoensambladas de tioles sobre este. Posteriormente se realizó la inmovilización del elemento de bioreconocimiento, incubando los electrodos de oro modificados con tiourea en disoluciones de anticuerpos contra *Escherichia coli* O157:H7 a temperatura ambiente. Los mejores resultados para esta inmovilización se encontraron a pH 6,20, velocidad de barrido a 100mV/s y un tiempo de incubación de entre 30 minutos y 1 hora.

Palabras clave: *Escherichia coli* O157:H7, monocapas autoensambladas, inmovilización orientada, anticuerpos anti-*Escherichia coli* O157:H7.

ABSTRACT

The design and preparation of an electrochemical biosensor was performed for the detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 kept in agar during years in BHI growing medium. The detection was carried out using cyclic voltammetry (CV) at a modified gold working electrode (99.99 % wire), 0.50 mm diameter and 15mm length, which was cleaned with different sandpaper and polished with gamma-alumina 3 (0.05 μ m). The modification of the surface of the gold electrode was then done, immersing it in a 5mM thiourea-ethanol-H₂O solution 2:1), forming self-assembled monolayers of thiols on it. Subsequently, the immobilization of the biorecognition element was carried out by incubating the gold electrodes modified with thiourea in solutions of antibodies against *Escherichia coli* O157:H7 at room temperature. The best results for this immobilization were found at pH 6.20, at 100mV/s sweep rate and an incubation time within the range 30 minutes -1 hour.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, self-assembled monolayers, oriented immobilization, anti-*Escherichia coli* O157:H7 antibodies.

Pedro Matheus Romero: Dr por la Universidad Autónoma de Madrid dentro del Programa de “Tendencias Actuales en Química Inorgánica y Avanzada”. España. MSc en Química Aplicada, Mención Electroquímica. ULA. Venezuela. Diploma de Estudios Avanzados (D.E.A) por la Universidad Autónoma de Madrid dentro del Programa de “Tendencias Actuales en Química Inorgánica y Avanzada”. España. Personal docente y de investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA. **Jessiree Azuaje Quintero:** Estudiante del 7mo. Semestre de la Carrera de Bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. **Idelmar Carrillo Monterrey:** Licenciada en Bioanálisis. Universidad de Los Andes. **Génesis Colina Nieto:** Licenciada en Bioanálisis. Universidad de Los Andes.

Introducción

La necesidad de llevar a cabo determinaciones analíticas de manera rápida, selectiva y con elevada sensibilidad ha dado lugar a la aparición y amplio desarrollo de los denominados biosensores. Estos dispositivos analíticos que incorporan un elemento biológico como fase sensorial asociado a un transductor físico-químico, presentan un enorme potencial para la detección de numerosos analitos en el ámbito de análisis clínico, industria alimenticia o medioambiental.¹

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.²⁻⁶

Es importante saber que el principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto o microorganismo de interés y el elemento de reconocimiento. Como resultado de esta unión se produce la variación de una o varias propiedades fisicoquímicas (pH, transferencia de electrones, calor, cambio de potencial o de masa, variación de las propiedades ópticas, entre otras) que detecta el transductor. Seguidamente este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal eléctrica indicativa de la presencia del analito o microorganismo, la cual es proporcional a la concentración de este en la muestra.^{6,7}

Por consiguiente, el diseño de un biosensor 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 bioreconocimiento (unión antígeno-anticuerpo).^{6,8,9}

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 extraintestinales e intraintestinales. Según la Organización Mundial de la Salud *E. coli*, ha sido identificada 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 y por agua.^{10, 11}

A pesar de los numerosos estudios que se han realizado sobre biosensores, pocos han sido enfocados en la detección de *Escherichia coli* específicamente el serotipo O157:H7. Para la determinación de esta bacteria existen diversas técnicas estandarizadas que permiten una fácil cuantificación y determinación de ella, pero muy pocas son asociadas a técnicas electroquímicas. Dentro de este orden de ideas en esta investigación se diseñó y preparó un biosensor específico que permita identificar la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en medio acuoso de KCl de una forma más rápida y precisa, que permita estandarizarlo y en un futuro ser aplicado en muestras biológicas y alimentos.

Desarrollo

Las muestras microbiológicas utilizadas en esta investigación fueron cepas de *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica guardadas en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes durante 4 años en agar conservación, reactivadas inicialmente en caldo BHI; se repicaron y se incubaron de 16 a 18 horas a 37°C. Seguidamente fueron pasadas a placa (agar BHI) de donde se fueron repicando en caldo básico para su posterior utilización, siguiendo siempre las pautas de seguridad y las normas establecidas en el Laboratorio antes mencionado.¹

Para las medidas electroquímicas, se utilizó una 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 potenciostato 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 0,50 mm de diámetro y una longitud aproximada de 15 mm e hilos de oro modificados con tiourea 5 mM (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 K₂Cr₂O₇ disueltos en 90mL de agua y 360 mL 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 (18MΩ).¹²

Materiales y métodos.

La activación de la bacteria E. coli O157:H7 se realizó en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Los ensayos electroquímicos fueron realizados en el Laboratorio de Electroquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

Preparación de las superficies de oro

Para la preparación de las superficies de oro, se realizó una limpieza con diferentes lijas (desde la más gruesa hasta la más fina), se pulió con gamma-alúmina 3 (0,05 μm). Por último, se lavó con agua ultrapura (18 MΩ) y se dejó secar al aire.¹³

Caracterización y determinación del área efectiva del electrodo

La caracterización y determinación del área efectiva del electrodo de oro, se llevó a cabo mediante la realización de voltametrías cíclicas en medio ácido, según protocolo establecido en la literatura.^{7, 9, 12, 13}

Formación de monocapas autoensambladas de tiourea (SAM/TOU)

Las monocapas autoensambladas de tiourea (SAM/TOU) sobre la superficie de oro fueron formadas según protocolo reportado en la literatura.^{7, 9, 12, 13}

Inmovilización del biorreceptor inmunológico en la superficie del transductor

La inmovilización del biorreceptor inmunológico (anticuerpo específico contra E. coli O157:H7) se realizó mediante la formación de monocapas autoensambladas sobre la superficie de oro. Para formar las monocapas orientadas y ordenadas sobre la superficie del metal, se planteó el uso de compuestos anfifílicos con átomos de azufre en uno de sus extremos y grupos amino en el otro, tal es el caso de moléculas de tiourea.

Al unir los átomos de azufre a la superficie de oro, el extremo con los grupos aminos de la molécula anfifílica queda libre para fijar el fragmento constante (Fc) de los anticuerpos conformados por grupos carboxílicos de la proteína. De esta forma, se planteó inmovilizar el elemento de reconocimiento mediante la preparación de monocapas autoensambladas de tioles sobre superficie de oro.

Esta metodología permite exponer al medio, ligandos con afinidad específica (anticuerpos) por un analito particular (antígeno), proporcionando una estructura molecular ordenada bidimensional que se obtiene tras la quimisorción oxidativa de tioles sobre superficies de oro, la cual permitirá la inmovilización de los anticuerpos que interaccionarán con la Escherichia coli O157:H7 (antígeno).^{9,14}

Para la inmovilización del anticuerpo positivo (Ac⁺) contra E. coli O157:H7, se incubaron los electrodos de oro modificados con tiourea (Au/TOA) en 500μl de solución buffer NaH₂PO₄/KCl 0,1 M a pH 6,20 conteniendo 50μl de Ac⁺ a diferentes tiempos (30 minutos, 1 hora y 2 horas) a temperatura ambiente. Una vez seleccionado el tiempo de incubación, se procedió a realizar las

diferentes medidas voltamétricas.

Ensayos electroquímicos

Para realizar las voltametrías cíclicas correspondientes los electrodos de oro modificados con tiourea con el Ac^+ inmovilizado ($\text{Au}/\text{SAM}/\text{TOU}/\text{Ac}^+$), se colocaron en la celda electroquímica previamente desoxigenada mediante burbujeo con corriente de N_2 a temperatura ambiente, conteniendo 5mL de solución de KCl 0,01M. 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 tiempo de incubación en tiourea y estabilidad de la unión Au/TOU (experimentos no presentados). Además, se optimizó el pH, la velocidad de barrido, el tiempo de incubación del electrodo Au/TOU en Ac^+ y las respuestas voltamétricas obtenidas una vez agregados a la solución electrolítica diferentes volúmenes de *E. coli* prueba látex y *E. coli* control látex (50, 100 y 150 μl en cada caso).^{9,12}

Resultados

1. Optimización del pH.

En la figura 1 se observan las voltametrías cíclicas (VC) para los electrodos de oro modificados con tiourea 5mM en solución de KCl 0,01 M en una ventana de potencial entre 0 y +800mV vs Ag/AgCl , con velocidad de barrido de 100mV/s, a dos valores de pH, 4,92 (voltametrías A) y 6,20 (voltametrías B).

En ambos casos, los electrodos fueron incubados en 500 μl de buffer fosfato con 50 μl de Ac^+ durante 1 hora. Se puede decir que a pH 6,20, la intensidad de corriente en la señal de oxidación (I_{pa}), aumenta notablemente con respecto a la solución con pH 4,92 de 15,5 a 34,1 μA respectivamente; además a pH 6,20 se observa una señal de reducción del anticuerpo positivo ($E_{pc}=130\text{mV}$) (voltametría B) donde se evidencia una I_{pc} de 15 μA , la cual no se observa a pH 4,92 (voltametría A).

Un proceso de inmovilización adecuado debe cumplir con ciertos requisitos de

importancia: la retención de la actividad biológica de las biomoléculas después de la inmovilización sobre la superficie del sensor, poseer un enlace reproducible, duradero y estable con el sustrato, frente a las variaciones de pH, temperatura, fuerza iónica y a la naturaleza química del microambiente, además debe proporcionar una localización de las biomoléculas de manera uniforme, densa y orientada.¹⁵

De acuerdo a lo observado a pH ácido, se puede suponer las siguientes interacciones en el mecanismo de inmovilización del anticuerpo: inicialmente se realizó la formación de la monocapa autoensamblada de tiourea sobre la superficie limpia del electrodo de oro, mediante un proceso de quimisorción oxidativa en el que tiene lugar la adición del enlace S-H a la superficie del oro, lo que origina la eliminación reductiva de Hidrógeno.^{7,13}

En la figura 1 se observa que a pH 6,20 se obtiene mejor definición de la señal y una mayor percepción de los potenciales y corrientes de pico, tanto anódico como catódico, evidenciando de esta forma la inmovilización del Ac^+ en la superficie del electrodo Au/TOU . De acuerdo a estos requerimientos se ha seleccionado trabajar a pH 6,20 debido a que representa la mejor opción de estabilidad para la inmovilización del anticuerpo.

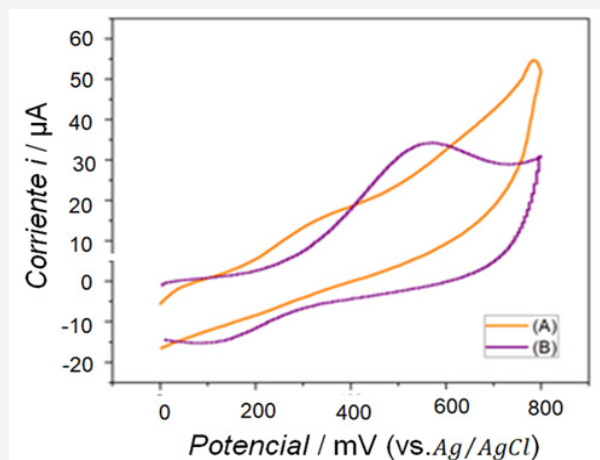


Figura 1. Voltametrías cíclicas en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro a 100 mV/s modificado con TOU/Ac^+ . Ventana de potencial desde 0 hasta +800 mV vs Ag/AgCl , donde: (A) pH 4,92, (B) pH 6,20. Previo burbujeo de N_2 .

2. Optimización de la Velocidad de Barrido.

Con el fin de seleccionar la velocidad de barrido apropiada para que ocurra la respuesta electroquímica de la unión entre la monocapa de tiourea y Ac^+ contra *E. coli* O157:H7, se realizaron VC en KCl 0,01 M a los electrodos de hilo de oro modificados, siendo estos incubados en 0,5ml de buffer a pH 6,20 con 50 μ l de Ac^+ durante 1 hora.

Estas voltametrías fueron realizadas a velocidades de: (A) 500 mV/s., (B) 100 mV/s., (C) 50 mV/s. y (D) 10 mV/s (figura 2).

Las respuestas voltamétricas muestran que, a medida que aumenta la velocidad de barrido, se obtienen corrientes de pico, tanto anódica como catódica, con mayor intensidad y mejor definición. La velocidad de barrido seleccionada es de 100 mV/s., dado que se debe establecer un compromiso entre la definición de la señal y la intensidad de corriente.

Procesos a velocidades de barrido muy altas, indican que las reacciones ocurren muy rápidamente, y que quizás ocurren reacciones cuyas señales no pueden ser observadas, debido a que estas ocurren muy lentamente. En ese sentido, se optó por seleccionar velocidades de barrido intermedias.

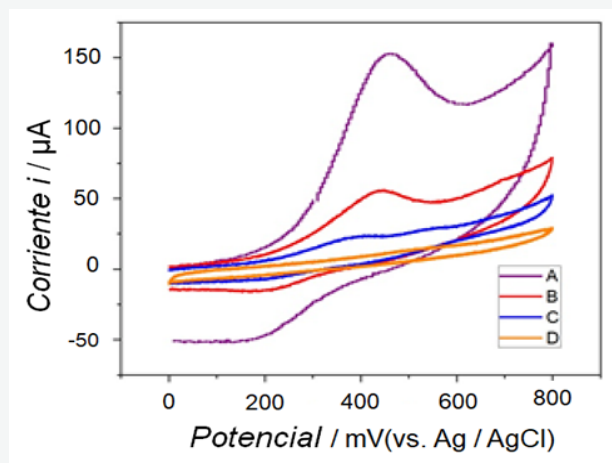


Figura 2. Voltametrías cíclicas en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro modificado con tiourea y previamente incubado en Ac^+ durante 1 hora, donde: (A) 500 mV/s., (B) 100 mV/s., (C) 50 mV/s. y (D) 10 mV/s. Ventana de potencial desde 0 hasta +800 vs Ag/AgCl. Previo burbujeo de N_2 .

3. Optimización del Tiempo de Incubación de los electrodos de oro modificados con tiourea en el anticuerpo positivo (Ac^+) contra *E. coli* O157:H7.

Posterior a la formación de la monocapa de tiourea se procedió a seleccionar el tiempo de incubación de los electrodos de oro modificados en el Ac^+ contra *E. coli* O157:H7.

Las VC se realizaron en solución de KCl 0,01 M, a ventana de potencial desde 0 a +800 mV vs Ag/AgCl, con previo burbujeo de N_2 . En la figura 3 se observan las voltametrías: (A) en electrodo de oro/tiourea (Au/TOU), (B) en electrodo de oro/tiourea incubado en 0,5ml de buffer a pH 6,20 con 50 μ l de anticuerpo positivo durante 30 minutos (Au/TOU/ Ac^+ , 30 minutos), (C) en electrodo de oro/tiourea incubado en 0,5ml de buffer a pH 6,20 con 50 μ l de anticuerpo positivo durante 1 hora (Au/TOU/ Ac^+ , 1 hora) y (D) en electrodo de oro/tiourea incubado en 0,5ml de buffer a pH 6,20 con 50 μ l de anticuerpo positivo durante 2 horas (Au/TOU/ Ac^+ , 2 horas).

Los resultados obtenidos indican que ocurre un aumento significativo de la corriente de pico anódica (I_{pa}) cuando se incubó el electrodo modificado con tiourea en el Ac^+ durante 30 minutos (voltametría B), al compararlo con el control (voltametría A).

Al hacer la incubación en el Ac^+ durante 1 hora, I_{pa} disminuye drásticamente al igual que lo hace la corriente de pico catódica (voltametría C). Al aumentar el tiempo de incubación a 2 horas, ambas corrientes de pico disminuyen (voltametría D). En resumen, al incubarse el electrodo modificado en el Ac^+ , ocurre un aumento en la I_{pa} que indica la detección y posible inmovilización del Ac^+ .

Al incubarse durante 2 horas, parece que se alcanza la saturación del medio y comienza a desprenderse parte del Ac^+ inmovilizado ya que, al incubarse durante 1 hora, la I_{pa} tiene menor valor y se aproxima a la voltametría control (voltametría A). En este sentido se seleccionó 30 minutos como tiempo de incubación apropiado para la detección y posible inmovilización del Ac^+ , por ser el tiempo mínimo necesario para obtener una

buena definición de las señales (anódica y catódica) y corrientes de picos con una intensidad significativa.

Resultados similares fueron obtenidos por Zuzuaregui, quien inmovilizó poliximina B y observó un aumento de la corriente respecto a la curva base de oro, lo que atribuyó a las cargas presentes en la molécula peptídica.¹⁶

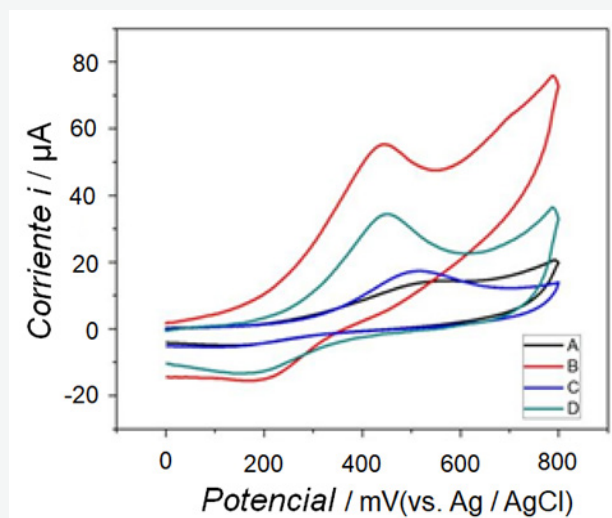


Figura 3. Voltametrías cíclicas en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro/tiourea con Ac^+ inmovilizado, donde: (A) Au/TOU, (B) Au/TOU/ Ac^+ 30 minutos, (C) Au/TOU/ Ac^+ 1 hora y (D) Au/TOU/ Ac^+ 2 horas. Ventana de potencial desde 0 hasta +800 mV vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Previo burbujeo de N_2 .

4. Inmovilización del Ac^+ contra E. coli O157:H7 y posterior adición de E. coli prueba látex en solución de KCl 0,01 M.

Para explicar la inmovilización del Ac^+ en los electrodos de oro modificados con tiourea e incubados en 0,5 ml de buffer a pH 6,20 con 50µl de Ac^+ para luego agregar volúmenes de E. coli prueba látex proveniente del kit (E. COLI LATEX TEST KIT) a la solución de KCl 0,01M presente en la celda y su posterior unión al antígeno E. coli, se realizaron VC en KCl 0,01M a una ventana de potencial de 0 a +800 mV vs Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100mV/s.

En la figura 4 se aprecian las voltametrías obtenidas, donde: (A) 50µl de E. coli, (B) 100µl de E. coli y (C) 150µl de E. coli, que muestran que a medida que aumenta

la concentración de E. coli prueba látex, disminuyen ambas corrientes de pico, y ambos potenciales de pico se desplazan a valores menos positivos.

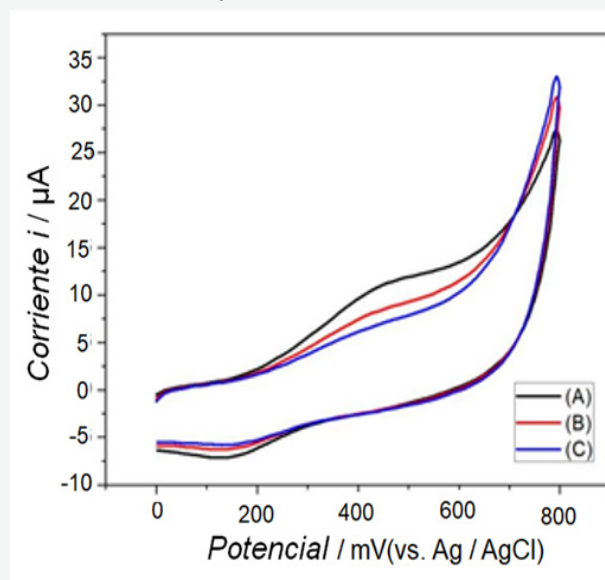


Figura 4. Voltametrías cíclicas en KCl 0,01M de un electrodo de hilo de oro modificado con TOU/ Ac^+ a 100 mV/s y ventana de potencial desde 0 hasta +800 mV vs Ag/AgCl a diferentes concentraciones de E. coli prueba látex, donde: (A) 50µl, (B) 100µl, (C) 150µl de E. coli prueba látex. Previo burbujeo de N_2 .

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en la figura 4.

Es importante mencionar que la disminución progresiva de ambas corrientes de pico, indica que a medida que se agregan alícuotas de E. coli, esta va inhibiendo la transferencia de electrones entre el anticuerpo y la superficie del electrodo.

El hecho de que ocurra la inmovilización del Ac^+ , favorece la posterior unión antígeno-anticuerpo en la superficie del electrodo modificado, lo que plantea que esta prueba pueda ser utilizada para el reconocimiento de la E. coli prueba látex.

5. Voltametría cíclica para la inmovilización del Ac^+ contra E. coli O157:H7 y posterior adición de E. coli control látex.

La E. coli control látex es un reactivo presente en el kit (E. COLI LATEX TEST KIT) el cual

Tabla 1. Valores de E_{pa} , I_{pa} , E_{pc} e I_{pc} para cada voltametría de *E. coli* prueba látex.

Voltametría	E_{pa} (mV)	I_{pa} (μ A)	E_{pc} (mV)	I_{pc} (μ A)
A	+448	11,0	+150	7,0
B	+420	7,9	+132	6,2
C	+397	6,0	+127	5,7

tiene como función verificar que el reactivo específico “*E. coli* prueba látex” permanezca funcionando de manera correcta. El látex de control en el kit se incluye para comprobar la auto-aglutinación.¹⁶

Se realizaron VC en electrodos de oro modificados con tiourea e incubados en 0,5ml de buffer a pH 6,20 con 50 μ l de Ac^+ para luego agregar alícuotas de *E. coli* control látex en KCl 0,01M a una ventana de potencial desde 0 hasta +800mV vs Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100mV/s.

En la figura 5 se aprecian las voltametrías obtenidas, donde: (A) Au/TOU/ Ac^+ (sin control látex), (B) 50 μ l, (C) 100 μ l y (D) 150 μ l de *E. coli* control látex, que muestran que a medida que aumenta la concentración de *E. coli* control látex en la solución, disminuyen ambas corrientes de pico, y ambos potenciales de pico se desplazan a valores menos positivos.

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos en la figura 5.

Los resultados obtenidos muestran el mismo comportamiento de los experimentos con

E. coli prueba látex, es decir, ocurre la inmovilización del Ac^+ y posterior formación del inmunocomplejo en la superficie del electrodo.

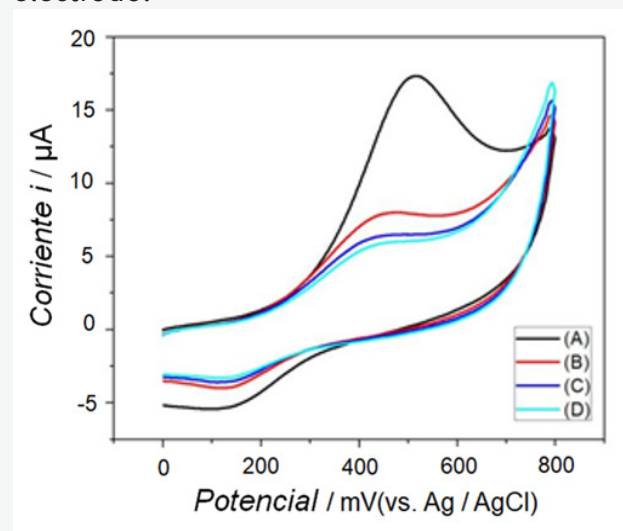


Figura 5. Voltametrías cíclicas en KCl 0,01M de un electrodo de hilo de oro modificado con TOU/ Ac^+ a 100 mV/s y ventana de potencial desde 0 hasta +800 mV vs Ag/AgCl a diferentes concentraciones de *E. coli* control látex, donde: (A) Au/TOU/ Ac^+ (sin control látex), (B) 50 μ l, (C) 100 μ l y (D) 150 μ l de *E. coli* control látex. Previo burbujeo de N_2 .

Tabla 2. Valores de E_{pa} , I_{pa} , E_{pc} e I_{pc} para cada voltametría de *E. coli* control látex.

Voltametría	E_{pa} (mV)	I_{pa} (μ A)	E_{pc} (mV)	I_{pc} (μ A)
A	+505	17,3	+162	5,3
B	+430	7,5	+140	4,2
C	+420	6,3	+135	3,9
D	+415	6,0	+128	3,7

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede concluir:

- ⊕ Los estudios de tiempo de incubación del Ac⁺, velocidad de barrido y pH, mostraron que para alcanzar una mayor estabilidad de la unión antígeno-anticuerpo, se debe utilizar un tiempo mínimo de incubación de entre 30 minutos y 1 hora, una velocidad de barrido de 100mV/s y un pH de 6,20.
- ⊕ La metodología utilizada en esta investigación puede ser recomendada para la elaboración de un biosensor específico para *Escherichia coli* O157:H7 con buena afinidad y alta sensibilidad. Además, por ser selectivo y específico, serviría para reconocer este patógeno en muestras complejas con múltiples microorganismos,
- ⊕ Este biosensor (Au/TOU/Ac⁺) presenta una ventaja significativa frente a las técnicas microbiológicas clásicas, debido a que el tiempo requerido para el análisis de muestras oscila entre 30 minutos y 1 hora, a diferencia de las técnicas microbiológicas tradicionales, cuyo tiempo de análisis es de aproximadamente 48 horas.
- ⊕ Las monocapas de tiourea autoensambladas por quimisorción sobre oro, constituyen una herramienta versátil para la modificación de superficies y representan un medio ideal para la inmovilización de biomoléculas, principalmente por la alta estabilidad en el tiempo para la unión Au-TOA.

Por otra parte, y como una sugerencia, sería importante realizar estudios de estabilidad del biosensor que permitan establecer su vida útil, si bien es cierto, la estabilidad de la unión oro-tiourea fue estudiada en trabajos anteriores,^{7, 8, 9, 12, 13} no menos importante es la unión del Ac⁺ a la monocapa de tioles y del Ac⁺ a la *E. coli*.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes por el suministro de las muestras microbiológicas (cepas de *E. coli* O157:H7) y *E. COLI* LATEX TEST KIT, utilizadas en esta investigación, y al Laboratorio de Electroquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, por facilitar sus instalaciones y equipos para la realización de los ensayos electroquímicos.

Referencias

- 1.- Carrillo, I., Colina, G. (2017). Diseño y preparación de un biosensor para la detección inmunológica de *Escherichia coli* O157:H7 en medio acuoso de KCl. (Tesis de pregrado). Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida-Venezuela.
- 2.- 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. En: Matheus, P., Hernández, N., Navarro, P., Pacheco, E. Estudio Voltamétrico de la inmovilización de anticuerpos anti-*Escherichia coli* ATCC 25922 en electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*, 2017; 48 (1-2): 51- 66.
- 3.- Xu, M., Wang, R., Li, Y. Electrochemical biosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Talanta.* 2017; 162:511-522. En: Matheus, P., Hernández, N., Navarro, P., Pacheco, E. Estudio Voltamétrico de la inmovilización de anticuerpos anti-*Escherichia coli* ATCC 25922 en electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*, 2017; 48 (1-2): 51- 66.

- 4.- 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. En: Matheus, P., Hernández, N., Navarro, P., Pacheco, E. Estudio Voltamétrico de la inmovilización de anticuerpos anti-*Escherichia coli* ATCC 25922 en electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*, 2017; 48 (1-2): 51- 66.
- 5.- 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. En: Matheus, P., Hernández, N., Navarro, P., Pacheco, E. Estudio Voltamétrico de la inmovilización de anticuerpos anti-*Escherichia coli* ATCC 25922 en electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*, 2017; 48 (1-2): 51- 66.
- 6.- 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. En: Matheus, P., Hernández, N., Navarro, P., Pacheco, E. Estudio Voltamétrico de la inmovilización de anticuerpos anti-*Escherichia coli* ATCC 25922 en electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*, 2017; 48 (1-2): 51- 66.
- 7.- Matheus, P. (2003). Diseño y preparación de electrodos enzimáticos basados en interacciones específicas: Desarrollo de estrategias para su estabilización (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental, Madrid España.
- 8.- Matheus, P., Abad, J., Navarro, P., Belandria, O., Hernández, N., Fernández, V.M. 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. En: Matheus, P., Hernández N., Navarro, P., Pacheco, E. Estudio Voltamétrico de la inmovilización de anticuerpos anti-*Escherichia coli* ATCC 25922 en electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*, 2017; 48 (1-2): 51- 66.
- 9.- 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. En: Matheus P., Hernández N., Navarro, P., Pacheco, E. Estudio Voltamétrico de la inmovilización de anticuerpos anti-*Escherichia coli* ATCC 25922 en electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*, 2017; 48 (1-2): 51- 66.
- 10.- Gutiérrez, M. (octubre-diciembre 2005). Comportamiento de la Diarrea causada por Virus y Bacterias en Regiones cercanas a la Zona Ecuatorial. *Colomb. Med.*, 36(3): 6-14.
- 11.- Koneman, E., Allen, S., Janda, W. (4ta ed.). (1992). *Diagnóstico Microbiológico.* Washington DC, Estados Unidos: Editorial JB Lippincott Company.
- 12.- Matheus, P., Hernández, N., Navarro, P., Pacheco, E. Estudio Voltamétrico de la inmovilización de anticuerpos anti-*Escherichia coli* ATCC 25922 en electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea. *Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*, 2017; 48 (1-2): 51- 66.

- 13.- Sánchez, J. (2007). Optimización de un Método Voltamétrico para la Inmovilización y Detección de Vitamina K₃ (Tesis de pregrado). Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida-Venezuela.
- 14.- Matheus, P., Abad, J., Belandria, O., Fernández, V. (2008). Influencia del Estado de Oxidación del Ión Cobalto en la Estabilidad de Electrodo Modificados con Monocapas SAM-TOA-ANTA-Con+-HRP-NHis*. Avances en Química, 3(2): 69-77.
- 15.- Ocampo, A., March, C., Montoya, Á. (2007). Inmunosensores Piezoeléctricos: Revisión General y su Aplicación en el Análisis de Pesticidas. EIA, (7): 97-110.
- 16.- Zuzuarregui, A. (2013). 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, Madrid-España.