



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Desarrollo de aptasensores para la detección de bacterias enteropatógenas

José Luis Sebastián Ávila

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

José Luis Sebastián Ávila

**DESARROLLO DE APTASENORES PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS  
ENTEROPATÓGENAS**

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Nanociencias

Directora: Dra. Beatriz Prieto Simón

Tutor: Dr. Josep Samitier Martí



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Departamento de Ingenierías

Barcelona  
2017



## RESUMEN GENERAL

El objetivo general de esta tesis doctoral fue el desarrollo de biosensores basados en aptámeros para la detección de bacterias enteropatógenas. Para ello se estudiaron diferentes estrategias de detección gracias a las propiedades únicas de los aptámeros, tales como su capacidad de adoptar diferentes estructuras conformacionales tras el enlace con la molécula diana, su estabilidad y la facilidad con que se pueden modificar químicamente, introduciendo marcajes o ciertos grupos funcionales. Las bacterias utilizadas en todas las estrategias de detección fueron: *Salmonella typhimurium* (diana del aptámero seleccionado, específicamente las proteínas transportador ABC, OmpA y precursor OmpD), *Escherichia coli* O157 Shiga, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* k5, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus* y *Kocuria lutea*.

En la primera fase de la tesis se realizó la caracterización de la bacteria *Salmonella typhimurium* y de la afinidad del aptámero por este microorganismo. La afinidad del aptámero por la bacteria se comprobó utilizando las técnicas de impresión por microcontacto ( $\mu$ CP), la microscopía de fuerza atómica (AFM) y la microscopía de fluorescencia. Posteriormente en la fase siguiente se desarrolló un sistema de detección basado en partículas magnéticas como plataforma de captura, preconcentración y detección basada en un ensayo competitivo indirecto. Se llevó a cabo la detección colorimétrica, por absorbancia, y electroquímica, por voltametría de pulso diferencial (DPV). En ambas alternativas de detección se observó reactividad cruzada de la bacteria *Salmonella typhimurium* con *E. coli* O157 Shiga y con *Shigella sonnei*, no presentándose dicha reactividad con las otras bacterias. El porcentaje de similitud de las proteínas diana análogas fue mayor en relación a las proteínas correspondientes a *E. coli* O157 Shiga y *Shigella sonnei*, y menor respecto a las proteínas análogas de las otras bacterias. En la tercera fase de la tesis se desarrollaron dos biosensores electroquímicos. Uno basado en la detección directa del enlace con la bacteria por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). El otro biosensor se basó en la inhibición

enzimática causada por el cambio conformacional del aptámero tras su enlace con la bacteria. En este caso se utilizó la técnica electroquímica DPV para medir la actividad de la enzima fosfatasa alcalina. Con el primero se lograron los mejores resultados, por cuanto los parámetros de comportamientos fueron los mejores (menor LOD, mayor sensibilidad, menor tiempo de análisis), pero además es una estrategia en la cual la construcción del aptasensor es simple puesto que consta de un solo paso. Finalmente los ensayos de selectividad llevados a cabo en todas las estrategias de detección muestran que todos los sistemas de detección fueron capaces de discriminar el grupo de bacterias clasificadas como enteropatógenos (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157 Shiga y *Shigella sonnei*) del resto de bacterias (*Escherichia coli* k5, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus* y *Kocuria lutea*), demostrando que la afinidad del aptámero por *Salmonella typhimurium* no es específica para esta bacteria, sino que también existe una afinidad equivalente por *E. coli* O157 Shiga y *Shigella sonnei*.



## **AGRADECIMIENTOS**

Mis agradecimientos para la Dra. Beatriz Prieto Simón por la dirección de la tesis, por su compromiso y la transferencia de sus conocimientos.

Al profesor Dr. Josep Samitier Marti por permitirme realizar el desarrollo experimental en el laboratorio de nanobioingeniería y por las gestiones realizadas para lograr la finalización de este trabajo.

Al profesor Dr. Antonio Juárez y a la técnico M<sup>a</sup> Carmen Jaramillo, por la colaboración en la entrega de material e información científica.

Para la profesora Dra. M<sup>a</sup> Angels Calvo Torras por su completa disposición y entusiasmo a compartir sus conocimientos científicos.

También mis agradecimientos van hacia los técnicos Miriam Funes y David Izquierdo por el apoyo técnico en el laboratorio.

A los profesores Dr. Valerio Beni y Dr. Anthony Turner por aceptar y supervisar mi estancia doctoral en el Centro de Biosensores y Bioelectrónica del Departamento de Física, Química y Biología de la Universidad de Linkoping, Suecia.

A la Dra. Mabel Torréns Del Valle por colaborar tanto en la entrega de información científica como en la edición final de la tesis.





## TABLA DE CONTENIDO

<b>Resumen por capítulos</b>	1
<b>Figuras y Tablas</b>	4
<b>Lista de abreviaturas</b>	27
<b>Capítulo 1. Introducción General</b>	32
1.1. Infecciones transmitidas por alimentos	32
1.2. Bacterias enteropatógenas	33
1.2.1. Taxonomía	34
1.2.2. Morfología	35
1.2.3. Metabolismo	37
1.2.4. Estrategias de patogenicidad	38
1.2.5. <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> y <i>E.coli</i>	39
1.2.6. Métodos rápidos de detección e identificación	40
Recuento de células viables	41
Miniaturización y galerías de identificación	42
Medidas de señales de crecimiento microbiano	43
Métodos inmunológicos	44
Métodos genéticos	45
1.2.7. Legislación	45
1.3. Biosensores	46
1.3.1. Biosensores electroquímicos	50
1.3.2. Técnicas electroquímicas	51
Conceptos básicos de electroquímica	52

Celda y reacción electroquímica	52
Procesos faradaicos y no faradaicos	53
Interfase electrodo-solución	55
Voltametría/Amperometría	60
Potenciometría	63
Conductimetría	64
Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)	64
1.3.3. Aplicaciones y comercio	65
1.3.4. Elementos de reconocimiento basados en afinidad	67
Introducción	67
Anticuerpos	68
Receptores de membrana	70
Aptámeros	71
Selección de aptámeros	72
Ventajas y desventajas del uso de aptámeros como elemento de reconocimiento	74
Aplicaciones de los aptámeros	78
1.4. Objetivos de la tesis	81
1.4.1. Objetivo general	81
1.4.2. Objetivos específicos	81
1.5. Referencias	83
<b>Capítulo 2. Estado del arte de la detección de bacterias mediante el uso de aptámeros como elemento de reconocimiento</b>	97
2.1. Introducción	97
2.2. Detección de bacterias del género <i>Salmonella</i>	98

2.2.1. Detección por PCR	99
2.2.2. Detección óptica	102
Colorimetría	102
Fluorescencia	107
Quimioluminiscencia	111
2.2.3. Detección piezoeléctrica	113
2.2.4. Detección electroquímica	114
Biosensores electroquímicos	114
2.3. Detección de bacterias del género <i>Escherichia</i>	120
2.3.1. Detección por PCR	120
2.3.2. Detección óptica	122
Colorimetría	122
Fluorescencia	123
2.3.3. Detección electroquímica	124
Sistemas electroquímicos	124
Biosensores electroquímicos	125
2.4. Detección de bacterias del género <i>Shigella</i>	129
2.4.1. Detección óptica	129
Fluorescencia	129
2.5. Detección de bacterias del género <i>Streptococcus</i>	131
2.5.1. Detección óptica	131
Colorimetría	131
2.5.2. Detección piezoeléctrica	132

2.6. Detección de bacterias del género <i>Staphylococcus</i>	133
2.6.1. Detección óptica	133
Colorimetría	133
Dispersión de luz	135
2.6.2. Detección electroquímica	137
Sistemas electroquímicos	137
Biosensores electroquímicos	138
2.7. Detección de bacterias del género <i>Listeria</i>	141
2.7.1. Detección por PCR	142
2.7.2. Detección óptica	143
Fluorescencia	143
2.7.3. Detección electroquímica	144
Sistemas electroquímicos	144
Biosensores electroquímicos	144
2.8. Detección de bacterias del género <i>Bacillus</i>	146
2.8.1. Detección óptica	146
Fluorescencia	146
2.9. Detección de bacterias del género <i>Campylobacter</i>	147
2.9.1 Detección óptica	148
Fluorescencia	148
2.10. Detección de bacterias de múltiples géneros	149
2.10.1. Detección óptica	149
Colorimetría	149
Fluorescencia	151

Luminiscencia	158
Resonancia de plasmones superficiales localizada (LSPR)	159
2.11. Conclusiones	160
2.12. Referencias	165
APÉNDICE II.1	178
<b>Capítulo 3.</b> Estudio y caracterización de la afinidad aptámero-bacteria	184
3.1 Introducción	184
Identificación de las bacterias y las proteínas diana	184
Estrategia para determinar la afinidad del aptámero por <i>S. typhimurium</i>	189
Impresión por microcontacto ( $\mu$ CP)	191
Microscopía de fuerza atómica (AFM)	193
Microscopía de fluorescencia	194
3.2. Materiales	195
3.3. Procedimientos	197
Identificación de bacterias	197
Recuperación de proteínas de membrana de <i>S. typhimurium</i>	198
Identificación de las proteínas de membrana de <i>S. typhimurium</i>	199
Determinación de la carga neta superficial de <i>S. typhimurium</i>	200
Fabricación del sello de PDMS	201
Fabricación del chip de oro	201
Caracterización por AFM de la inmovilización de <i>S. typhimurium</i> sobre el chip de oro	201

Caracterización mediante microscopía de fluorescencia de la afinidad del aptámero por <i>S. typhimurium</i>	202
3.4. Resultados	203
3.4.1. Identificación de bacterias	203
3.4.2. Recuperación e identificación de proteínas de membrana y carga eléctrica neta superficial de <i>S. typhimurium</i>	204
3.4.3. Fabricación del sello de PDMS	205
3.4.4. Caracterización por AFM de la inmovilización de <i>S. typhimurium</i> sobre el chip de oro	206
3.4.5. Caracterización mediante microscopía de fluorescencia de la afinidad del aptámero por <i>S. typhimurium</i>	207
3.5. Discusión y conclusiones	208
3.5.1. Identificación de bacterias	208
3.5.2. Recuperación e identificación de proteínas de membrana de <i>S. typhimurium</i>	208
3.5.3. Carga eléctrica neta superficial de <i>S. typhimurium</i>	209
3.5.4. Caracterización por AFM de la inmovilización de <i>S. typhimurium</i> sobre el chip de oro	209
3.5.5. Caracterización por microscopía de fluorescencia de la afinidad del aptámero por <i>S. typhimurium</i>	211
3.6. Referencias	212
<b>Capítulo 4. Estrategia de detección N°1: Detección de bacterias enteropatógenas mediante ensayo competitivo basado en el uso de partículas magnéticas</b>	216
4.1. Introducción	216
Modificación de partículas magnéticas con <i>S. typhimurium</i> control positivo (STc+) y su utilización en un ensayo competitivo indirecto	216
Ensayo competitivo indirecto	217

Microscopía electrónica de barrido (SEM) para la caracterización de las partículas magnéticas modificadas	219
Optimización de las condiciones de detección	221
Detección colorimétrica y electroquímica	221
4.2. Materiales	224
4.3. Procedimientos	225
Modificación de partículas magnéticas	225
Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido de las MMPs	226
Optimización de las condiciones del ensayo	227
Detección colorimétrica	228
Detección electroquímica	229
4.4. Resultados	229
4.4.1. Modificación y uso de partículas magnéticas en ensayo competitivo indirecto	229
4.4.2. Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de las partículas magnéticas modificadas	232
4.4.3. Optimización de las condiciones del ensayo	232
4.4.4. Detección colorimétrica	237
4.4.5. Detección electroquímica	241
4.5. Discusión y conclusiones	245
4.5.1. Modificación de partículas magnéticas con <i>S. typhimurium</i> control positivo (STc+) y su utilización en un ensayo competitivo indirecto	245
4.5.2. Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de las partículas magnéticas modificadas	246
4.5.3. Optimización de las condiciones del ensayo	247

4.5.4. Detección colorimétrica	249
4.5.5. Detección electroquímica	253
4.6. Referencias	257
APÉNDICE IV.1	262
APÉNDICE IV.2	265
<b>Capítulo 5. Estrategia de detección N° 2: Detección directa de bacterias enteropatógenas.</b>	268
5.1. Introducción	268
Técnicas de detección óptica (SPR) y electroquímica (EIS)	270
5.2. Materiales	279
5.3. Procedimientos	279
Preparación del chip de oro	279
Funcionalización de la superficie del chip	281
Regeneración de la superficie del chip	282
Detección electroquímica por EIS de bacterias	282
5.4. Resultados	283
Caracterización mediante SPR de la afinidad aptámero-bacteria	283
Regeneración de la superficie del chip	288
Aptasensor electroquímico para la detección directa de bacterias por EIS	290
5.5. Discusión y conclusiones	301
Caracterización mediante SPR de la afinidad aptámero-bacteria	301
Aptasensor electroquímico para la detección directa de bacterias por EIS	305
5.6. Referencias	309



APÉNDICE V.1.	312
<b>Capítulo 6.</b> Estrategia de detección N° 3: Detección de bacterias enteropatógenas mediante la inhibición enzimática causada por cambio conformacional del aptámero	315
6.1. Introducción	315
6.2. Materiales	318
6.3. Procedimientos	319
Preparación de los electrodos de oro y detección electroquímica de bacterias por DPV	319
6.4. Resultados	320
6.5. Discusión y conclusiones	323
6.6. Referencias	325
APÉNDICE VI.1	326
<b>Capítulo 7.</b> Conclusiones Generales	329

## RESUMEN POR CAPÍTULOS

El **Capítulo 1** contiene una introducción general, la cual incluye una breve información sobre las enfermedades transmitidas por alimentos contaminados, como también información de las bacterias enteropatógenas, causantes mayoritarias de aquellas enfermedades. Se presentan los métodos rápidos de detección e identificación de bacterias enteropatógenas que actualmente se encuentran disponibles en el mercado. Además se expone sobre los conceptos básicos de biosensores, su clasificación y un apartado para biosensores electroquímicos con las técnicas electroquímicas más utilizadas. También se presenta información relativa al mercado de los biosensores. Se agrega además información general y específica sobre los elementos de reconocimiento por afinidad, poniendo énfasis en los aptámeros. Finalmente se presenta el objetivo general, como también los objetivos específicos de esta tesis doctoral.

En el **Capítulo 2** se muestra el estado del arte de los sistemas de detección de bacterias mediante el uso de aptámeros como elemento de reconocimiento. Se presenta la información científica recopilada, separada por géneros y por métodos de detección, mostrando en primer lugar los trabajos relacionados a los géneros *Salmonella*, *Escherichia* y *Shigella*. Luego se presentan los trabajos encontrados en la literatura relativa a bacterias pertenecientes a otros géneros. Para cada trabajo expuesto se entrega información relativa a la estrategia utilizada para la detección de las bacterias. Se muestran además los parámetros de comportamiento alcanzados en cada estrategia de detección, y la información relativa a los aptámeros utilizados, como tipo de ácido nucleico (ADN o ARN), largo de la secuencia, constante de disociación y las moléculas dianas. También se agrega información relativa al uso de nanomateriales, principalmente como alternativa para incrementar la señal resultante.

En el **Capítulo 3** se caracterizan las bacterias identificándolas en su género, en las proteínas de la membrana involucradas en la unión con los aptámeros y en relación a la carga eléctrica neta de la superficie celular. También se caracteriza la afinidad del aptámero por *S. typhimurium*. Para ello se introducen las técnicas utilizadas para este efecto como la impresión por microcontacto ( $\mu$ CP), la microscopía de fuerza atómica (AFM) y la microscopía de fluorescencia.

En el **Capítulo 4** se desarrolla la primera estrategia para la detección colorimétrica y electroquímica de las bacterias enteropatógenas *S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *Shigella sonnei*. Para ello, partículas magnéticas utilizadas como plataforma de captura, preconcentración y detección fueron conjugadas con *S. typhimurium* control positivo. Se presenta la optimización llevada a cabo para el conjugado entre partículas magnéticas y la bacteria control positivo, como asimismo la caracterización de esta conjugación por medio de microscopía SEM. El conjugado se utilizó en un ensayo competitivo indirecto entre el aptámero enlazado a bacterias de una muestra y el aptámero libre. Se muestra la optimización relacionada a las condiciones de la unión entre aptámero y las bacterias vivas. Además se muestran los comportamientos de los ensayos colorimétrico y electroquímico, por medio de sus respectivas curvas de calibrado. Finalmente se presenta el análisis de selectividad para ambos ensayos.

El **Capítulo 5** contiene el desarrollo de la segunda estrategia de detección. En la primera parte se presenta la caracterización mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) de la monocapa autoensamblada (SAM), formada por aptámeros tiolados sobre una superficie de oro. Asimismo se muestran las cinéticas de enlace de tres bacterias diferentes para el análisis de afinidad del aptámero. En la segunda parte de este capítulo se presenta la detección electroquímica directa del enlace de las bacterias al aptámero inmovilizado, utilizando la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Se incluye en esta sección las características del biosensor utilizando tanto PBS como una

muestra de agua. Por último se muestran los resultados de la selectividad de esta nueva estrategia.

El **Capítulo 6** contiene la tercera estrategia de detección. En esta alternativa se utilizó el aptámero marcado con la enzima fosfatasa alcalina. La inhibición enzimática causada por el cambio conformacional del aptámero al unirse a la bacteria, fue cuantificada con la técnica electroquímica DPV. La inmovilización del aptámero modificado con 10 timinas en el extremo opuesto al de la enzima, a una superficie de oro de un electrodo serigrafiado se realizó a través de su hibridación con un oligonucleótido tiolado con una secuencia de 10 adeninas, autoensamblado sobre la superficie de oro. Posteriormente se presenta la detección de bacterias mediante DPV y se muestran los parámetros asociados al funcionamiento de este biosensor. Como último punto se da a conocer los resultados de la selectividad de esta estrategia.

Finalmente en el último capítulo, **Capítulo 7**, se presentan las conclusiones generales de este trabajo y las específicas de cada capítulo.

## FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.1.** Categorías taxonómicas.

**Figura 1.2.** Familia *Enterobacteriaceae*, subdividida en tres grupos dependiendo de la capacidad de fermentar la lactosa. Diagrama modificado de (Baylis C, 2011)

**Figura 1.3.** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una sola bacteria de *Salmonella*, aumentada 13.250 veces. Las largas estructuras fibrosas corresponden a los flagelos, utilizados para el movimiento de la bacteria. Fotografía tomada del libro “*Salmonella*” (Brands, D.A., 2006).

**Figura 1.4.** Representación de una bacteria gram negativa que muestra las tres principales capas de la envoltura celular: la membrana interna o citoplasmática, el peptidoglucano y la membrana externa en la cual están insertas las moléculas de lipopolisacárido (LPS).

**Figura 1.5.** Clasificación de métodos rápidos de detección e identificación.

**Figura 1.6.** Representación de los dos elementos básicos que componen un biosensor: Elemento de reconocimiento y transductor.

**Figura 1.7.** Principio de funcionamiento de un biosensor. El esquema muestra como en ausencia del analito (A) no se producen alteraciones físicas, químicas o biológicas. En presencia del analito (B) la alteración producida es percibida y transformada por el transductor en una señal eléctrica.

**Figura 1.8.** Clasificación de los biosensores de acuerdo al componente biológico y al transductor.

**Figura 1.9.** Celda electrolítica. Tomada y modificada de referencia (Bard, A.J., 1980)

**Figura 1.10.** La interfase metal-solución actúa como un capacitor con una carga negativa (a) y positiva (b) en el metal. Tomado y modificado de (Bard, A.J., 1980).

**Figura 1.11.** Modelo de doble capa eléctrica en una superficie cargada positivamente. IHP corresponde a la distancia más próxima (al electrodo) de iones adsorbidos específicamente y OHP corresponde a la de los iones adsorbidos no específicamente. The OHP es también el plano donde comienza la capa de difusión.  $\Psi_0$  y  $\Psi$  son los potenciales en la superficie del electrodo y en la interfase electrodo/electrolito, respectivamente. Tomado de (Zhang, L.L., 2009)

**Figura 1.12.** Mecanismo de reacción electroquímica sobre un electrodo.  $O_b$  y  $R_b$ : especies oxidada y reducida, respectivamente, en la solución bulk.  $O_s$  y  $R_s$ : especies oxidada y reducida, respectivamente, en la solución adyacente al electrodo.  $O'$  y  $R'$  especies oxidada y reducida, respectivamente, transformadas químicamente en la solución adyacente al electrodo.  $O'_a$  y  $R'_a$ : especies oxidada y reducida, respectivamente, adsorbidas sobre la superficie del electrodo.

**Figura 1.13.** Potencial aplicado al electrodo de trabajo en un experimento de voltametría cíclica.

**Figura 1.14.** Voltamograma cíclico con el pico de oxidación ( $E_{pa}$ ), corriente de oxidación ( $I_{pa}$ ), pico de reducción ( $E_{pc}$ ) y corriente de reducción ( $I_{pc}$ ).

**Figura 1.15.** Principales mercados de los biosensores. Tomado de referencia Lazcka, O., 2007.

**Figura 1.16.** Principales áreas en las cuales los biosensores son utilizados para la detección de patógenos. Tomado de referencia Lazcka, O., 2007.

**Figura 1.17.** Representación de un anticuerpo en forma de “Y” con su antígeno y el sitio de unión al que se une el antígeno.

**Figura 1.18.** Representación de un receptor proteico inserto en una bicapa fosfolipídica con el sitio de unión expuesto a la molécula ligando.

**Figura 1.19.** Estructura tridimensional del aptámero para trombina. En color oro se muestra las interacciones tipo cuadruplex ( $G_4$ -ADN) y en azul de tipo bucle. Imagen tomada de Ruigrok, V.J.B., 2012.

**Figura 1.20.** Procedimiento SELEX. La figura muestra los principales pasos (incubación, separación, elución y amplificación) para la obtención de aptámeros específicos para una diana particular a partir de una librería de ácidos nucleicos de secuencia aleatoria.

**Figura 1.21.** Comparación en tamaño de un anticuerpo (IgG) y un aptámero (Antitrombina).

**Figura 1.22.** Principales áreas de aplicación de los aptámeros.

## CAPÍTULO 2

**Figura 2.1.** Detección de *S. typhimurium* mediante qPCR, después de capturar la bacteria por medios magnéticos desde una muestra de agua (Jyoti, A., 2011).

**Figura 2.2.** Esquema de la detección basada en aptámeros. (A) Descripción esquemática del enriquecimiento magnético de la bacteria y la amplificación por desplazamiento de la hebra del aptámero. Las bacterias primero se mezclan con un exceso de aptámeros. Después de la incubación, se agregan partículas magnéticas (MP) cubiertas con estreptavidina, y los complejos MP-aptámero-bacteria son recuperadas por un separador magnético. El aptámero del complejo es directamente amplificado por desplazamiento de hebra isotermal. (B) El producto amplificado es cargado sobre la zona para la muestra, para la posterior detección visual (Fang, Z., 2014).

**Figura 2.3.** Ilustración esquemática de la detección de *S. typhimurium* utilizando un aptámero marcado con GNPs que actúan como catalizador de la reducción de iones  $Ag^+$  añadidos en solución (Yuan, J., 2014a).

**Figura 2.4.** Detección de *S. typhimurium* usando tres estrategias tipo sándwich aptámero-anticuerpo enlazado a enzima (Enzyme-Linked Antibody-Aptamer Sandwich, ELAAS): ELAAS colorimétrico, ELAAS quimioluminiscente y nano-ELAAS. (A) Preparación de nanosondas. (B) Preparación de MMP-aptámero. (C) Comparación de los tres métodos de amplificación de señal. GNP: nanopartícula de oro; MMP: micropartículas magnéticas; HRP: enzima peroxidasa; PEG: polietilenglicol; AP: fosfatasa alcalina; STM: *S. typhimurium* (Wu, W., 2014b).

**Figura 2.5.** Representación de la plataforma dual espectrofotométrica-fluorescente para la detección de la proteína flagelina A de *S. paratyphi* (Ning, Y., 2014).

**Figura 2.6.** Ilustración esquemática del bioensayo fluorescente para la determinación de *S. typhimurium*. MNPs: nanopartículas magnéticas. (Duan, N., 2013a).

**Figura 2.7.** Ilustración esquemática del aptasensor para la detección de *Salmonella enteritidis* (Wu, W., 2014a).



**Figura 2.8.** Esquema del proceso de acoplamiento del aptámero marcado con CD a la bacteria. (Wang, R., 2015).

**Figura 2.9.** Método de detección basado en el autoensamblaje no covalente de SWCNT y un aptámero sonda marcado con una ADNzima. (a) Esquema de detección de *S. paratyphi*. (b) Elementos implicados en la detección (Yang, M., 2013).

**Figura 2.10.** Química de la funcionalización superficial del sensor QCM para la captura y detección de *S. typhimurium* (Ozalp, V.C, 2015).

**Figura 2.11.** Diagrama esquemático de un biosensor impedimétrico para la detección de *S. enteritidis* (Labib, M., 2012a).

**Figura 2.12.** Interacción aptámero-bacteria. (a) Posible conformación de los aptámeros que son autoensamblados sobre SWCNT. (b) Representación esquemática de la interacción entre la bacteria diana y el sistema híbrido aptámero-SWCNT (Zelada-Guillen, G.A., 2009).

**Figura 2.13.** Ilustración esquemática de la detección electroquímica de *S. typhimurium*. GCE: electrodo de carbón vítreo; GO: óxido de grafeno (Ma, X., 2014).

**Figura 2.14.** Esquema para la detección de *E. coli* en un ensayo combinado de separación inmunomagnética, unión por sándwich y amplificación del aptámero (Lee, H.J., 2009).

**Figura 2.15.** Principio de detección de *E. coli* O157:H7 usando un aptasensor basado en vesículas de PDA (Wu, W., 2012).

**Figura 2.16.** Esquema de la estrategia de detección basada en una librería de aptámeros de ADN como reportero, combinado con tecnología de separación inmunomagnética (Peng, Z., 2014).

**Figura 2.17.** Ilustración esquemática de la detección cronopotenciométrica por inyección en flujo de *E. coli* O157 usando un electrodo de membrana sensible a protamina (Lei, J., 2015).

**Figura 2.18.** Principio del biosensor electroquímico para la detección de *E. coli* O111 (Luo, C., 2012).

**Figura 2.19.** Concepto esquemático de la mejora de la señal mediante el uso de cócteles de aptámeros para la detección de células bacterianas (Kim, Y.S., 2014).

**Figura 2.20.** Ilustración del ensayo tipo sándwich para detectar *S. sonnei* basado en dos aptámeros (Gong, W., 2015).

**Figura 2.21.** Diagrama esquemático para (a) la modificación de un IDE con aptámero y (b) los aptámeros fueron separados desde los SWCNTs en un medio con GAS (Shi, X., 2014).

**Figura 2.22.** Ilustración de la detección colorimétrica de *S. aureus* basado en la amplificación de la señal mediante tiramina (Yuan, J., 2014b).

**Figura 2.23.** Diagrama que muestra los pasos seguidos para la detección directa y amplificada de *S. aureus* (Chang, Y.C., 2013).

**Figura 2.24.** Representación esquemática de la determinación electroquímica de *S. aureus* basada en el uso de AgNPs conjugadas con aptámero (Abbaspou, B., 2014).

**Figura 2.25.** Secuencia seguida en la estrategia de detección de *S. aureus* (Zelada-Guillen, G.A., 2012).

**Figura 2.26.** Esquema del proceso de funcionalización y detección de *S.aureus*. Arriba: Ilustración esquemática del aptasensor potenciométrico. (a) La funcionalización covalente del GO con el aptámero anti-*S. aureus*. (b) La funcionalización no covalente de RGO con el aptámero (Hernandez, R., 2014).

**Figura 2.27.** Representación esquemática de la modificación de la superficie del electrodo de carbón vítreo y de la detección de *S. aureus* (Jia, F., 2014).

**Figura 2.28.** Diagrama de flujo del ensayo de captura magnética mediado por el aptámero y la detección por qPCR del ADN extraído (Suh, S.H., 2013).

**Figura 2.29.** Ilustración esquemática del aptasensor potenciométrico de células bacterianas utilizando un electrodo de membrana sensible a el polication protamina (Ding, J., 2014).

**Figura 2.30.** Enfoque conceptual usado para crear un aptasensor electroquímico para la detección de *Listeria spp*. El biosensor contiene un material transductor compuesto de un híbrido metal-grafeno, y un aptámero como sonda de captura (Vanegas, D.C., 2015).

**Figura 2.31.** Enfoque conceptual del ensayo para la detección de *C. jejuni* (Bruno, J.G., 2009).

**Figura 2.32.** Principio experimental de la detección de bacteria utilizando aptámeros y GNPs (Wu, W.H., 2012).

**Figura 2.33.** Arriba: Comparación de dos ensayos en tira de prueba de flujo lateral. Se muestra que para la inmovilización del aptámero aminado (aptámero de captura), la irradiación con UV fue necesaria, debido a que no se vió detección de la bacteria en los ensayos en los cuales la luz UV no fue utilizada inicialmente o en los cuales el aptámero de captura no fue marcado con un grupo amino. Abajo: esquema de la tira de prueba de flujo lateral (Bruno, J.G., 2014).

**Figura 2.34.** Dibujo esquemático del complejo aptámero-bacteria-aptámero marcado con fluoróforo inmovilizado sobre una película de plata (Maeng, J.S., 2012).

**Figura 2.35.** Proceso de fabricación de nanopartículas biofuncionalizadas y principio del bioensayo llevado a cabo. TEOS: tetraetilortosilicato; APTES: 3-aminopropiltrimetoxisilano. NaYF<sub>4</sub>,Yb/Er UCNP para *Staphylococcus*. NaYF<sub>4</sub>,Yb/Tm UCNP para *Salmonella* (Duan, N., 2012).

**Figura 2.36.** Esquema conceptual del ensayo de citometría de flujo para la detección de *V. parahaemolyticus* y *S. typhimurium* mediante el uso de aptámeros marcados con UCNPs (Duan, N., 2013d).

**Figura 2.37.** Esquema para la detección de bacterias patógenas. a) Esquema del sistema de microfluídica, b) Principio de detección (Zuo, P., 2013).

**Figura 2.38.** Esquema de la detección por fluorescencia de bacterias patógenas usando un aptasensor universal. (A) Basado en el modelo de “señal on”. (B) Basado en el modelo de “señal off” (Duan, N., 2014).

**Figura 2.39.** Diagrama de la transferencia de energía de resonancia fluorescente dual desde QDs-aptámero a CDs para la detección simultánea de bacterias patógenas. gQDs: puntos cuánticos verdes; rQDs: puntos cuánticos rojos; apt: aptámero; CD: puntos de carbono (Duan, N., 2015)

**Figura 2.40.** Ilustración del bioensayo de luminiscencia múltiple basado en UCNPs modificadas con aptámeros para la detección simultánea de varias bacterias patógenas (Wu, S., 2014).

**Figura 2.41.** Sistema sensor LSPR (resonancia de plasmones superficiales localizado) funcionalizado con aptámeros ensamblados sobre una capa de oro nanoestructurada (Yoo, S.M., 2014).

### **CAPÍTULO 3**

**Figura 3.1.** Diferencia entre bacterias Gram negativas y Gram positivas.

**Figura 3.2.** Patrón formado por impresión por microcontacto de una capa autoensamblada de MHDA sobre una superficie de oro.

**Figura 3.3.** Inmovilización de *S. typhimurium* sobre una superficie de oro modificada con MHDA, mediante la formación de enlaces amida.

**Figura 3.4.** Interacción del aptámero biotinilado con las bacterias inmovilizadas.

**Figura 3.5.** Marcaje de la unión de aptámero biotinilado-bacteria mediante estreptavidina-Texas Red.

**Figura 3.6.** Fabricación del sello y procedimiento básico de un sistema de impresión por  $\mu$ CP. El polidimetilsiloxano (PDMS) es el material utilizado para fabricar el sello utilizado en el proceso de la impresión de una solución (tinta) sobre una superficie determinada (oro).

**Figura 3.7.** Estructura química del PDMS.

**Figura 3.8.** Funcionamiento teórico de la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

**Figura 3.9.** Funcionamiento teórico de la microscopía de fluorescencia para visualizar una muestra que ha sido marcada con un fluoróforo.

**Figura 3.10.** Resultados de la identificación de las bacterias *Salmonella* y *E. coli*. (A) Identificación de *E. coli*. (B) Identificación de *Salmonella*.

**Figura 3.11.** Resultado de SDS-PAGE que muestra las bandas correspondientes a las proteínas ABC transporter, OmpD y OmpA.

**Figura 3.12.** Equipo de  $\mu$ CP y sello de PDMS. A) Equipo de  $\mu$ CP, B) Lente 40x, C) Sello de PDMS de 1 cm x 1 cm. D) Ampliación del sello de PDMS, en cual se observan los micropostes cilíndricos de 10  $\mu$ m de diámetro y 10  $\mu$ m de separación.

**Figura 3.13.** Caracterización por AFM. A) Antes de inmovilizar *S. typhimurium*. B) Después de inmovilizar *S. typhimurium*.

**Figura 3.14.** Caracterización por microscopía de fluorescencia. (A) Sistema completo: MHDA + Bacteria + Aptámero biotinilado + Estreptavidina Texas Red, (B) Control sin aptámero, (C) Control sin bacteria, (D) Control sin aptámero ni bacteria.

## CAPÍTULO 4

**Figura 4.1.** Modificación de partículas magnéticas con *S. typhimurium* control positivo (STc+).

**Figura 4.2.** Ensayo competitivo indirecto. Los tres pasos principales del ensayo: pre-incubación, competición y detección. En el paso de detección la enzima HRP transforma el sustrato TMB oxidado (inoloro) en el producto TMB reducido (azul). Para la detección electroquímica la enzima AP transforma el sustrato  $\alpha$ -naftilfosfato en el producto electroquímicamente activo  $\alpha$ -naftol ( $\alpha$ -NOH).

**Figura 4.3.** Principio de funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido (SEM)

**Figura 4.4.** Técnica electroquímica DPV. (A) Señal de excitación para DPV (B) Señal de salida para DPV (Wang, J., 2006).

**Figura 4.5.** Detección electroquímica por DPV, mediante ensayo competitivo indirecto y partículas magnéticas modificadas con STc+.

**Figura 4.6.** Diagrama que muestra la detección colorimétrica y electroquímica después de haber incubado las partículas magnéticas con estreptavidina-HRP o neutravidina-AP respectivamente.

**Figura 4.7.** Efecto de inmovilizar *S. typhimurium* (ST) en tres estados diferentes (STc+, vivas, estériles) a una concentración de  $10^7$  CFU/mL, una concentración de aptámero biotinilado de 10 nM, solución tampón PBS 10 mM (NaCl 2.7 mM y KCl: 137 mM) pH 7.4, con un tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria de 1 hr.  $Abs_{muestra}$ : Absorbancia de la muestra;  $Abs_{PBS}$  : Absorbancia del control (PBS).

**Figura 4.8.** Efecto de inmovilizar diferentes concentraciones de STc+ sobre las partículas magnéticas en la detección de *S. typhimurium* vivas ( $10^7$  CFU/mL) y una concentración de aptámero de 10 nM, en una solución de PBS 10 mM, pH 7.4. El tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria fue de 1 hr. MPs: partículas magnéticas;  $Abs_{muestra}$ : Absorbancia de la muestra;  $Abs_{PBS}$  : Absorbancia del control (PBS).

**Figura 4.9.** Imágenes de SEM de A) partículas magnéticas no modificadas, 12.000X y B) partículas magnéticas modificadas, 50.000X.

**Figura 4.10.** Efecto de sales del tampón de unión. Tampón A: 0.1 M PB + KCl; Tampón B: 0.1 M PB + KCl + MgCl<sub>2</sub>; Tampón C: 0.01 M PB + NaCl + KCl. Concentración de *S. typhimurium*: 10<sup>7</sup> CFU/mL; concentración de aptámero: 10 nM; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 hr. Abs<sub>muestra</sub> : Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub> : Absorbancia del control (PBS).

**Figura 4.11.** Efecto del pH del tampón de unión. Concentración de *S. typhimurium*: 10<sup>7</sup> CFU/mL; concentración de aptámero: 10 nM; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 hr. Solución tampón PBS 10mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM) Abs<sub>muestra</sub>: Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub> : Absorbancia del control (PBS).

**Figura 4.12.** Efecto del pretratamiento térmico del aptámero. Con pretratamiento: calentamiento previo de la solución de aptámero a 95 °C por 5 min. Sin pretratamiento: la solución de aptámero no se somete a un calentamiento previo. Concentración de *S. typhimurium*: 10<sup>7</sup> CFU/mL; concentración de aptámero: 10 mM; solución tampón: PBS 10 mM (NaCl: 2.7mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 hr. Abs<sub>muestra</sub> : Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub> : Absorbancia del control (PBS).

**Figura 4.13.** Efecto del tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria. Concentración de *S. typhimurium*: 10<sup>7</sup> CFU/mL; concentraciín de aptámero: 10 mM; solución tampón: PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; Abs<sub>muestra</sub> : Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub> : Absorbancia del control (PBS).

**Figura 4.14.** Efecto de la concentración de aptámero biotinilado en el paso de pre-incubación con *S. typhimurium*, 10<sup>7</sup> CFU/mL. Solución tampón PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 hr. Abs<sub>muestra</sub>: Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub>: Absorbancia del control (PBS).



**Figura 4.15.** Detección colorimétrica de *S. typhimurium* a  $10^7$  CFU/mL. Concentración de *S. typhimurium*:  $10^7$  CFU/mL; concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón: PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo pre-incubación aptámero-bacteria: 1 hr. (A) Réplicas de la muestra con  $10^7$  CFU/mL de bacterias y (B) réplicas del control, en ausencia de bacterias.

**Figura 4.16.** Curva de calibración para la detección colorimétrica de *S. typhimurium*. Concentración de aptámero: 4 nM; Solución tampón: PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 hr. Respuesta (%) =  $(1 - (Abs_{muestra} / Abs_{PBS})) * 100$ .  $Abs_{muestra}$  : Absorbancia de la muestra;  $Abs_{PBS}$  : Absorbancia del control (PBS). La curva que se ajusta al comportamiento del sistema de detección colorimétrico corresponde a una sigmoideal logística de ecuación:  $y = (5.24 - 89.08) / (1 + (x / (6 \times 10^5))^{0.89}) + 89.08$

**Figura 4.17.** Selectividad del ensayo colorimétrico. Concentración de bacterias:  $10^7$  CFU/mL; concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón: PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 M), pH 7.4; tiempo de análisis: 1 hr. Ss: *Shigella sonnei*; St: *Salmonella typhimurium*; Ec O: *E. coli* O157 Shiga; Ec k5: *E. coli* k5; Bc: *Bacillus cereus*; Pm: *Proteus mirabilis*; Kl: *Kocuria lutea*.  $Abs_{muestra}$ : Absorbancia de la muestra;  $Abs_{PBS}$ : Absorbancia del control (PBS).

**Figura 4.18.** Detección colorimétrica de *S. typhimurium* en una matriz real (agua de montaña). Concentración de *S. typhimurium*:  $10^7$  CFU/mL; concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón para muestra en PBS: PBS 10 mM, pH 7.4; tiempo pre-incubación aptámero-bacteria: 1 hr.  $Abs_{10^7}$ : Absorbancia de la muestra con  $10^7$  CFU/mL;  $Abs_{control}$  : Absorbancia del control (agua o PBS) con ausencia del analito.

**Figura 4.19.** Detección electroquímica de *S. typhimurium* a  $10^7$  CFU/mL. Concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón (unión aptámero-bacteria): PBS 10 mM (NaCl:2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 hr. Solución tampón (medidas DPV): DEA 0.1, pH 9.5; velocidad de barrido: 0.2 V/s; intervalo de potenciales: -0.4 a 0.4 V (potencial del pulso: 0.04V; tiempo del pulso: 0.2 s); medición corriente de oxidación: 0.25 V.

**Figura 4.20.** Curva de calibración para la detección electroquímica de *S. typhimurium*. Concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón (unión aptámero-bacteria): PBS 10 mM (NaCl:2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 hr. Solución tampón (medidas DPV): DEA 0.1, pH 9.5; velocidad de barrido: 0.2 V/s; intervalo de potenciales: -0.4 a 0.4 V (potencial del pulso: 0.04V; tiempo del pulso: 0.2 s); medición corriente de oxidación: 0.25 V.  $\Delta I_{\text{muestra}}$  : Intensidad de corriente de una muestra;  $\Delta I_{\text{PBS}}$  : Intensidad de corriente para el control (PBS).

**Figura 4.21.** Curva de calibración para la detección electroquímica de *E. coli* O157 Shiga. Concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón (unión aptámero-bacteria): PBS 10 mM (NaCl:2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 hr. Solución tampón (medidas DPV): DEA 0.1, pH 9.5; velocidad de barrido: 0.2 V/s; intervalo de potenciales: -0.4 a 0.4 V (potencial del pulso: 0.04V; tiempo del pulso: 0.2 s); medición corriente de oxidación: 0.25 V.  $\Delta I_{\text{muestra}}$  : Intensidad de corriente de una muestra;  $\Delta I_{\text{PBS}}$  : Intensidad de corriente para la muestra control (PBS).

**Figura 4.22.** Curva de calibración para la detección electroquímica de *Shigella sonnei*. Concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón (unión aptámero-bacteria): PBS 10 mM (NaCl:2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 hr. Solución tampón (medidas DPV): DEA 0.1, pH 9.5; velocidad de barrido: 0.2 V/s; intervalo de potenciales: -0.4 a 0.4 V (potencial del pulso: 0.04V; tiempo del pulso: 0.2 s); medición corriente de oxidación: 0.25 V.

**Figura 4.23.** Selectividad del ensayo electroquímico. Concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón (unión aptámero-bacteria): PBS 10 mM (NaCl:2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 hr. Solución tampón (medidas DPV): DEA 0.1, pH 9.5; velocidad de barrido: 0.2 V/s; intervalo de potenciales: -0.4 a 0.4 V (potencial del pulso: 0.04V; tiempo del pulso: 0.2 s); medición corriente de oxidación: 0.25 V. Ss: *Shigella sonnei*; St: *Salmonella typhimurium*; Ec O: *E. coli* O157 Shiga; Ec k5: *E. coli* k5; Bc: *Bacillus cereus*; Pm: *Proteus mirabilis*; Kl: *Kocuria lutea*.  $\Delta I_{\text{muestra}}$ : Intensidad de corriente de una muestra;  $\Delta I_{\text{PBS}}$ : Intensidad de corriente para el control (PBS).

## CAPÍTULO 5

**Figura 5.1.** Principio básico de SPR.  $\Phi_1$ : ángulo luz incidente;  $\Phi_1'$ : ángulo luz reflejada;  $\Phi_2$ : ángulo luz refractada;  $\Phi_c$ : ángulo crítico;  $n_i$ : índice de refracción.

**Figura 5.2.** Configuración de Kretschmann.

**Figura 5.3.** Interacción biomolecular entre un receptor inmovilizado en la superficie de oro y un analito en solución (A y B). Variación del índice de refracción en función del tiempo (C) y del ángulo de incidencia (D).

**Figura 5.4.** (A) Interfase electrificada. IHP: Plano Interno de Helmholtz, OHP: Plano Externo de Helmholtz. (B) Circuito equivalente o de Randles. Cd: Capacitor de doble capa; Rp: Resistor de polarización; W: Impedancia de Warburg; Rs: Resistencia de la solución electrolito. Dibujos modificados de (Park, S.M., 2003).

**Figura 5.5.** Gráfico de Nyquist. Rs: Resistencia de la solución. Rp: Resistencia de polarización.

**Figura 5.6.** Estrategia de detección directa de bacterias, mediante el uso de la técnica electroquímica EIS.

**Figura 5.7.** Montaje del chip de oro en contacto directo con la celda de flujo y el prisma. A) Soporte de la celda; B) Celda de flujo; C) Chip de oro sobre la celda; D) Prisma sobre el chip; E) Configuración completa para ser insertado en el equipo SPR (F).

**Figura 5.8.** Representación de los elementos inmovilizados (aptámero-SH, 6-mercaptohexanol y bacteria) sobre la superficie de oro del chip, el cual está en contacto directo con el prisma.

**Figura 5.9.** Sensograma del aptámero-SH y 6-mercaptohexanol

**Figura 5.10.** Curvas de reflectividad antes y después de la inmovilización conjunta del aptámero-SH y 6-mercaptohexanol.  $\theta_i$ : ángulo de resonancia inicial, previo a la inmovilización conjunta del aptámero-SH y 6-mercaptohexanol;  $\theta_f$ : ángulo de resonancia final, posterior a la inmovilización.

**Figura 5.11.** Sensograma obtenido con la superficie modificada con aptámero tras ser expuesta 1 h a una solución de *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL

**Figura 5.12.** Sensograma obtenido con la superficie modificada con aptámero tras ser expuesta 1 h a una solución de *E.coli* O157 Shiga  $10^7$  CFU/mL.

**Figura 5.13.** Sensograma obtenido con la superficie modificada con aptámero tras ser expuesta 1 h a una solución de *K. lutea*  $10^7$  CFU/mL.

**Figura 5.14.** Regeneración con NaCl 2 M de la plataforma de detección. El recuadro azul muestra la ampliación de la etapa de enlace de *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL al aptámero inmovilizado. El recuadro rojo muestra la ampliación de la etapa de regeneración haciendo recircular NaCl 2M.

**Figura 5.15.** Regeneración con NaOH de la plataforma de detección. El recuadro rojo muestra la ampliación de la etapa de regeneración, haciendo recircular tres concentraciones diferentes de NaOH: 10, 50 y 100 mM durante 5 min cada una.

**Figura 5.16.** Caracterización mediante CVs del procedimiento para la detección de *S. typhimurium*. En azul se muestra el CV del electrodo sin tratamiento previo. La línea roja muestra el CV luego de haber coinmovilizado sobre el electrodo el aptámero y el mercaptohexanol. La línea verde es el resultado de la incubación con *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL. Las medidas se realizaron en una solución de ferrocianuro de potasio 2.5 mM y ferricianuro de potasio 2.5 mM en PBS a pH 7.4, a una velocidad de barrido de 100 mV/s, entre -0.4 y +0.6 V.

**Figura 5.17.** Caracterización mediante CVs del procedimiento para estudiar el control correspondiente a una muestra sin bacterias. En azul se muestra el CV del electrodo sin tratamiento previo. La línea roja muestra el CV luego de haber coinmovilizado sobre el electrodo el aptámero y el mercaptohexanol. La línea verde es el resultado de la incubación con una solución de PBS sin bacterias. Las medidas se realizaron en una solución de ferrocianuro de potasio 2.5 mM y ferricianuro de potasio 2.5 mM en PBS a pH 7.4, a una velocidad de barrido de 100 mV/s, entre -0.4 y +0.6 V

**Figura 5.18.** Caracterización mediante CVs del procedimiento para estudiar el resultado correspondiente al electrodo sin la presencia del aptámero. En azul se muestra el CV del electrodo sin tratamiento previo. La línea roja muestra el CV luego de haber inmovilizado sobre el electrodo solo el mercaptohexanol. La línea verde es el resultado de la incubación con una solución de *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL. Las medidas se realizaron en una solución de ferrocianuro de potasio 2.5 mM y ferricianuro de potasio 2.5 mM en PBS a pH 7.4, a una velocidad de barrido de 100 mV/s, entre -0.4 y +0.6 V

**Figura 5.19.** Espectros de impedancias (EIS) para la detección de *S. typhimurium*. En azul se muestra el EIS del electrodo sin tratamiento previo. La línea roja muestra el EIS luego de haber inmovilizado sobre el electrodo el aptámero y el mercaptohexanol. La línea verde es el resultado de la incubación con *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL. Las medidas se realizaron en una solución de ferrocianuro de potasio 2.5 mM y ferricianuro de potasio 2.5 mM en PBS a pH 7.4, entre un rango de frecuencias de 100000 Hz a 0.5 Hz, con una amplitud de 5 mV y utilizando el potencial de circuito abierto.

**Figura 5.20.** Espectros de impedancias (EIS) del procedimiento para estudiar el control correspondiente a una muestra sin bacterias. En azul se muestra el EIS del electrodo sin tratamiento previo. La línea roja muestra el EIS luego de haber inmovilizado sobre el electrodo el aptámero y el mercaptohexanol. La línea verde es el resultado de la incubación con una solución de PBS sin bacterias. Las medidas se realizaron en una solución de ferrocianuro de potasio 2.5 mM y ferricianuro de potasio 2.5 mM en PBS a pH 7.4, entre un rango de frecuencias de 100000 Hz a 0.5 Hz, con una amplitud de 5 mV y utilizando el potencial de circuito abierto.

**Figura 5.21.** Espectros de impedancias (EIS) del procedimiento para estudiar el resultado correspondiente al electrodo sin la presencia del aptámero. En azul se muestra el EIS del electrodo sin tratamiento previo. La línea roja muestra el EIS luego de haber inmovilizado sobre el electrodo solo el mercaptohexanol.. La línea verde es el resultado de la incubación con una solución de *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL. Las medidas se realizaron en una solución de ferrocianuro de potasio 2.5 mM y ferricianuro de potasio 2.5 mM en PBS a pH 7.4, entre un rango de frecuencias de 100000 Hz a 0.5 Hz, con una amplitud de 5 mV y utilizando el potencial de circuito abierto.

**Figura 5.22.** Curva de calibración para *S. typhimurium* en PBS y agua. La respuesta corresponde a la  $R_{TC}$  normalizada, en donde  $R_{TCf}$  es la resistencia a la transferencia de carga luego de la incubación con la bacteria y  $R_{TCi}$  es la resistencia a la transferencia de carga después de inmovilizar el electrodo con el aptámero y el mercaptohexanol.

**Figura 5.23.** Selectividad del biosensor mediante detección electroquímica (EIS). Ss: *S. sonnei*; St: *S. typhimurium*; Ec O: *E. coli* O157 Shiga; Ec k5: *E. coli* k5; Bc: *B. cereus*; Pm: *P. mirabilis*; Kl: *K. lutea*.  $R_{P \text{ normalizada}} = (R_{Pf} - R_{Pi})/R_{Pi}$ .

**Figura 5.24.** Sistema de recirculación de la solución de aptámero, inserto en el equipo de SPR. Una bomba peristáltica permite el movimiento de la solución de aptámero a través de una celda de flujo, en la cual se establece el contacto directo de la solución con la superficie de oro.

**Figura 5.25.** Forma geométrica de la superficie de oro disponible (determinada por la celda de flujo) para la inmovilización de las moléculas de aptámero

## CAPÍTULO 6

**Figura 6.1.** . Inmovilización de moléculas de oligo 10A-SH en una superficie de oro. Como elemento de relleno de los espacios libres de oligonucleótidos se utilizó 2-mercaptoetanol

**Figura 6.2.** Hibridación del aptámero con el oligo inmovilizado sobre el electrodo de oro, mediante las bases nitrogenadas complementarias A=T. El aptámero está conjugado con la enzima fosfatasa alcalina.

**Figura 6.3.** Transformación enzimática del  $\alpha$ -naftilfosfato a  $\alpha$ -naftol y posterior oxidación electroquímica (DPV: Voltametría de Pulso Diferencial) del  $\alpha$ -naftol a 1,4 naftoquinona.

**Figura 6.4.** Unión bacteria-aptámero. El aptámero sufre un cambio conformacional adoptando una configuración espacial que inhibe la enzima AP.

**Figura 6.5.** Enzima inhibida, luego de la unión del aptámero a la bacteria. La ausencia de  $\alpha$ -naftol se refleja en la nula señal de intensidad de corriente al aplicar el potencial de oxidación adecuado.

**Figura 6.6.** Detección electroquímica mediante DPV de *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL. (A) Muestra sin analito, antes (negro) y después (rojo) de incubar el aptasensor en PBS. (B) Muestra con analito (*S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL), antes (negro) y después (rojo) de incubar con la bacteria.

**Figura 6.7.** Curva de calibración para *S. typhimurium* usando el aptámero conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (AP). La respuesta corresponde al porcentaje de actividad enzimática remanente. La curva se ajusta a una sigmoide logística de ecuación:  $y = (100.9 - 44.7)/(1 + (x/(769.2))^{0.44}) + 44.7$ , con un  $R^2 = 0.997$ ,  $n = 2$ .

**Figura 6.8.** Selectividad del biosensor mediante detección electroquímica (DPV) con el aptámero marcado con la enzima fosfatasa alcalina. La respuesta corresponde al porcentaje de actividad enzimática remanente. Ss: *Shigella sonnei*; St: *S. typhimurium*; Ec O: *E. coli* O157 Shiga; Ec k5: *E. coli* k5; Bc: *B. cereus*; Pm: *P. mirabilis*; Kl: *K. lutea*.

## TABLAS

## CAPÍTULO 1

**Tabla 1.1.** Elementos de reconocimiento por afinidad con sus características principales. Modificado de (Ruigrok, V. J. B, 2011).



## CAPÍTULO 2

**Tabla 2.1.** Tabla de resumen del estado del arte de la detección de bacterias mediante el uso de aptámeros como elemento de reconocimiento.

## CAPÍTULO 4

**Tabla 4.1.** Alineamiento de secuencias de proteínas..

**Tabla 4.2.** Comparación de parámetros del biosensor electroquímico en la detección de los enteropatógenos *S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *Shigella sonnei*.

**Tabla IV.1.** Medias y desviaciones estándar de las respuestas (%) en ensayo colorimétrico.

**Tabla IV.2.** Valores de  $s_{ij}$  del análisis estadístico t-Student en la prueba de selectividad en ensayo competitivo indirecto con detección colorimétrica.

**Tabla IV.3.** Valores de  $t_{ij}$  del análisis estadístico t-Student en la prueba de selectividad en ensayo competitivo indirecto con detección electroquímica.

**Tabla IV.4.** Medias y desviaciones estándar de las respuestas (%) de la prueba de selectividad por detección electroquímica, mediante ensayo competitivo indirecto y aptámero biotinilado.

**Tabla IV.5.** Valores de  $S_{ij}$  de ensayo electroquímico para la prueba de selectividad, mediante ensayo competitivo indirecto y aptámero biotinilado.

**Tabla IV.6.** Valores de  $t_{ij}$  de ensayo electroquímico para la prueba de selectividad, mediante ensayo competitivo indirecto y aptámero biotinilado.

## CAPÍTULO 5

**Tabla 5.1.** Valores de la intensidad de corriente (mA) y de los potenciales (E, mV) para los picos de oxidación y reducción correspondientes a los CVs de la Figura 5.16.

**Tabla 5.2.** Valores de la intensidad de corriente (mA) y potenciales (E, mV) para los picos de oxidación y reducción correspondientes a los CVs de la Figura 5.17.

**Tabla 5.3.** Valores de la intensidad de corriente (mA) y de los potenciales (E, mV) para los picos de oxidación y reducción correspondientes a los CVs de la Figura 5.18.

**Tabla 5.4.** Valores de  $R_P$  normalizada ( $(R_{Pf} - R_{Pi})/R_{Pi}$ ). Los valores mostrados ( $\mu \pm \sigma$ ) están determinados para un tamaño de muestra  $n = 2$ . En la columna A se observan los resultados de  $R_P$  normalizada al exponer el biosensor (electrodo funcionalizado con el aptámero) a una muestra con *S. typhimurium* de concentración  $10^7$  CFU/ mL. La columna B presenta los valores de  $R_P$  normalizada al exponer el biosensor a una muestra sin bacterias (PBS). En la columna C están los valores de  $R_P$  normalizada al exponer el electrodo, funcionalizado solo con mercaptohexanol, a una muestra con *S. typhimurium* de concentración de  $10^7$  CFU/mL.

**Tabla V.1.** . Medias y desviaciones estándar de las respuestas (%) de la prueba de selectividad para el aptasensor basado en detección directa mediante EIS.

**Tabla V.2.** Valores de  $s_{ij}$  del análisis estadístico t-Student en la prueba de selectividad para el aptasensor basado en detección directa mediante EIS.

**Tabla V.3.** Valores de  $t_{ij}$  del análisis estadístico t-Student en la prueba de selectividad para el aptasensor basado en detección directa mediante EIS.

**Tabla V.4.** Valores de  $R_P$  normalizada ( $n = 2$ ) con el promedio (Prom) y la desviación estándar (Desv) para las curvas de calibrado en PBS y Agua de la Figura 5.22

## **CAPÍTULO 6**

**Tabla VI.1.** Medias y desviaciones estándar de las respuestas (%) en la detección electroquímica por DPV y el aptámero marcado con fosfatasa alcalina.

**Tabla VI.2.** Valores de  $s_{ij}$  del análisis estadístico t-Student en la prueba de selectividad en detección electroquímica por DPV y aptámero marcado con fosfatasa alcalina.

**Tabla VI.3.** Valores de  $t_{ij}$  del análisis estadístico t-Student en la prueba de selectividad en detección electroquímica por DPV y aptámero marcado con fosfatasa alcalina.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**μCP**: impresión por microcontacto.

**A**: área superficial del electrodo, [cm<sup>2</sup>]

**Ab**: anticuerpo

**ABC**: transportadores de membrana dependientes de ATP

**Abs<sub>muestra</sub>**: absorbancia de la muestra

**Abs<sub>PBS</sub>**: absorbancia de PBS (control)

**ABTS**: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico

**AC**: corriente alterna

**ADN**: ácido desoxirribonucleico

**AFM**: microscopía de fuerza atómica

**AgNP**: nanopartículas de plata

**AP**: fosfatasa alcalina

**APS**: persulfato amónico

**ARN**: ácido ribonucleico

**ATP**: trifosfato de adenosina

**C**: capacitancia, [F]

**CD**: puntos de carbono

**Cd**: capacitor de doble capa

**CE**: electrodo auxiliar

**CFU**: unidades formadoras de colonias

**C<sub>j</sub>**: concentración de la especie j, [mol/cm<sup>3</sup>]

**CNTs**: nanotubos de carbono

**CV**: voltametría cíclica

**D**: coeficiente de difusión, [cm]

**DEA**: dietanolamina

**DPV**: voltametría de pulso diferencial

**E**: potencial, [V]

**EAEC**: *E. coli* enteroagregativa

**E<sub>cell</sub>**: potencial en la celda, [V]

**EDC**: clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

**EHEC**: *E. coli* enterohemorrágica

**EIS**: espectroscopía de impedancia electroquímica

**ELAAS**: ensayo sandwich aptámero-anticuerpo enlazado a enzima

**ELISA**: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**EMB**: eosina azul de metileno

**EMF**: fuerza electromotriz, [V]

**$E_{pa}$** : potencial de pico anódico  
 **$E_{pc}$** : potencial de pico catódico  
**EPEC**: *E. coli* enteropatógena  
 **$F$** : constante de Faraday, [C/mol]  
 **$f$** : frecuencia, s<sup>-1</sup>  
**FAM**: carboxifluoresceína  
**FET**: transistor de efecto campo  
**FIA**: análisis por inyección de flujo  
**FITC**: isotiocianato de fluoresceína  
 **$\Gamma$** : superficie cubierta, ng/mm<sup>2</sup>  
**GAS**: Streptococcus del grupo A  
**GCE**: electrodo de carbón vítreo  
**GNP**: nanopartículas de oro  
**GO**: óxido de grafeno  
**HEPES**: ácido [N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etano-sulfónico  
**HRP**: peroxidasa de rábano picante  
 **$i$** : corriente eléctrica, [A]  
**IDE**: electrodo interdigitado  
**IgG**: inmunoglobulina G  
**IHP**: plano interior de Helmholtz  
 **$i_{pa}$** : corriente en el pico anódico  
 **$i_{pc}$** : corriente en el pico catódico  
 **$J$** : flujo másico, [mol cm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>]  
 **$k_1, k_2$** : constantes de velocidad de transferencia de electrones  
 **$K_D$** : constante de disociación  
**LOD**: Límite de detección  
**LPS**: Lipopolisacáridos  
**LSPR**: resonancia de plasmones superficiales localizada  
**MCH**: 6-mercaptohexanol  
**MES**: ácido 2-N-morfolino etano sulfónico  
**MHDA**: ácido 16-mercaptohexadecanoico  
**MMP**: partículas magnéticas modificadas  
**MNPs**: nanopartículas magnéticas  
**MPs**: partículas magnéticas  
 **$v(x)$** : velocidad de un elemento de volumen  
 **$N$** : cantidad de producto, [mol]  
 **$n$** : número de electrones transferido por mol de producto  
 **$v$** : velocidad de barrido, V/s  
**NHS**: N-hidroxisuccinimida

**NMP:** número más probable  
**O'**: especies oxidadas transformadas químicamente en la solución adyacente al electrodo  
**O'<sub>a</sub>**: especies oxidadas adsorbidas sobre la superficie del electrodo  
**O<sub>b</sub>**: especies oxidadas en el seno de la solución  
**OHP:** plano exterior de Helmholtz  
**Omp:** proteínas de membrana externa  
**OPC:** potencial de circuito abierto  
**O<sub>s</sub>**: especies oxidadas en la solución adyacente al electrodo  
**PBS:** tampón fosfato salino  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**PDA:** polidiacetileno  
**PDMS:** polidimetilsiloxano  
**PEG:** polietilenglicol  
**PI:** punto isoeléctrico  
**Q:** carga eléctrica, [C]  
**Q:** cociente entre la concentración de ion en el ánodo y en el cátodo  
**QCM:** microbalanza de cristal de cuarzo  
**QD:** puntos cuánticos  
 $\theta_f$ : ángulo de resonancia final  
 $\theta_i$ : ángulo de resonancia inicial  
**qPCR:** PCR cuantitativa  
**R:** constante universal de los gases, [J/mol K]  
**R:** resistencia eléctrica, W  
**R'**: especies reducidas transformadas químicamente en la solución adyacente al electrodo  
**R'<sub>a</sub>**: especies reducidas adsorbidas sobre la superficie del electrodo  
**R<sub>b</sub>**: especies reducidas en el seno de la solución  
**RE:** electrodo de referencia  
**RGO:** óxido de grafeno reducido  
**R<sub>p</sub>**: resistencia a la transferencia de carga,  $\Omega$   
**R<sub>s</sub>**: especies reducidas en la solución adyacente al electrodo  
**R<sub>s</sub>**: resistencia de la solución,  $\Omega$   
**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa con la transcriptasa inversa  
**RV:** rappaport-vassiliadis  
**SAM:** monocapa autoensamblada  
**SDS:** dodecil sulfato de sodio  
**SELEX:** evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial  
**SEM:** microscopía electrónica de barrido  
**SPE:** electrodo serigrafado (Screen Printed Electrode)

**SPM:** microscopio de sonda de barrido  
**spp:** subespecies  
**SPR:** resonancia de plasmones superficiales  
**ssADN:** hebra simple de ADN  
**STc+:** *S. typhimurium* control positivo  
**STSS:** síndrome de shock tóxico estreptocócico  
**SWCNT:** nanotubos de carbono de pared simple  
**T:** temperatura absoluta, [K]  
**TEM:** microscopía electrónica de transmisión  
**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina  
**TEOS:** tetraetilortosilicato  
**TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbencidina  
**TSA:** tryptic Soy Agar (agar de soya trípico)  
**TSB:** tryptic soy broth (caldo de soya trípico)  
**UCNP:** nanopartículas de conversión ascendente  
**UV:** ultravioleta  
 **$v(x)$ :** velocidad en función de la distancia, [cm/s]  
**V:** voltaje, V  
**w:** frecuencia radial, rad/s  
**W:** impedancia de Warburg,  $\Omega$   
**WE:** electrodo de trabajo  
**XLT4:** Xylosa lactosa tergitol 4  
 **$y_b$ :** Valor medio de la señal correspondiente al blanco  
**Z:** impedancia eléctrica, W  
 **$z_j$ :** carga eléctrica de la especie j  
 **$\alpha$ -NP:**  $\alpha$ -naftilfosfato  
 **$\alpha$ -NOH:**  $\alpha$ -naftol

## ***CAPÍTULO 1. Introducción General***



## Capítulo 1. Introducción General

### 1.1. Infecciones transmitidas por alimentos

Un problema considerable de salud pública son las infecciones transmitidas a través de los alimentos o del agua de bebida, contaminados con microorganismos como bacterias, virus o parásitos. Estas infecciones, denominadas infecciones entéricas debido a que afectan específicamente al intestino, son la causa de muerte de unos 2 millones de niños al año con la diarrea como principal síntoma (Sarrionandia, M.A.E., 2011). Esta es la tercera causa de muerte en el mundo por enfermedades infecciosas (<http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/>). También en algunos casos estos microorganismos pueden deteriorar alimentos y por tanto generar substanciales pérdidas económicas y desperdicios de alimentos (Baylis, C., 2011). Se ha estimado que la producción global de alimentos para el año 2050 debería incrementarse en un 50% para satisfacer la futura demanda debido al aumento proyectado de la población mundial (Chakraborty, S., 2011), lo que se supone será un desafío para la seguridad y el control de los alimentos y por tanto para el control de los brotes de infecciones transmitidas por alimentos contaminados. Esto se debe a que dos de los factores claves que hoy en día contribuyen (y que evidentemente contribuirán en el futuro) a la ocurrencia de las infecciones entéricas son: (1) la producción a gran escala de alimentos y su amplia distribución y (2) la globalización del suministro de alimentos. Entre otros factores que colaboran a la ocurrencia de las enfermedades entéricas están: comer fuera del hogar, la aparición/diversificación genómica de nuevos patógenos y el creciente aumento de los consumidores de riesgo, como los adultos mayores que hoy en día viven más años, pero con el sistema inmunitario más débil (Nyachuba, D. G., 2010).

Los costos asociados a las enfermedades transmitidas por ingestión de alimentos contaminados son relevantes puesto que son la suma del costo del tratamiento, el valor de la pérdida de tiempo debido a la enfermedad y la disposición a pagar para

prevenir la muerte. Este último costo es un valor promedio que una determinada población está dispuesta a pagar para prevenir una enfermedad específica y así salvar vidas (Hoffmann, S., 2013). Dos estudios en el año 2012 estimaron que el costo de las enfermedades transmitidas por alimentos contaminados en los Estados Unidos (Scharff, R.L., 2012; Hoffmann, S., 2012) oscila entre los 14100 y los 77700 millones de dólares americanos por año (Hoffmann, S., 2012). Estas cifras nos dan una idea de la magnitud del problema y lo mucho que queda por hacer, no solo en términos de avances en el desarrollo de herramientas tecnológicas para la detección temprana de patógenos, sino también en el mejoramiento y la aplicación de normas como las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y procesos como el Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) de manera de garantizar la inocuidad de los alimentos.

## **1.2. Bacterias enteropatógenas**

Los enteropatógenos son un grupo de bacterias pertenecientes a la familia de las Enterobacteriaceae, la cual constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias, genética y bioquímicamente relacionadas. Estas se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, agua, vegetación y formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales, incluyendo el hombre. Esta distribución ubicua significa que es inevitable que algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae entren en la cadena alimentaria. Esta familia de microorganismos recibe su nombre dado que son saprófitos habituales del tubo digestivo. Las cepas de algunas especies son comensales inofensivos, tales como algunas cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*), aunque otras cepas de esta misma especie son importantes patógenos en humanos y animales (Puerta-García, A., 2010).

### 1.2.1. Taxonomía

Estudios filogenéticos de las bacterias pertenecientes a la familia de las Enterobacteriaceae permiten ubicarlos en el Filo Proteobacteria, la Clase Gammaproteobacteria y el Orden Enterobacteriales (Brenner, D.J., 2005). La Figura 1.1 muestra los niveles de clasificación (taxones) en un orden jerárquico en el cual el nivel Reino (o Dominio) Bacteria, es el de mayor jerarquía y el nivel Especie el de menor jerarquía. Este nivel Especie reúne a un conjunto de cepas microbianas que comparten muchas propiedades y difieren significativamente de otros grupos de cepas.

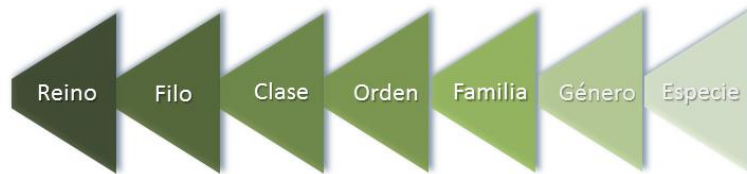


Figura. 1.1. Categorías taxonómicas.

Dentro de la familia Enterobacteriaceae (Figura 1.2) se han podido encontrar hasta ahora (Baylis, C., 2011) 48 géneros, separados en tres grupos dependiendo del grado de rapidez con que fermenta la lactosa. A su vez, dentro de estos 48 géneros se han encontrado 219 especies y 41 subespecies.

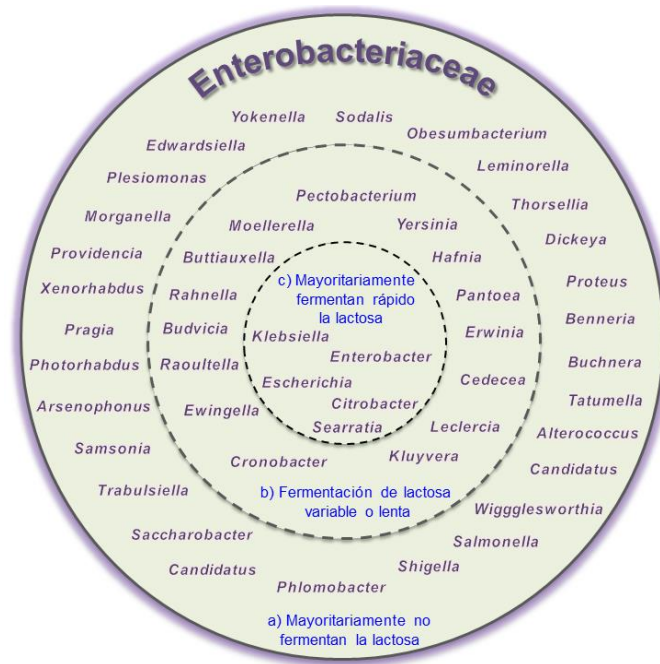


Figura 1.2. Familia Enterobacteriaceae, subdividida en tres grupos dependiendo de la capacidad de fermentar la lactosa. Diagrama modificado de Baylis, C., 2011.

### 1.2.2. Morfología

Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae tienen forma de bastón, con largo entre 1-5  $\mu\text{m}$  y de 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho, como muestra la Figura 1.3.

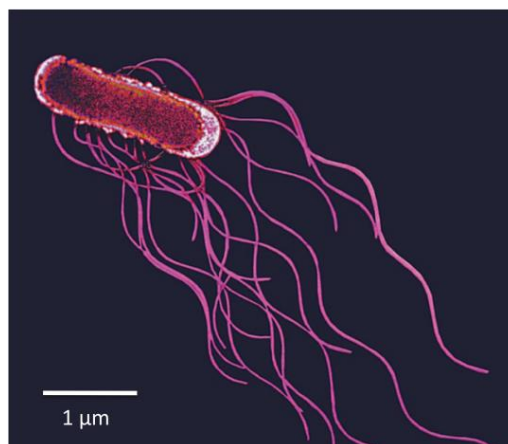


Figura 1.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una sola bacteria de *Salmonella*, aumentada 13250 veces. Las largas estructuras filosas corresponden a los flagelos, utilizados para el movimiento de la bacteria. Fotografía tomada del libro “*Salmonella*” (Brands, D.A., 2006).

Estas bacterias son generalmente móviles, gracias a la presencia de flagelos peritricos, excepto *Shigella*, *Tatumella* y algún otro miembro no móvil de esta familia. Son bacterias gram negativas, lo que quiere decir que su envoltura celular se caracteriza por poseer tres capas principales (Figura 1.4).

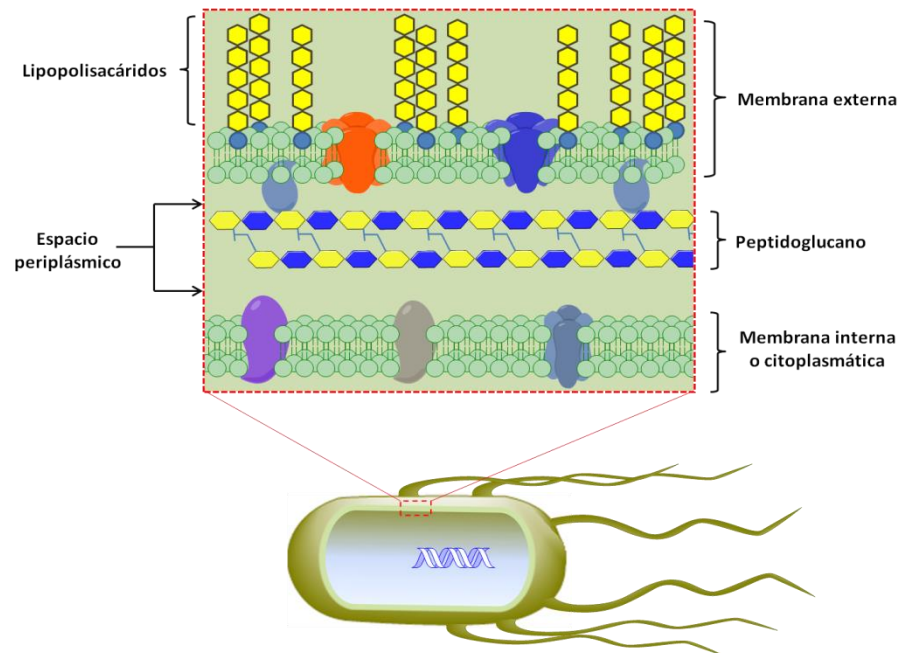


Figura 1.4. Representación de una bacteria gram negativa que muestra las tres principales capas de la envoltura celular: la membrana interna o citoplasmática, el peptidoglucano y la membrana externa en la cual están insertas las moléculas de lipopolisacárido (LPS).

La membrana interna o citoplasmática está compuesta por una bicapa de fosfolípidos responsable de regular el paso de nutrientes y moléculas de importancia en el metabolismo bacteriano. La capa intermedia está formada por un peptidoglucano delgado y un espacio periplásmico que contiene una alta concentración de proteínas. La tercera capa o membrana externa está formada, al igual que la membrana interna, por una bicapa de fosfolípidos que incluye una serie de moléculas complejas como: (1) lipopolisacáridos (LPS), ubicados en la parte más externa, y cuya función es la de ser un importante factor de virulencia;

(2) lipoproteínas, ancladas al peptidoglucano; (3) porinas, proteínas complejas formadas por varios monómeros, que permiten el paso de diferentes sustancias. También se incluyen otras proteínas de la membrana externa que en algunos casos forman ciertas estructuras, como los flagelos que permiten el desplazamiento de las bacterias, las fimbrias, importantes en la adhesión de las bacterias a los diferentes huéspedes y los pili sexuales que contienen plásmidos conjugativos, usados por las bacterias para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido (Puerta García, A., 2010).

El complejo molecular LPS está compuesto por tres partes: (a) el esqueleto de lípido A o endotoxina, que es la parte biológicamente activa de la molécula y que el huésped reconoce, (b) el oligosacárido fosforilado central o antígeno O por el cual se clasifican los serogrupos, involucrado en la resistencia bacteriana al efecto bactericida del suero normal, contribuyendo a que la bacteria sea capaz de sobrevivir más tiempo en sangre y (c) repeticiones de cadenas laterales de oligosacáridos (Puerta-García, A., 2010).

### 1.2.3. Metabolismo

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae son anaerobios facultativos y con algunas excepciones, tienen la capacidad para reducir nitrato a nitrito. Una característica común de las Enterobacteriaceae, que puede llegar a diferenciarlas de otras bacterias estrechamente relacionadas, es la pérdida de la enzima citocromo C oxidasa, aunque hay excepciones, como *Plesiomonas spp.* Las Enterobacteriaceae son catalasa positivas, lo que significa que en el metabolismo de este grupo de bacterias se encuentra presente la enzima catalasa. La función de esta enzima es degradar el peróxido de hidrógeno descomponiéndolo en agua y oxígeno. Esta reacción es aprovechada para la identificación de las bacterias pertenecientes a este grupo, aunque hay excepciones como las especies *Shigella dysenteriae* 1 y *Xenorhabdus*. La capacidad de producir ácido y gas a partir de la fermentación de D-glucosa, típica de la familia Enterobacteriaceae, se usa

normalmente como diagnóstico para su detección y cuantificación. Algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae, como *Enterobacter spp.*, *E. coli*, *Citrobacter spp.* y *Klebsiella spp.*, pueden ser reconocidos usando métodos que explotan su capacidad de fermentar lactosa rápidamente (normalmente entre 24 y 48 h). Estos son colectivamente llamados bacterias coliformes y son a menudo usados como organismos indicadores de contaminación fecal, debido a que su hábitat normal es el tracto gastrointestinal de mamíferos y aves. Sin embargo, a diferencia de la familia Enterobacteriaceae, éste no es un taxón bien definido (Baylis, C., 2011).

#### 1.2.4. Estrategias de patogenicidad

Los patógenos que provocan diarrea, tales como los enteropatógenos, emplean una variedad de estrategias sofisticadas para colonizar el epitelio intestinal del huésped. Los patógenos ingeridos tienen básicamente la capacidad para: (1) resistir las defensas no específicas del hospedador tales como la acidez estomacal, la peristalsis, la exfoliación de células de la mucosa, mucinas intestinales y bacteriocinas, (2) adherirse al epitelio intestinal y (3) colonizar el epitelio. La colonización puede en algunos casos involucrar invasión celular. La invasión celular puede ocurrir por multiplicación intracelular y diseminación de las bacterias a otros tejidos, o por persistencia bacteriana.

Aunque las bacterias patógenas emplean diferentes estrategias, comparten dianas comunes en las células hospedadoras y a menudo causan la misma respuesta celular. Los factores de virulencia actúan ya sea desde el medio extracelular, imitando ligandos celulares, o son inyectados hacia el medio intracelular. La célula huésped reacciona defendiéndose de la infección, iniciando una respuesta inflamatoria que altera el balance del fluido intestinal de manera de eliminar el patógeno, y como consecuencia causando diarrea (Souza dos Reis, R., 2010).

### 1.2.5. *Salmonella*, *Shigella* y *E.coli*

Tres de los patógenos de mayor incidencia en enfermedades transmitidas por alimentos contaminados son *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*.

*Shigella* y *Salmonella* son patógenos que causan gastroenteropatía en humanos. Las infecciones alimentarias son mayoritariamente causadas por *Salmonella* (Hilbert, F., 2012), distribuida ampliamente en la naturaleza y con una presencia común en animales, especialmente aves de corral y cerdos. Algunas cepas de *E. coli* pueden causar diarreas similares a *Shigella* (Fukushima, M., 2002).

El género *Salmonella* contiene más de 2500 serotipos (Swaminathan, B., 2006), todos con potencial patogénico en el ser humano (Tauxe, R.V., 1998). La mayoría de estos serotipos pertenecen a una sola especie, *Salmonella enterica*. *Salmonella enterica* incluye seis subespecies: *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* y *Salmonella enterica* subsp. *indica*.

En el género *Shigella* se encuentran las cuatro especies siguientes: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*. Cualquiera de las cuatro especies *Shigella* puede causar disentería (Pupo, G. M., 2000; Puerta-García, A., 2010).

Finalmente, el género *Escherichia* está compuesto por las siguientes especies: *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* y *E. vulneris*. Para la especie *E. coli* hay al menos cinco patotipos: *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Welch, R.A., 2006).



### 1.2.6. Métodos rápidos de detección e identificación

Si hablamos de métodos de detección e identificación de bacterias, no podemos de dejar de mencionar en primer lugar el método estándar de recuento en placas que ha sido ampliamente utilizado en los últimos 100 años en la microbiología de los alimentos. A pesar de ser un método simple, tiene la desventaja de ser muy laborioso, requiere de una cantidad considerable de materiales, preparación de grandes volúmenes de medio para las diluciones, así como espacio para el almacenamiento y la incubación de las placas de cultivos. Pero tal vez la mayor desventaja es la lentitud en obtener una respuesta.

A partir de la década de 1960 se han venido utilizando una variedad de métodos rápidos para el análisis microbiológico, continuando el desarrollo de estos hasta hoy en día. Estos métodos aplicados al análisis de los alimentos comenzaron 10 años después de hacerlo en el área clínica y se clasifican como muestra la Figura 1.5.

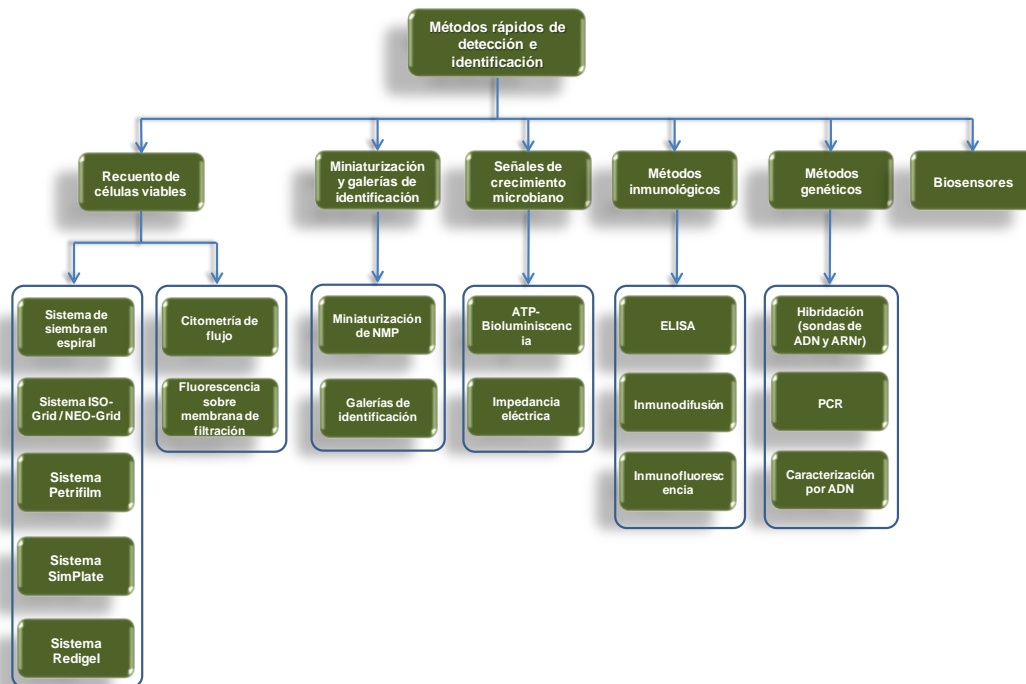


Figura 1.5. Clasificación de métodos rápidos de detección e identificación de bacterias.

A continuación se presenta una breve descripción de algunos de los sistemas de detección y los ejemplos de dispositivos que se encuentran en el mercado (Martín de Santos, R., 2010).

### *Recuento de células viables*

Un parámetro importante en el control de calidad de los alimentos es el recuento de células viables, tanto en los alimentos como en las superficies y el aire de las industrias agroalimentarias. En las últimas dos décadas se han registrado, entre otros, los siguientes sistemas:

- Sistema de siembra en espiral (ejemplos: Eddy Jet y Autoplate 4000). Permiten obtener rápidamente el recuento de células viables mediante el uso de una aguja de siembra que distribuye en forma de espiral una muestra líquida en la superficie de una placa de agar, produciendo un gradiente de concentración desde el centro hasta la periferia de la placa.
- Sistema Iso-Grid / Neo-Grid. Basado en la filtración de la muestra a través de una membrana con rejilla hidrofóbica donde quedan depositados los microorganismos y cuyas líneas hidrofóbicas impiden la extensión de las colonias.
- Sistema Petrifilm. Utiliza medios de cultivo deshidratados sobre películas plásticas de dimensiones de 10 cm x 7.5 cm. El medio se rehidrata al añadir la solución de la muestra a analizar.

Los sistemas anteriores posibilitan el recuento microbiano de manera fácil disminuyendo el tiempo de respuesta. Sin embargo, requieren un tiempo de incubación para que cada microorganismo pueda crecer y hacer efectivo el

recuento. Para sortear este inconveniente se han desarrollado sistemas que permiten el recuento de microorganismos casi en tiempo real.

- Citometría de flujo (ejemplos: Bactiflow, BD Micro Pro, D-count). Es una técnica óptica rápida y sensible que permite detectar células individuales en matrices complejas y medir características fisiológicas de esas células. Las células se hacen pasar una a una por un citómetro y sobre ellas se hace incidir un haz de luz láser; la luz se dispersa y es absorbida por los microorganismos. Se puede estimar el número, tamaño y forma de los microorganismos. Las ventajas de esta técnica son la rapidez y que no requiere etapa de enriquecimiento. Como desventaja se considera el costo del equipo.
- Fluorescencia sobre membrana de filtración (ejemplos: Milliflex Quantum, Chem Scan RDI). Se realiza una filtración de la muestra por medio de una membrana de policarbonato donde quedan retenidos los microorganismos. Se tiñen las membranas con el fluorocromo naranja de acridina, el cual se une a los ácidos desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN), generando distintos patrones de fluorescencia dependiendo de la fase de crecimiento del microorganismo. Se observan los filtros en un microscopio de fluorescencia y los recuentos de microorganismos se obtienen mediante el conteo de las partículas fluorescentes. La ventaja es la rapidez y la desventaja el alto LOD.

### *Miniaturización y galerías de identificación*

Los sistemas miniaturizados parten del concepto de la microplaca que permite reducir el volumen de reactivos y medios a emplear en los experimentos. Es posible estudiar el efecto de una reacción vs un microorganismo o un

microorganismo vs muchas reacciones o diversas reacciones vs diversos microorganismos.

- Miniaturización del Número Más Probable (NMP) (ejemplos: Colilert-18, Enterolert-DW, Pseudalert, Quanti-Tray, Tempo). El método del NMP se basa en la determinación de la presencia o ausencia de bacterias por medio de la turbidez en réplicas de diluciones consecutivas de un medio de crecimiento. Con el número de tubos turbios y transparentes, el uso de una tabla estadística de NMP y el factor de dilución, se puede conocer el número de microorganismos en la muestra original. El sistema miniaturizado disminuye considerablemente el consumo de reactivos, y el espacio y el tiempo necesario, con respecto al método del NMP convencional.
- Galerías de identificación (ejemplos: API, BBL Enterotube II, BBL Crystal ID, Micro-ID, Microgen ID, FOOD-SYSTEM, Microbact, RapID, OBIS, BiOLOG, VITEK). Se basan en el metabolismo de sustratos específicos por parte de los microorganismos y su detección mediante diversos sistemas indicadores.

#### *Medidas de señales de crecimiento microbiano*

Otros métodos desarrollados son aquellos que estiman de forma indirecta el número de microorganismos presentes en los alimentos. El principio en que están basados consiste en que las señales utilizadas para observar la presencia de microorganismos se modifican con el crecimiento microbiano. Estas señales pueden ser tan diversas como pH, enzimas específicas, niveles de ATP, impedancias, etc.

- Adenosín trifosfato (ATP) – Bioluminiscencia (ejemplos: AccuPoint, Clean-Trace, LIGHTNING MVP, systemSURE Plus). En presencia de

la enzima luciferasa, el ATP, molécula presente en todas las células, facilita el paso del sustrato luciferina a oxiluciferina, generando luz. La cantidad de ATP es proporcional a la cantidad de células vivas, por lo que la luz generada es proporcional a la masa microbiana. La aplicación de esta tecnología en la industria de los alimentos está relacionada con la monitorización de la higiene en superficies.

- Impedancia eléctrica (ejemplos: RABIT, Bac Trac). Estos sistemas están basados en el hecho de que la impedancia es una medida de la resistencia que ofrece un medio a la corriente eléctrica. El crecimiento bacteriano en un medio de cultivo produce cambios en la conductividad del medio debido a la transformación que ejercen los microorganismos sobre los sustratos no iónicos como grasas, proteínas y carbohidratos, dando productos iónicos como ácidos grasos, aminoácidos y ácidos orgánicos, resultando en un cambio en la conductividad del medio, y por tanto en la impedancia.

### *Métodos inmunológicos*

Las técnicas inmunológicas son procedimientos analíticos basados en la visualización de la interacción entre un antígeno y un anticuerpo mediante la reacción colorimétrica producida por la actividad de una enzima que actúa como marcaje. Numerosos estudios demuestran que la reproducibilidad de los kits comerciales que utilizan anticuerpos monoclonales es superior respecto a la de los que usan anticuerpos policlonales (González, I., 1994). El inmunoensayo enzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) constituye en la actualidad la técnica más utilizada en el análisis microbiológico de los alimentos. En el mercado se encuentran algunos kits para bacterias específicas como RIDASCREEN de la compañía R-Biopharm para *Chlamydophila pneumoniae* y *Chlamydia trachomatis*. De la compañía Vircell se encuentran kits para la detección de *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila* entre otras..

## *Métodos genéticos*

Los métodos genéticos se dirigen a la detección de secuencias de ácidos nucleicos característicos de cada microorganismo (Wells, J. M., 2003).

- Hibridación (sondas de ADN y ARN ribosomal) (ejemplos: GeneQuence y HybriScan). Esta es una de las técnicas más sencillas para identificar un microorganismo específico en un alimento. Está basada en la hibridación de los ácidos nucleicos de los microorganismos con sondas genéticas conocidas.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite obtener *in vitro* un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN, basada en mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del ADN durante la división celular. En general es 100 veces más rápida que la técnica de ELISA, detecta cantidades muy bajas de ADN o ARN, pero requiere de un tiempo de crecimiento bacteriano que va de 10 a 24 h, más la extracción del ADN de las células.

### 1.2.7. Legislación

Los criterios microbiológicos que se están aplicando en la Unión Europea, y por tanto en España, se rigen por el Reglamento (CE) 2073/2005 y las modificaciones que a éste se le han realizado.

Este reglamento especifica en su artículo nº2 el término “criterio microbiológico” como criterio que define la aceptabilidad de un producto, un lote de productos alimenticios o un proceso, basándose en la ausencia, presencia o número de microorganismos, y/o en la cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad de masa, volumen, superficie o lote.

De acuerdo al Reglamento (CE) 1441/2007 y sus modificaciones: Reglamento (CE) 365/2010, Reglamento (UE) 1086/2011, Reglamento (UE) N° 209/2013 y Reglamento (UE) N° 217/2014, se establece para *Salmonella* ausencia en 25 g o 25 mL de alimento, y para el caso de *Enterobacteriaceae* se acepta un máximo de 10 unidades formadoras de colonia/mL (CFU/mL) en productos como leche pasteurizada y otros productos lácteos pasteurizados.

### **1.3. Biosensores**

Conocer nuestro entorno y chequear las condiciones que nos puedan favorecer o perjudicar es un mecanismo de sobrevivencia, y nuestros sentidos (oído, vista, tacto, gusto y olfato), que son nuestros (bio)sensores naturales, nos mantienen alejados de los potenciales peligros que puedan existir en el medio. Sin embargo nuestros (bio)sensores pueden “señalizarnos” hasta un cierto umbral, más allá del cual no tienen la capacidad de percibir cambios. Estas limitantes que tiene el ser humano (y seres vivos en general) en sus sistemas sensoriales, han llevado a la investigación y al desarrollo de dispositivos que han permitido aumentar sus capacidades naturales. De esta manera una de las razones por las que se han desarrollado los sensores y biosensores es para entregarnos “señales” sobre los niveles (imperceptibles por nuestros sentidos) de elementos como moléculas, microorganismos o condiciones físico-químicas, que se encuentran tanto en nuestro entorno como en nuestro propio cuerpo.

Las primeras luces de lo que sería el desarrollo de un biosensor comenzaron a ser ilustradas por el profesor Leland C. Clark por la década de 1960, quien inmovilizó la enzima glucosa oxidasa sobre la superficie de una membrana de diálisis semipermeable en una sonda de oxígeno. La adición de glucosa determinó que la concentración de oxígeno disminuyera proporcionalmente. El primer biosensor fue descrito por Clark y Lyons en un artículo publicado en el año 1962 acuñando el término “electrodo enzimático” (Mascini, M., 2006).

Una definición de consenso del término biosensor es aquella propuesta por Collings y Caruso que lo definen como *“un dispositivo analítico que aprovecha un sistema de reconocimiento o detección biológico para una molécula o macromolécula diana, en conjunto con un transductor fisicoquímico, el cual convierte el evento de reconocimiento biológico en una señal de salida utilizable”* (Collings, A., 1997).

Para entender el principio del funcionamiento de un biosensor se puede recurrir a los siguientes esquemas. En el primero de ellos (Figura 1.6) se representan los dos elementos básicos que componen un biosensor: el elemento de reconocimiento biológico y el transductor.

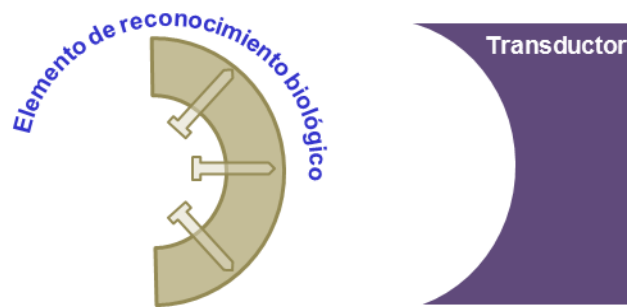


Figura 1.6. Representación de los dos elementos básicos que componen un biosensor: Elemento de reconocimiento y transductor.

En el segundo esquema (Figura 1.7) se muestra que en un biosensor ambos elementos están conectados en forma directa, de manera que al unirse la molécula específica o analito, presente en la muestra a analizar, con el elemento de reconocimiento biológico, se produce una señal química o física. El transductor convierte esta señal química o física en una señal que luego será procesada para entregar información cuantitativa o semicuantitativa. Principalmente los transductores son de tipo electroquímico, piezoeléctrico, calorimétrico u óptico.



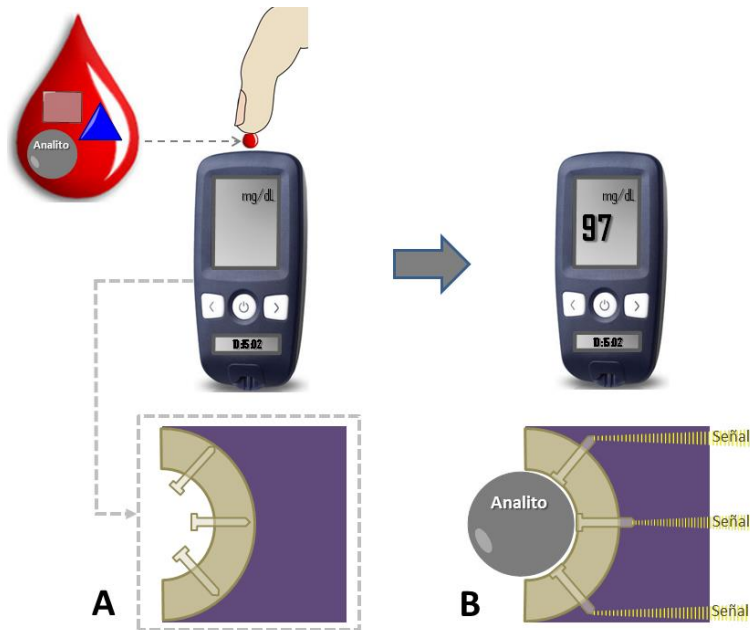


Figura 1.7. Principio de funcionamiento de un biosensor. El esquema muestra como en ausencia del analito (A) no se producen alteraciones físicas, químicas o biológicas. En presencia del analito (B) la alteración producida es percibida y transformada por el transductor en una señal eléctrica.

El comportamiento de un biosensor normalmente se caracteriza experimentalmente evaluando su LOD, sensibilidad, selectividad, rango lineal y dinámico, reproducibilidad, tiempo de respuesta, estabilidad, portabilidad y facilidad de uso. Idealmente la superficie del sensor debería ser regenerable de manera de realizar varias medidas en forma consecutiva. Para muchas aplicaciones en la industria de alimentos, medioambiente o diagnóstico clínico, el biosensor debería ser capaz de monitorear el analito en línea (Ronkainen, N. J., 2010).

Los biosensores se pueden clasificar de acuerdo al elemento de reconocimiento o bien al tipo de transductor usado para convertir la señal generada (Figura 1.8).

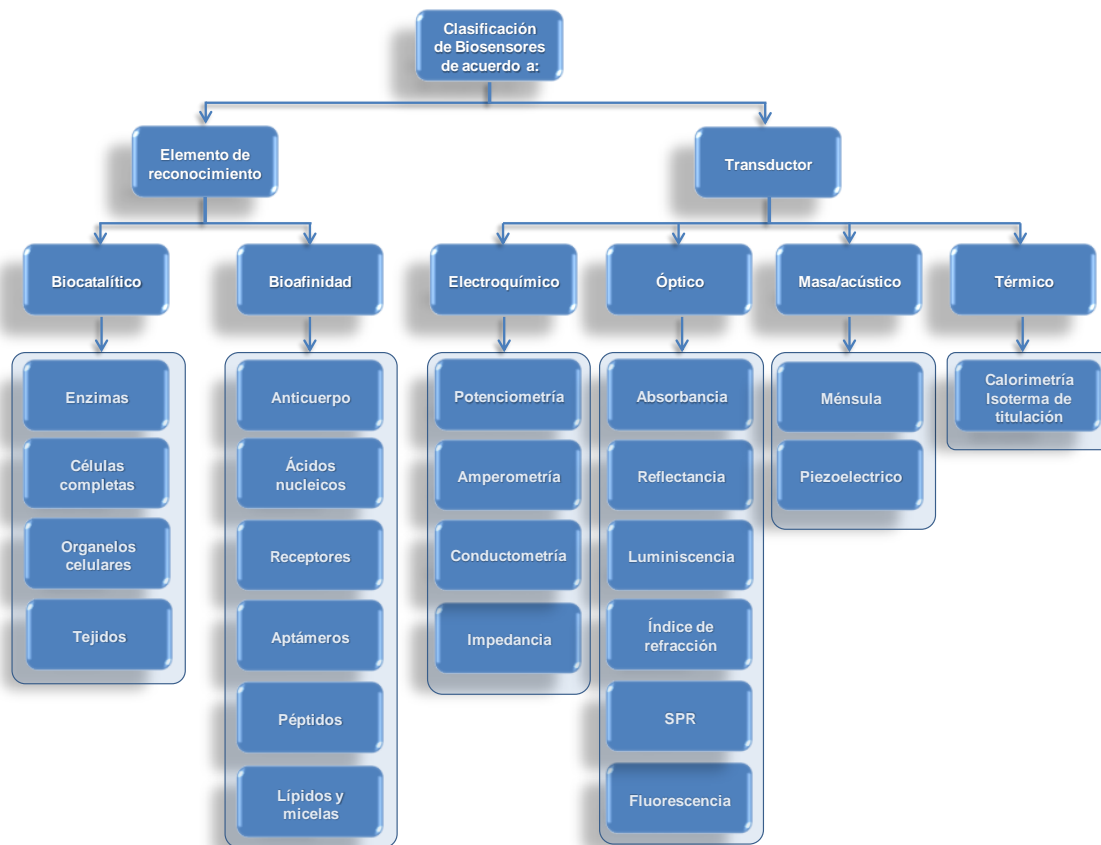


Figura 1.8. Clasificación de los biosensores de acuerdo al componente biológico y al transductor.

### (I) Basados en el elemento de reconocimiento

Como muestra la Figura 1.8, los componentes biológicos en un biosensor pueden ser de dos clases: los de tipo biocatalíticos y los de bioafinidad. Los biosensores con elemento de reconocimiento biocatalítico más utilizados y mejor desarrollados son los que contienen enzimas (mono o multi-enzimas); células completas, ya sean microorganismos como bacterias o bien células eucarióticas; organelos celulares como mitocondrias; y finalmente tejidos de plantas y animales. El principio básico en este tipo de biosensores es que uno o más substratos reaccionan en presencia de enzima(s), células o cultivos de tejidos, generando uno o más productos (Theavenot, D.R., 2001). Así la detección de un analito se lleva a cabo aprovechando alguna propiedad cuantificable (color, electroactividad,

bioluminiscencia, etc) ya sea del sustrato, producto o cofactor/coenzima involucrado en la reacción enzimática.

En el caso de los biosensores de componente biológico de bioafinidad, se basan en la interacción del analito con moléculas o ensamblajes de moléculas organizadas que han sido aisladas de su ambiente biológico original o en su defecto han sido manufacturadas. En algunos casos la formación del biocomplejo es monitoreada usando una reacción biocatalítica complementaria (Theavenot, D.R., 2001). Los ejemplos más desarrollados son aquellos basados en la unión de un antígeno a un anticuerpo específico. Sin embargo, desde un tiempo a esta parte se están desarrollando biosensores con otros elementos de bioafinidad como aptámeros, ácidos nucleicos, receptores de membrana o péptidos. También se han utilizado lectinas y carbohidratos como elementos de reconocimiento (Theavenot, D.R., 2001).

## (II) Basados en el elemento transductor

Los biosensores también se pueden clasificar de acuerdo al método de transducción empleado. El transductor cumple un importante rol en el proceso de detección de la señal y puede ser definido como un dispositivo que convierte un amplio rango de efectos o cambios físicos, químicos o biológicos, en una señal eléctrica, óptica, calorimétrica o piezoeléctrica, con una alta sensibilidad y una mínima perturbación en la medida (Lowe, R.S., 2007).

### 1.3.1. Biosensores electroquímicos

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por las siglas en inglés) define biosensor electroquímico como *“un dispositivo autónomo integrado que es capaz de entregar información analítica cuantitativa o semicuantitativa específica, usando un elemento de reconocimiento biológico (receptor bioquímico),*

*el cual se mantiene en contacto espacial directo con un elemento transductor electroquímico” (Theavenot, D.R., 2001).*

El concepto de “dispositivo autónomo integrado” no es absoluto, y esto se fundamenta en que del gran número de artículos publicados en el campo de los biosensores se pueden ver dos categorías de instrumentos, que son: a) máquinas de laboratorio de alto rendimiento, sofisticadas con capacidad de realizar mediciones precisas, de componentes e interacciones biológicas complejas y b) dispositivos portables y fáciles de usar por personal no especializado para análisis descentralizado. Los primeros instrumentos son caros y los segundos se pueden producir en masa y son de bajo costo (Turner, A.P.F., 2013). El uso de transductores electroquímicos en el diseño de biosensores proporciona algunas ventajas comparativas como su bajo costo, facilidad de uso, portabilidad, simplicidad en la construcción y una elevada sensibilidad (Eggins, B.R., 2002; Wang, J., 2006). La reacción monitoreada electroquímicamente genera normalmente una corriente medible (amperometría), una acumulación de carga medible o cambio de potencial (potenciometría) u otras propiedades conductivas del medio entre electrodos (conductimetría) (Grieshaber, D., 2008). La técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) se usa para monitorear tanto la resistencia como la capacitancia en un biosensor, siendo esta técnica la que aporta una mayor sensibilidad. La alta especificidad, sensibilidad, simplicidad e inherente miniaturización de los biosensores electroquímicos les permite competir con los protocolos ópticos más avanzados (Wang, J., 2006).

### 1.3.2. Técnicas electroquímicas

La electroquímica es la ciencia que investiga las reacciones químicas y el fenómeno de adsorción en una interfase electrodo-solución. Ofrece ciertas ventajas para la detección con biosensores. Por ejemplo, las medidas no dependen en forma considerable del volumen de reacción y por tanto se pueden usar volúmenes muy pequeños para hacer medidas. Con la detección

electroquímica se pueden alcanzar LODs bajos y las medidas pueden ser realizadas sobre muestras turbias o coloreadas. Los biosensores electroquímicos pueden emplear transducción potenciométrica, amperométrica o impedimétrica, convirtiendo la información química, física o biológica en una señal eléctrica medible (Pohanka, M., 2008; Ronkainen, N.J., 2010). A continuación se revisarán conceptos básicos de electroquímica, para posteriormente abordar las técnicas electroquímicas empleadas en biosensores electroquímicos.

### *Conceptos básicos de electroquímica.*

#### Celda y reacción electroquímica

En los sistemas electroquímicos, el transporte de carga ocurre a través de la interfase entre un conductor eléctrico (electrodo) y un conductor iónico (electrolito). La carga es transportada a través del electrodo por el movimiento de electrones. Normalmente los materiales de los electrodos incluyen metales sólidos como el oro y el platino, metales líquidos como el mercurio, carbono como el grafito y semiconductores como el silicio. En la fase electrolito, la carga es transportada por el movimiento de los iones. Los electrolitos usados con más frecuencia son soluciones líquidas que contienen especies iónicas ya sea en agua o en solventes no acuosos (Bard, A.J., 1980).

Las celdas electroquímicas están divididas en dos tipos: las galvánicas y las electrolíticas. Las celdas galvánicas producen energía eléctrica, mientras que las celdas electrolíticas (Figura 1.9) consumen electricidad a partir de una fuente externa. En las celdas electrolíticas se requiere aplicar un potencial en exceso sobre su Potencial de Circuito Abierto (OCP) para forzar un proceso electroquímico no espontáneo (Bard, A.J., 1980).

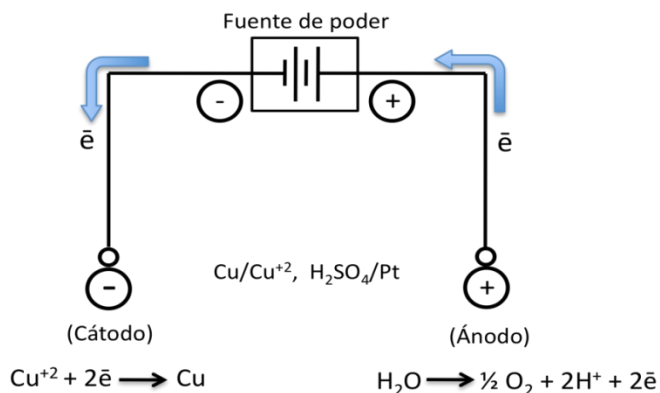


Figura 1.9. Celda electrolítica. Tomada y modificada de referencia Bard, A.J., 1980.

Una reacción electroquímica implica una transferencia de carga por medio de un electrón o un ión. Una reacción redox involucra la transferencia de al menos un electrón desde una especie química a otra y en consecuencia cambia el estado de oxidación de las especies. Esta reacción puede ocurrir, por ejemplo, a través de la aplicación de un voltaje externo. La reacción redox involucra una oxidación donde las especies pierden electrones y una reducción en donde ganan electrones (Wang, J., 2006).

Procesos faradaicos y no faradaicos.

En una celda electroquímica pueden ocurrir dos tipos de procesos en el electrodo. Si el proceso lleva asociada la transferencia de electrones en la interfase electrodo-solución, el proceso es denominado faradaico. Esta reacción redox obedece a la ley de Faraday (Ecuación 1.1) la cual correlaciona la carga total  $Q$ , cuantificada en Coulombs (C), que pasa a través de una celda, con la cantidad de producto  $N$ , cuantificada en moles:

$$Q = nFN \quad \text{EC. 1.1}$$

donde  $F$  es la constante de Faraday,  $F = 96485,3 \text{ C/mol}$  y  $n$  es el número de electrones transferidos por mol de producto.

La corriente  $i$  se expresa en amperios (A), esto es C/s. La ecuación diferencial de la ley de Faraday (Ecuación 1.2) muestra que la velocidad a la cual se mueven los electrones a través de la interfase está directamente relacionada con la velocidad de reacción que ocurre en la interfase. Por tanto, cuando se mide la corriente faradaica también se está midiendo la velocidad de una reacción química. Esto es una característica única de la electroquímica. La mayoría de las técnicas no proveen una medida instantánea de la velocidad de reacción (Kissinger, P.T., 2002).

$$i = \frac{dQ}{dt} = nF \frac{dN}{dt} \quad \text{EC. 1.2}$$

También puede ocurrir adsorción y desorción en la interfase electrodo-solución, conocido como proceso no faradaico. En este caso, aunque la carga no atraviesa la interfase, corrientes externas pueden fluir cuando cambia el potencial, el área del electrodo o la composición de la solución. La interfase electrodo-solución actúa como un capacitor cuando ocurre un proceso no faradaico en una celda electroquímica. Cuando un potencial es aplicado a un capacitor, se produce una acumulación de carga en las placas de metal (Figura 1.10) de acuerdo a la Ecuación 1.3.

$$\frac{Q}{E} = C \quad \text{EC. 1.3}$$

donde  $Q$  es la carga almacenada en el capacitor (en Coulombs, C),  $E$  es el potencial a través del capacitor (en Volt, V) y  $C$  es la capacitancia (en Farads, F). Una corriente, llamada corriente de carga, fluye durante este proceso de carga (Bard, A.J., 1980).

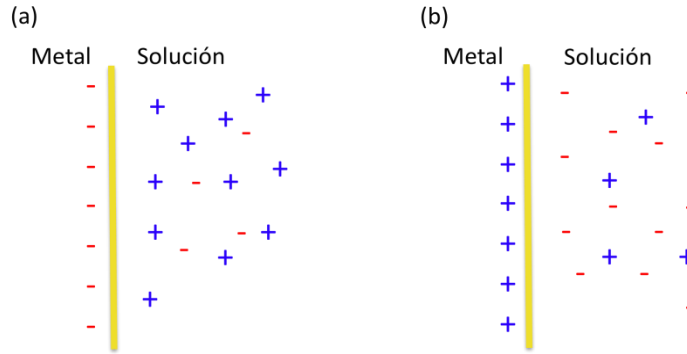


Figura 1.10. La interfase metal-solución actúa como un capacitor con una carga negativa (a) y positiva (b) en el metal. Tomado y modificado de Bard, A.J., 1980.

### Interfase electrodo-solución

Las fuertes interacciones entre las moléculas en solución y la superficie del electrodo resultan en la formación de una doble capa eléctrica, caracterizada por una capacitancia de doble capa. En la Figura 1.11 se muestra el modelo de doble capa.

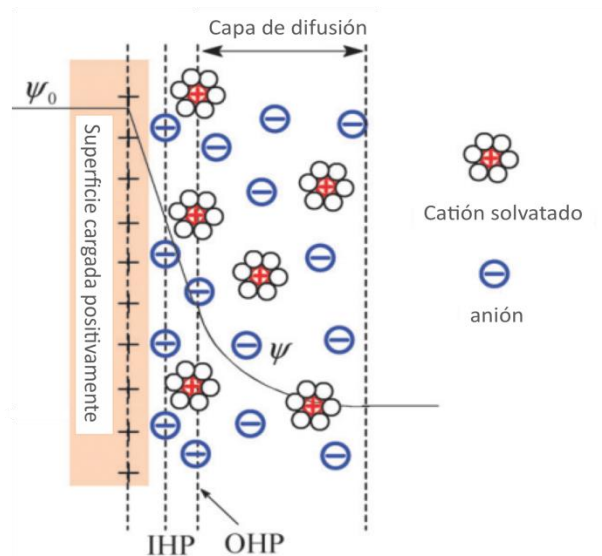


Figura 1.11. Modelo de doble capa eléctrica en una superficie cargada positivamente. IHP corresponde a la distancia más próxima (al electrodo) de iones adsorbidos específicamente y OHP corresponde a la de los iones adsorbidos no específicamente. OHP es también el plano donde comienza la capa de difusión.  $\psi_0$  y  $\psi$  son los potenciales en la superficie del electrodo y en la interfase electrodo/electrolito, respectivamente. Tomado de Zhang, L.L., 2009.



Este modelo se puede pensar como un modelo de varias capas, en donde la más cercana al electrodo, llamada capa interna, contiene moléculas de solvente y especies que son adsorbidas específicamente. Esta capa interna también es llamada capa de Helmholtz (Zhang, L.L., 2009).

La capa interna o Helmholtz se divide en dos zonas: el plano interior de Helmholtz (IHP, Inner Helmholtz Plane) y el plano exterior de Helmholtz (OHP, Outer Helmholtz Plane) (Figura 1.11). Los centros de los iones adsorbidos específicamente están en el IHP, mientras que los iones solvatados más cercanos al plano del electrodo están en el OHP. Los iones adsorbidos no específicamente están distribuidos en una capa de difusión, localizada entre el OHP y el seno de la solución (Bard, A.J., 1980).

El espesor de la capa de difusión depende de la concentración iónica total en la solución. En la mayoría de los casos la corriente de carga generada por la doble capa es insignificante comparada con la corriente generada por el proceso faradaico. Sin embargo a bajas concentraciones de especies electroactivas, la corriente de carga puede ser mucho mayor que la corriente faradaica debida a la reacción de oxidación y reducción (Bard, A.J., 1980).

La reacción global generada en la interfase electrodo-solución,  $O + ne \leftrightarrow R$ , está compuesta de una serie de pasos (Figura 1.12) que causan la conversión de una especie disuelta oxidada,  $O$ , a una forma reducida,  $R$ , también en solución, o bien la conversión de la especie reducida a la especie oxidada, dependiendo del potencial eléctrico aplicado.

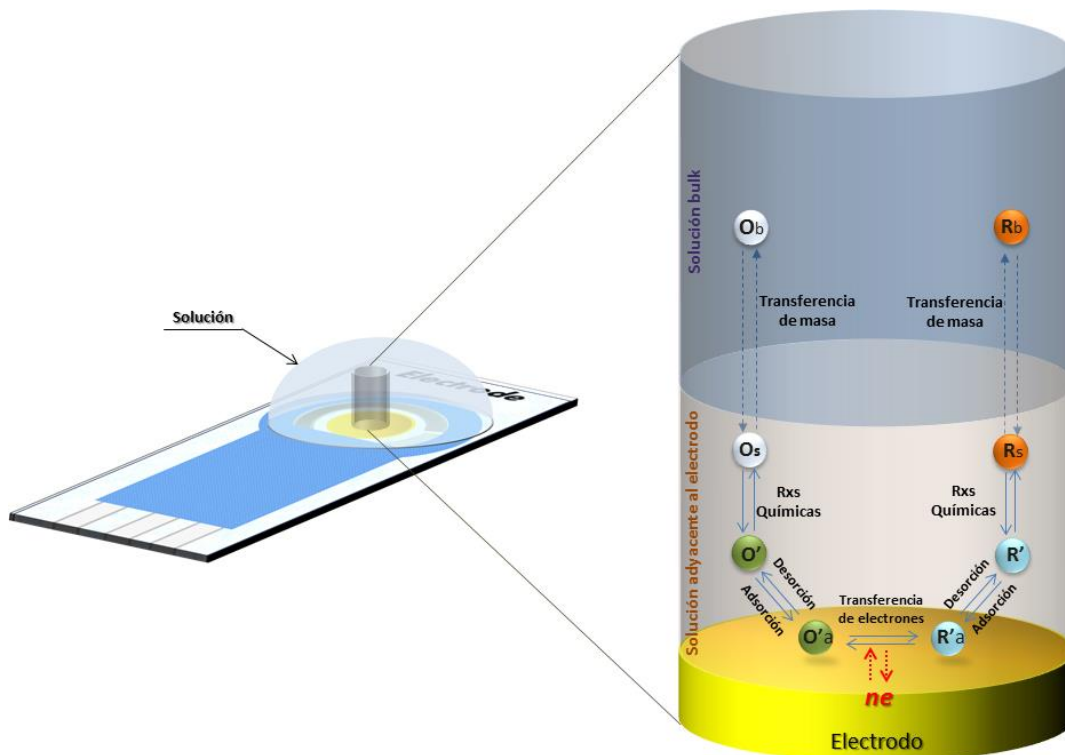


Figura 1.12. Mecanismo de reacción electroquímica sobre un electrodo.  $O_b$  y  $R_b$ : especies oxidada y reducida, respectivamente, en el seno de la solución.  $O_s$  y  $R_s$ : especies oxidada y reducida, respectivamente, en la solución adyacente al electrodo.  $O'$  y  $R'$ : especies oxidada y reducida, respectivamente, transformadas químicamente en la solución adyacente al electrodo.  $O'_a$  y  $R'_a$ : especies oxidada y reducida, respectivamente, adsorbidas sobre la superficie del electrodo.

En general, la corriente (velocidad de reacción) está gobernada por la velocidad de los siguientes procesos.

1. **Transferencia de masa:** Transporte de las especies en el seno de la solución ( $O_b$  y  $R_b$ ) hacia la solución adyacente a la superficie del electrodo ( $O_s$  y  $R_s$ ) y viceversa.
2. **Reacciones químicas** antes o después de la transferencia de electrones. Transformación química de las especies ( $O_s \leftrightarrow O'$ ;  $R_s \leftrightarrow R'$ ) en la solución adyacente a la superficies del electrodo. Estas pueden ser procesos como protonación o dimerización.

3. **Reacciones en la superficie del electrodo**, tal como la adsorción de las especies modificadas químicamente ( $O'$  y  $R'$ ) sobre la superficie del electrodo, o el proceso inverso, la desorción de las especies  $O'_a$  y  $R'_a$ .

4. **La transferencia de electrones** en la superficie del electrodo para reducir la especie oxidada  $O'_a$  a la forma reducida  $R'_a$  y viceversa.

Como con cualquier reacción que implica múltiples pasos, la velocidad de la reacción global está determinada por la velocidad del paso más lento. En procesos de análisis electroquímico este paso corresponde habitualmente a la transferencia de masa. Hay tres tipos de transporte de masa:

(a) Difusión

Se puede definir la difusión como un movimiento espontáneo de una especie desde una región de alta concentración a una región de menor concentración (Wang, J., 2006). La velocidad de difusión está descrita por la primera ley de Fick (Ecuación 1.4):

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad \text{EC. 1.4}$$

donde  $J$  es el flujo ( $\text{mol}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$ ) y corresponde al número de moles que pasan a través de una unidad de área en una unidad de tiempo,  $dC/dx$  es el gradiente de concentración en el punto  $x$  y  $D$  es el coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ).

(b) Migración

La migración es el movimiento de especies cargadas a través de un campo eléctrico. Cuando un potencial es aplicado a los electrodos, la interfase se carga y cualquier especie cargada cercana a la interfase

será atraída o repelida por esta, debido a la fuerza electrostática (Bond, A.A.M., 2010).

### (c) Convección

Hay dos formas de convección: la natural y la forzada. La convección natural ocurre debido al gradiente de densidad en una solución, lo que provoca un flujo de material desde la región más densa a la menos densa. Los gradientes de densidad también son causados por variaciones térmicas localizadas. La convección natural es generalmente indeseable en experimentos electroquímicos. La convección forzada, por otro lado, es la agitación deliberada de la solución por medios mecánicos (Compton, R.G., 2010).

La ecuación de Nernst-Planck (Ecuación 1.5) que relaciona el flujo unidireccional ( $x$ ) de una especie  $j$  debido a la difusión, migración y convección (Zoski, C.G., 2007) es:

$$J_j = -D_j \frac{dC_j(x)}{dx} - \frac{z_j F}{RT} D_j C_j \frac{d\phi(x)}{dx} + C_j v(x) \quad \text{EC. 1.5}$$

donde  $J_j$  (mol/cm<sup>2</sup>·s) es el flujo unidimensional de la especie  $j$  a una distancia  $x$  (cm) del electrodo;  $D_j$  (cm<sup>2</sup>/s),  $z_j$  y  $C_j$  (mol/cm<sup>3</sup>) son el coeficiente de difusión, la carga, y la concentración de la especie  $j$ , respectivamente;  $v(x)$  (cm/s) es la velocidad con la cual un elemento de volumen se mueve en solución;  $dC_j(x)/d(x)$  es el gradiente de concentración; y  $d\phi(x)/d(x)$  es el gradiente de potencial a través del eje  $x$ . La ecuación 1.5 se complica, especialmente cuando los tres procesos ocurren simultáneamente. Para simplificar la situación durante los electroanálisis, se agrega al medio un electrolito soporte fuerte y la solución se deja sin agitación, con lo cual los procesos de migración y convección se pueden considerar despreciables en comparación con el efecto de difusión.

## *Técnicas electroquímicas*

Las técnicas electroquímicas están organizadas generalmente en las siguientes tres principales categorías de medidas: corriente, potencial e impedancia. En biosensores electroquímicos las técnicas utilizadas comúnmente son las siguientes:

### (i) Voltametría/Amperometría

Las técnicas voltamétricas y amperométricas se caracterizan por la aplicación de un potencial al electrodo de trabajo respecto del electrodo de referencia (RE) para luego medir la corriente. La corriente es el resultado de una oxidación o reducción electroquímica en el electrodo de trabajo. Esta corriente está limitada por la velocidad de transporte de masa de las moléculas hacia el electrodo (Ronkainen, N.J., 2010). Si la corriente se mide en función del tiempo, a un potencial constante, entonces se habla de amperometría. Sin embargo, si la corriente se mide durante una variación controlada del potencial entonces esto se conoce como voltametría (Grieshaber, D., 2008). Los métodos voltamétricos incluyen voltametría de barrido lineal, voltametría cíclica, voltametría hidrodinámica, voltametría de pulso diferencial, voltametría de onda cuadrada, voltametría ac, polarografía y voltametría de redisolución. Estos métodos tienen un amplio rango dinámico, y son utilizados para la cuantificación de bajos niveles de analito (Ronkainen, N.J., 2010).

Las técnicas de voltametría y amperometría normalmente se llevan a cabo con electrodos de trabajo basados en Pt, Au o C, o bien un conjunto de dos o más electrodos de trabajo (matriz de electrodos) con respecto a un electrodo de referencia, el cual también sirve como electrodo auxiliar (CE), si las corrientes son bajas (1 nA a 1  $\mu$ A). La corriente resultante está directamente correlacionada a la concentración de la especie electroactiva

en el seno de la solución (Theavenot, D.R., 2001). La detección amperométrica es usada normalmente con sensores biocatalíticos y de afinidad debido a su simplicidad y sensibilidad. Puesto que no todos los analitos (o especies involucradas en la reacción de bioreconocimiento) a detectar con esta clase de biosensores son intrínsecamente capaces de coparticipar en las reacciones electroquímicas, en ocasiones se requiere el marcaje de alguna de las especies con una etiqueta electroactiva. Además, en los casos en que la reacción electroquímica requiere de un sobrepotencial, éste se puede reducir mediante la adición de un mediador de oxidación-reducción (Grieshaber, D., 2008).

La voltametría cíclica (CV) es la técnica más usada para investigar un sistema electroquímico. Además de indicar el grado de reversibilidad de un proceso electroquímico, también provee información acerca de la cinética de una reacción. En un experimento CV se aplica un potencial al electrodo de trabajo (WE) el cual cambia con el tiempo. El experimento registra el flujo de corriente a través del WE como una función del potencial aplicado y se construye un gráfico de corriente vs potencial, conocido como voltamograma. Como muestra la Figura 1.13 el potencial del electrodo de trabajo comienza a un valor  $E_1$ , y luego se va incrementando en forma lineal hasta el valor  $E_2$ . En este punto la dirección del barrido se invierte y el potencial del electrodo de trabajo vuelve normalmente al valor original (Compton, R.G., 2011).

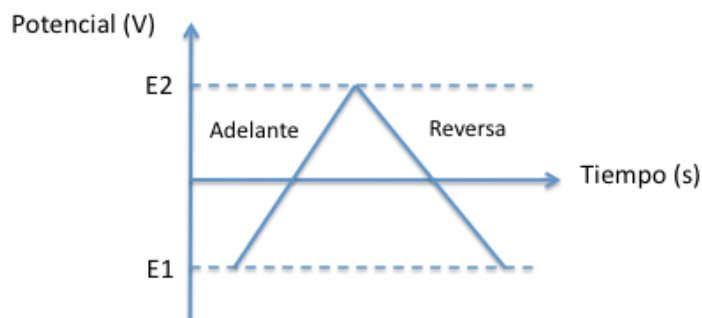


Figura 1.13. Potencial aplicado al electrodo de trabajo en voltametría cíclica.

La Figura 1.14 muestra un voltamograma cíclico típico con dos picos simétricos (catódico y anódico) de una reacción electroquímica reversible. La información que se puede extraer del CV, es decir, la diferencia entre los potenciales de oxidación y reducción ( $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$ ) y el cociente de los picos de corriente ( $i_{pa}/i_{pc}$ ), provee información respecto a la reversibilidad del sistema redox (Compton, R.G., 2011).

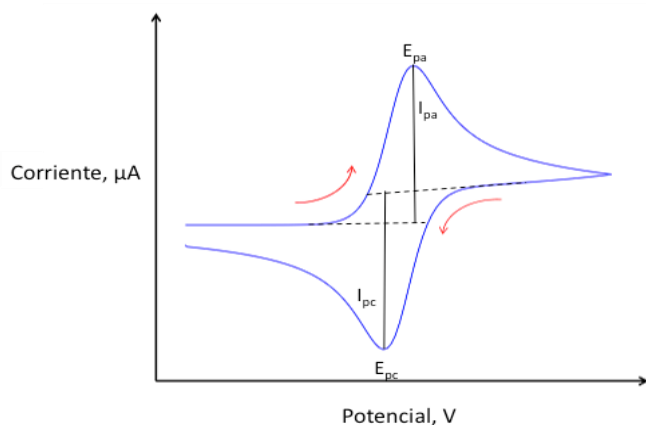


Figura 1.14. Voltamograma cíclico con el pico de oxidación ( $E_{pa}$ ), corriente de oxidación ( $I_{pa}$ ), pico de reducción ( $E_{pc}$ ) y corriente de reducción ( $I_{pc}$ ).

El pico de corriente se puede graficar en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. La ecuación de Randles-Ševčík (Ecuación 1.6) predice que el pico de corriente debería ser proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido

$$I_p = 2.69 \times 10^5 \times n^{3/2} \times A \times C \times D^{1/2} \times \nu^{1/2} \quad \text{E.C. 1.6}$$

donde  $n$  es el número de electrones involucrados en la reacción,  $A$  es el área superficial del electrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $C$  es la concentración en el seno de la solución ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ),  $D$  es el coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) y  $\nu$  es la velocidad de barrido ( $\text{V}/\text{s}$ ).

La reversibilidad del sistema está indicada por el cociente  $I_{pa}/I_{pc}$  y la diferencia entre los potenciales de oxidación y reducción ( $\Delta E_p$ ). Un cociente igual a 1 indica una reacción reversible. En una reacción redox en la cual se produce la transferencia de un electrón, el  $\Delta E_p$  debería ser 0.059 V a 25°C, de acuerdo a la Ecuación 1.7

$$\Delta E_p = 0.059/n \qquad \text{E.C. 1.7}$$

(ii) Potenciometría

Los sensores potenciométricos están basados en la medición del potencial de una celda electroquímica por la cual circula una corriente despreciable o cero (Ronkainen, N.J., 2010). Ejemplos de dispositivos potenciométricos son los electrodos de pH y los electrodos selectivos de iones (ISE, ion-selective electrode) para iones como  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$  (Theavenot, D.R., 2001; Pejic, B., 2006). Se utilizan dos electrodos de referencia para medir el potencial a través de una membrana que reacciona selectivamente con el ion de interés. Este tipo de sensores químicos pueden ser convertidos a biosensores recubriéndolos con un elemento biológico como una enzima, que catalice una reacción que genere iones (Ronkainen, N.J., 2010).

Para medidas potenciométricas, la relación entre la concentración y el potencial está gobernada por la ecuación de Nernst (Ecuación 1.6):

$$EMF(E_{cell}) = E_{cell}^0 - \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln Q \qquad \text{E.C. 1.6}$$

donde  $E_{cell}$  representa el potencial observado en la celda a corriente cero. También se le denomina fuerza electromotriz ( $EMF$ ). De acuerdo a esta ecuación, los cambios de potencial son logarítmicamente proporcionales a la actividad de un ion específico.  $E_{cell}^0$  es la contribución de un potencial constante a la celda, R es la constante universal de los gases, T es la



temperatura absoluta (en grados Kelvin),  $n$  es el número de cargas de la reacción en el electrodo,  $F$  es la constante de Faraday y  $Q$  es el cociente entre la concentración de ion en el ánodo y en el cátodo.

### (iii) Conductimetría

Los dispositivos conductimétricos miden la capacidad de un analito (por ejemplo, solución electrolito) o un medio (nanohilo) a conducir una corriente eléctrica entre electrodos o nodos de referencia. Por otro lado la impedancia, que será tratada en el apartado siguiente, es una medida de la capacidad de un circuito para resistir una corriente eléctrica. Los dispositivos conductimétricos pueden ser considerados como un subconjunto de los dispositivos impedimétricos. Esto es porque la mayoría de los instrumentos utilizados para medir la conductividad eléctrica son instrumentos para medir la resistencia o la conductancia de una celda con una muestra determinada. En la mayoría de los casos los dispositivos conductimétricos han estado fuertemente asociados con enzimas, donde la fuerza iónica, y por tanto la conductividad de la solución entre dos electrodos cambia como resultado de una reacción enzimática (Grieshaber, D., 2008).

### (iv) Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

La EIS fue inicialmente usada para la determinación de la doble capa, pero ha ganado interés y atención en los últimos años, no solo como técnica complementaria para la caracterización de procesos que ocurren en una interfase compleja en el electrodo, sino también como técnica de determinación cuantitativa, siendo la técnica electroquímica capaz de proporcionar mayor sensibilidad. La EIS se está convirtiendo en una herramienta poderosa en electroanálisis. El análisis por EIS es capaz de proveer información relacionada con la interfase del electrodo, su estructura

y las reacciones que suceden (Geenen, F., 1990). Se ahondará en más detalles de esta técnica electroquímica en los capítulos 5 y 6, donde se utiliza para la detección de bacterias.

### 1.3.3. Aplicaciones y comercio

Los biosensores encuentran aplicación en áreas como la medicina, la industria farmacéutica, el control de procesos y alimentos, el monitoreo medioambiental, defensa y seguridad. La mayor parte del mercado, que sobrepasa los US\$13000 millones, está liderado por el área del diagnóstico médico, en especial, los sensores de glucosa para personas con diabetes (Turner, A.P.F., 2013).

Los principales mercados de los biosensores incluyen laboratorios de investigación, diagnóstico en el punto de atención (point of care), control de procesos industriales, monitoreo medioambiental, seguridad y biodefensa (Frost and Sullivan, 2010).

El sector del mercado de los dispositivos destinados al diagnóstico en el punto de atención (Figura 1.15) es sin duda el más grande y domina y continuará dominando el mercado de los biosensores más allá del 2017. El desarrollo de nuevos tipos de biosensores para nuevas pruebas de diagnóstico contribuye a apoyar esta tendencia. Se espera un cambio gradual desde pruebas de laboratorio a biosensores capaces de asegurar un análisis en tiempo real (Frost and Sullivan, 2010).

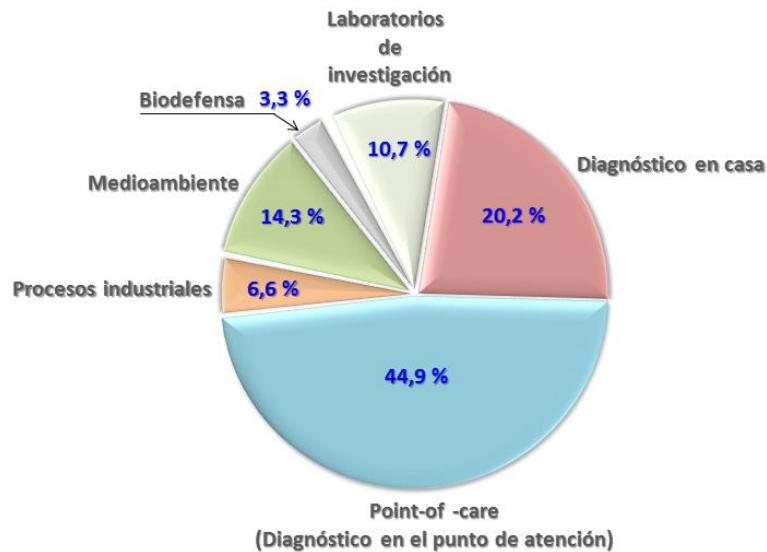


Figura 1.15. Principales mercados de los biosensores. Tomado de referencia Lazcka, O., 2007.

En cuanto a la venta de biosensores específicos para la medición de glucosa en la sangre, los dispositivos que lideran la lista son en primer lugar Accu-Check Aviva Nano de Roche Diagnostics, luego le siguen OneTouch Ultra de Lifescan, Bayer Contour de Bayer Diagnostic y Abbott FreeStyle Lite de Abbot. En el mercado de la detección de glucosa están los llamados “cuatro grandes” (Roche, Johnson&Johnson, Abbott y Bayer) que dominan el 90% de las ventas. Les siguen en menor tamaño de ventas las compañías: Molecular Devices Corporation, Affymetrix, Nova Biomedical y Biacore (Luong, J.H.T., 2008; Turner, A.P.F., 2013; Frost, L.A., 2010).

Particularmente, el sector en que los biosensores encuentran mayor aplicación en la detección de patógenos (Figura 1.16) es la industria de los alimentos, seguido por el sector clínico y el área de aguas y medio ambiente (Lazcka, O., 2007).

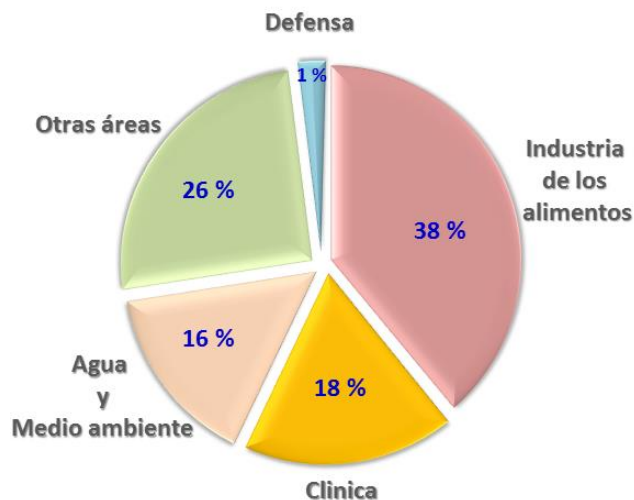


Figura 1.16. Principales áreas en las cuales los biosensores son utilizados para la detección de patógenos. Tomado de referencia Lazcka, O., 2007.

#### 1.3.4. Elementos de reconocimiento basados en afinidad

##### *Introducción*

Muchas de las aplicaciones actuales en áreas de ciencias de la vida o biotecnología requieren el uso de moléculas de reconocimiento altamente selectivas para ser utilizadas en dispositivos de detección. En los inicios de los biosensores, estos elementos de reconocimiento fueron aislados de organismos vivos, pero hoy en día muchos de ellos se sintetizan en el laboratorio (Chambers, J.P., 2008).

En la actualidad los anticuerpos de mamíferos son los mejor caracterizados y las herramientas de afinidad más ampliamente utilizadas. Sin embargo tanto la producción, como el uso y el mantenimiento de los anticuerpos no están exentos de dificultades, por lo que en los últimos años se han desarrollado herramientas de afinidad alternativas basadas en ácidos nucleicos (como sondas de hibridación y aptámeros), péptidos (secuencias cortas de aminoácidos y proteínas de unión creadas artificialmente) y matrices inorgánicas (polímeros de impresión molecular,

MIPs) (Ruigrok, V.J.B, 2011). Siendo estricto con la definición de biosensor cabe mencionar que los MIPs no entran en la categoría de “elemento biológico” como elemento de reconocimiento. En la siguiente tabla (Tabla 1.1) se comparan cinco elementos de reconocimiento basados en afinidad, utilizados para el reconocimiento de bacterias (células completas). Sin embargo solamente cuatro de estos elementos, dado su origen biológico, se pueden considerar parte del diseño de un biosensor. Y de estos se hará una breve descripción a continuación.

Tabla 1.1. Elementos de reconocimiento por afinidad con sus características principales. Modificado de Ruigrok, V.J.B., 2011.

Característica	Anticuerpos	Receptores	Aptámeros (ADNsh y ARN)	MIPs	Sondas de ADN
Tamaño (kDa)	~150 - 160	< 30	6 - 40	n.a.	5 - 150
Selección	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>
Producción	Animal o recombinante	Recombinante	Sintético	Sintético (gran escala, bajo costo)	Clonación, PCR
Modificaciones post selección	Posible, pero productos heterogéneos	Posible, pueden ser diseñados para productos homogéneos	Amplia variedad de opciones (azúcar, base o fosfato; 5', 3' o interno)	Posible, pero se debería tomar en cuenta durante la impresión	Si, con una variedad de moléculas (biotina, fluoróforos, enzimas, etc)
Estabilidad	Varias semanas a 4°C	Variable	DNA: años a T° ambiente RNA: varios meses a -80°C	Años a T° ambiente	Meses a 4°C, Semanas a T° ambiente
Sitio de unión	Monoclonal: homogéneos Policlonal : heterogéneos	Homogéneos	Homogéneos	Dependiendo de la estrategia de impresión, heterogéneos u homogéneos	Homogéneos
Moléculas dianas	Principalmente macromoléculas inmunogénicas	Macromoléculas y moléculas de bajo peso molecular	Moléculas de bajo peso molecular, macromoléculas y células	Principalmente moléculas de bajo peso molecular (<1000)	ADN hebra simple
Vida media <i>in vivo</i>	Días a semanas	n.a.	No tratados: segundos a minutos. Tratados: días	n.a.	Días, pocas semanas
Condiciones de aplicación	Fisiológicas	Fisiológicas y no fisiológicas	Fisiológicas, no fisiológicas y solventes orgánicos (hasta cierto punto)	Principalmente solventes orgánicos, soluciones acuosas hasta cierto punto	Fisiológicas y no fisiológicas

## Anticuerpos

Los anticuerpos reconocen su diana (antígeno) (Figura 1.17) con una alta especificidad y se unen generalmente con una alta afinidad, normalmente en el rango de nM a pM.

Los anticuerpos son glicoproteínas secretadas por los linfocitos B, conocidos como células plasmáticas. Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) están compuestos por cuatro polipéptidos: dos copias de una cadena pesada ( $\approx 55$  kD) y dos copias de una cadena liviana ( $\approx 25$  kD), las cuales están unidas por enlaces disulfuro no covalentes (Lipman, N.S., 2005).

Los anticuerpos realizan dos funciones esenciales: (1) se unen a un epítipo de un antígeno mediante los brazos (Fab) de la estructura en forma de "Y". Cada brazo o fragmento contiene un sitio de unión, haciendo que cada molécula de anticuerpo sea al menos bivalente. (2) El fragmento Fc le imparte al anticuerpo funciones efectoras como, por ejemplo, la activación de células NK (Natural Killer, por las siglas en inglés) y la fagocitosis (Lipman, N.S., 2005).

La especificidad de un anticuerpo se refiere a su capacidad para reconocer un epítipo específico en presencia de otros epítipos. Los anticuerpos policlonales son producidos por un gran número de clones de células B donde cada uno genera anticuerpos para un epítipo específico (Lipman, N.S., 2005).

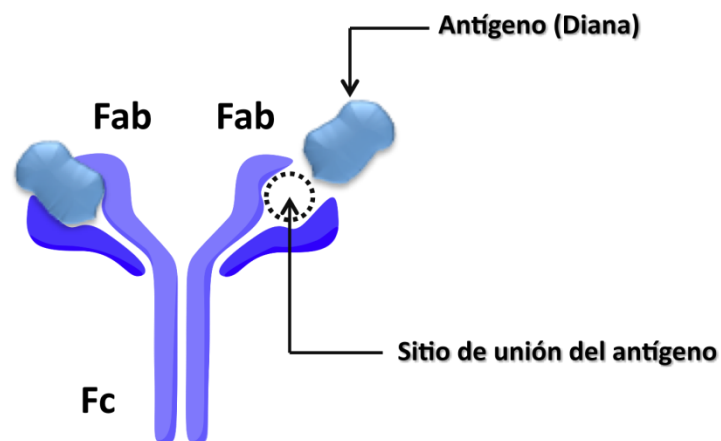


Figura 1.17. Representación de un anticuerpo en forma de "Y" con su antígeno y el sitio de unión al que se une el antígeno.

Debido a su especificidad y alta afinidad, los anticuerpos son usados en una gama variada de aplicaciones, especialmente los anticuerpos monoclonales, como por ejemplo en terapias de cáncer, hemostasia e inmunológica. Específicamente, han sido aprobados por la administración de drogas y alimentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) varios de estos anticuerpos para ser usados en pacientes con diversas enfermedades (Reichert, J. M., 2008). También son usados en terapias para el tratamiento de enfermedades que van desde la inflamación al cáncer (Reichert, J.M., 2008). Sin embargo, debido a su naturaleza proteica, los anticuerpos son susceptibles a la degradación, agregación y desnaturalización. Por tanto, el uso de anticuerpos está restringido, a menudo, a condiciones fisiológicas o similares.

Por otro lado, el proceso de producción de anticuerpos comienza con la inmunización de un animal. Por ello la generación de anticuerpos para moléculas que no son bien toleradas por los animales (como las toxinas) es extremadamente difícil. Además, también resulta difícil obtener anticuerpos contra moléculas que son inherentemente menos inmunogénicas. Por lo demás, la identificación y producción de anticuerpos monoclonales es laboriosa, cara y puede variar de lote a lote (Sumedha D. J., 1999).

### *Receptores de membrana*

Otro de los elementos de reconocimiento usados en el desarrollo de biosensores son los receptores de membrana, muy interesantes debido a su rol como mediadores de procesos fisiológicos y como dianas naturales para una variedad de toxinas y drogas. Estos receptores son proteínas transmembrana, solubles, que se unen a moléculas específicas llamadas ligandos (Figura 1.18). Aunque la especificidad y alta afinidad de estos receptores los convierte en elementos de reconocimiento atractivos, su incorporación en el desarrollo de biosensores se ha visto impedida debido a su bajo rendimiento, relativa inestabilidad, trabajo intenso

de aislamiento, largos protocolos de purificación y dificultad en la transducción (Chambers, J. P., 2008).

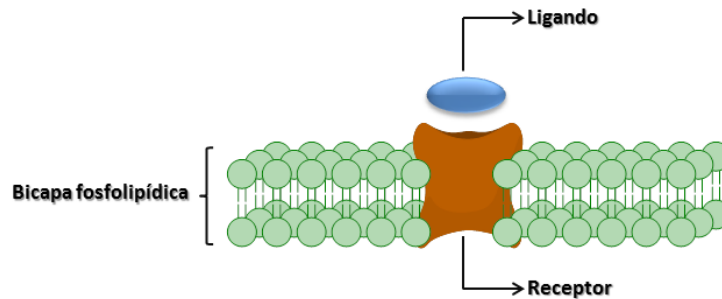


Figura 1.18. Representación de un receptor proteico insertado en una bicapa fosfolipídica con el sitio de unión expuesto a la molécula ligando.

### *Aptámeros*

En el año 1990 tres grupos de investigación independientes publicaron sus artículos sobre la selección *in vitro* de un ácido nucleico con afinidad hacia una molécula diana. Desarrollaron la selección y amplificación *in vitro* para aislar una secuencia de ARN que podía unirse específicamente a una diana determinada (Robertson, D.L., 1990; Tuerk, C., 1990; Ellington, A.D., 1990). Este oligonucleótido de ARN funcional fue llamado aptámero, que deriva de la palabra latín “aptus” que significa “fijar”, con el objetivo de enfatizar la relación de llave y cerradura con su molécula diana.

Los aptámeros son cadenas simples de ADN o ARN capaces de adoptar estructuras tridimensionales como resultado de la combinación de varias interacciones moleculares: puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals, apilamientos de bases, tetrabucles, G<sub>4</sub>-ADN o enlaces de coordinación metal-ion (Doessing, H., 2011).

La Figura 1.19 muestra como ejemplo la estructura tridimensional del aptámero para trombina (Ruigrok, V.J.B., 2012).



Los aptámeros pueden interactuar en forma precisa y específica con una molécula diana con una constante de disociación usualmente en el rango de pM a  $\mu$ M. Los aptámeros pueden distinguir enantiómeros de pequeñas moléculas o macromoléculas con pequeñas variaciones en su secuencia.

El rango de tamaño de los aptámeros está entre los 6 y los 40 kDa (Smuc, T., 2013; James, W., 2000).

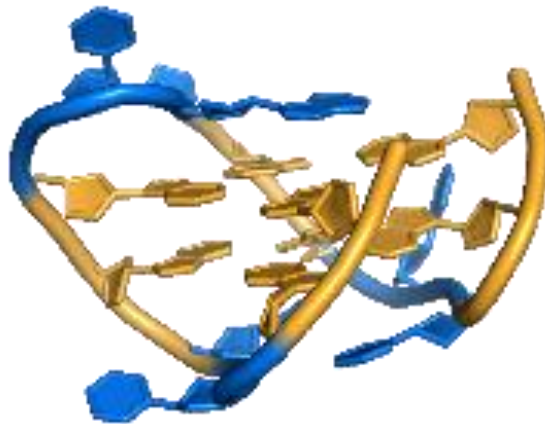


Figura 1.19. Estructura tridimensional del aptámero para trombina. En color oro se muestran las interacciones tipo cuadruplex ( $G_4$ -ADN) y en azul las de tipo bucle. Imagen tomada de Ruigrok, V.J.B., 2012.

### Selección de aptámeros

Los aptámeros afines a una diana específica son generalmente seleccionados usando un procedimiento de enriquecimiento exponencial *in vitro*, denominado SELEX cuyas siglas corresponden a las palabras en inglés Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (Figura 1.20). A diferencia de la clásica producción de anticuerpos en animales, todos los pasos de un procedimiento SELEX se realizan en tubos de ensayo (Ruigrok, V.J.B., 2011).

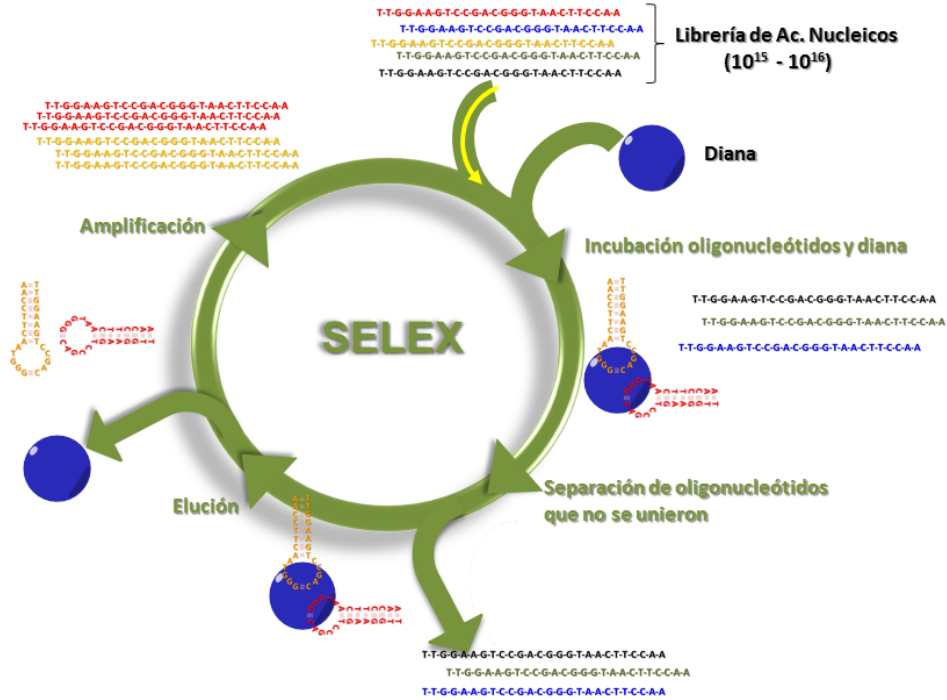


Figura 1.20. Procedimiento SELEX. La figura muestra los principales pasos (incubación, separación, elución y amplificación) para la obtención de aptámeros específicos para una diana particular a partir de una librería de ácidos nucleicos de secuencia aleatoria.

El procedimiento *in vitro* SELEX consiste en ciclos de selección iterativos, enriqueciendo en cada ciclo las moléculas que se unen a una diana determinada. Una gran cantidad de oligonucleótidos sintéticos ( $10^{15} - 10^{16}$  moléculas) son usados como muestra inicial para la selección. Este conjunto de oligonucleótidos tiene una región aleatoria de 30-80 nucleótidos, flanqueada por dos secuencias iniciadoras fijas, necesarias para la amplificación de los oligonucleótidos unidos a la molécula diana. Después de un cierto número de ciclos de selección, durante los cuales la muestra se ha ido enriqueciendo en los oligonucleótidos con mayor afinidad hacia la molécula diana, los aptámeros resultantes pueden ser acortados en un paso adicional para encontrar la secuencia mínima requerida para la unión a la diana específica, la cual usualmente oscila entre los 15 – 60 nucleótidos (Ruigrok, V.J.B., 2011).

El modo de selección y la metodología usada para producir aptámeros, así como todos los ensayos utilizados para la identificación de los potenciales candidatos a aptámeros, dependen en gran medida de la diana de interés. Considerando este hecho, han aparecido varios modos de selección, y cada uno de ellos ha sido diseñado para adecuarse a los requerimientos de un objetivo específico. Una de estas modalidades es la adopción de la selección de aptámeros basada en células, llamada Cell-SELEX. Este término describe el proceso mediante el cual células vivas son usadas para seleccionar aptámeros para el reconocimiento de una diana específica. De esta manera, Cell-SELEX es una estrategia de selección particularmente prometedora para diversas aplicaciones, incluyendo investigación y terapia del cáncer. Por el método Cell-SELEX los oligonucleótidos se unen a moléculas de la superficie extracelular, un hecho importante por las siguientes razones (Sefah, K., 2010): (1) No es necesario un conocimiento previo de la diana. La necesidad de conocer la composición molecular de la superficie de la célula no es importante en Cell-SELEX. Sin embargo, los diferentes tipos de células usadas en el proceso de selección son un parámetro crítico, dado que los aptámeros seleccionados serán utilizados para el reconocimiento específico de las células de interés. (2) Los aptámeros pueden ser generados para muchas dianas. La superficie de la membrana celular es un sistema complejo que tiene un incontable número de moléculas, especialmente proteínas. En Cell-SELEX cada una de estas moléculas es una diana potencial. (3) Los aptámeros se unen a las moléculas diana que se encuentran en estado nativo en la superficie celular y representan por consiguiente tanto sus estructuras plegadas naturales como su distribución, por tanto, el aptámero se unirá a la conformación tridimensional real.

#### Ventajas y desventajas del uso de aptámeros según su aplicación

Al hablar de las ventajas de los aptámeros, generalmente se hace en comparación con los anticuerpos que han sido hasta hoy las herramientas de afinidad usadas con más éxito tanto en investigación básica como aplicada, en áreas como el diagnóstico, purificación y terapia. Una de las características más atractiva de los

aptámeros es su masa molecular reducida, con un tamaño varias veces menor que los anticuerpos (Lee, J.O., 2008) como se muestra en la Figura 1.21. La ventaja de tener elementos de reconocimiento de tamaño reducido, es que permiten su aplicación en sensores de tipo Transistor de Efecto de Campo (Field Effect Transistor, FET). El tamaño de los aptámeros (1 a 2 nm) permite la unión con el analito diana dentro de la longitud de Debye (aproximadamente 3 nm), mientras que para el caso de los anticuerpos (tamaño de aproximadamente 10 nm) hay una alta probabilidad que el evento de reconocimiento ocurra fuera del rango medible. Los sensores FET miden un cambio en el potencial de superficie que ocurre durante la unión entre el analito y el elemento de reconocimiento (Lee, J.O., 2008).

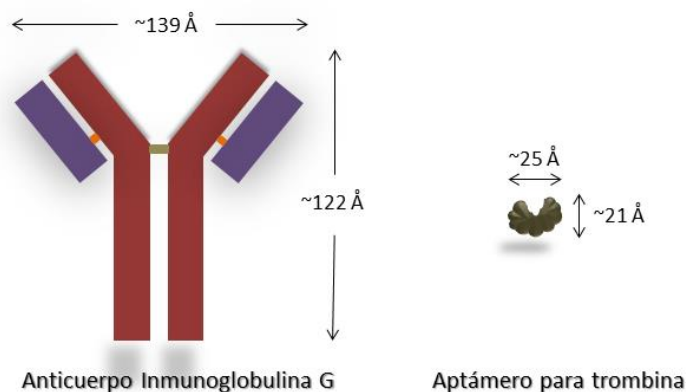


Figura 1.21. Comparación en tamaño de un anticuerpo (IgG) y un aptámero (Antitrombina).

En particular, desde el punto de vista de los biosensores, los aptámeros poseen ventajas muy valiosas comparadas con otros receptores como anticuerpos o enzimas (Song, S., 2008). Los aptámeros con especificidad y alta afinidad (generalmente se ha reconocido que la afinidad de los aptámeros es comparable o aún mayor que la de los anticuerpos, aunque esto no es siempre verdadero) pueden en principio ser seleccionados *in vitro* para cualquier diana, como se mencionó anteriormente, por lo que es posible desarrollar biosensores para un amplio rango de analitos. Los aptámeros, una vez seleccionados, pueden ser sintetizados con alta reproducibilidad y pureza, lo que contribuye a la

reproducibilidad en la preparación y comportamiento de los biosensores basados en aptámeros. En contraste con los anticuerpos y las enzimas, los aptámeros de ADN son usualmente muy estables desde el punto de vista químico y térmico, hecho que contribuye a la robustez de estos biosensores. Los aptámeros a menudo sufren cambios conformacionales cuando se unen a su diana, lo que ofrece gran flexibilidad en el diseño de nuevos biosensores con alta sensibilidad de detección.

A diferencia de los anticuerpos, los aptámeros pueden distinguir dianas aun siendo estas de la misma familia. Por ejemplo, el aptámero contra cafeína tiene una menor afinidad (por un factor de  $10^4$ ) por la teofilina, a pesar que ambos compuestos difieren solamente en un grupo metilo (Zimmermann, G.R., 2000). Dado que los aptámeros son seleccionados en un proceso de selección *in vitro* (SELEX), permiten el desarrollo de biosensores de bajo costo y alta reproducibilidad.

La inmovilización de un elemento de reconocimiento es crucial en el desarrollo de biosensores, y esto es más fácil con aptámeros que con anticuerpos, debido a que la modificación química de ácidos nucleicos es simple y directa comparado con los anticuerpos. Ampliamente aceptado es que las modificaciones en 5' de los oligonucleótidos permiten la inmovilización directa de los aptámeros a soportes sólidos en una orientación controlada, lo cual es una ventaja sobre la inmovilización convencional de los anticuerpos. Estos, la mayoría de las veces se inmovilizan de manera no orientada. La inmovilización orientada de los aptámeros sobre soportes sólidos de manera controlada puede mejorar la eficiencia de la unión a la diana, incrementándose consecuentemente la unión específica. Este hecho se debe a que la funcionalidad de los aptámeros es altamente dependiente de su correcta conformación tridimensional (Song, S., 2014). Sumado a esto, los aptámeros pueden ser fácilmente modificados por varias reacciones químicas para introducir grupos funcionales y/o extensiones de nucleótidos (Kong, H.Y., 2013). Dado que los aptámeros pueden sufrir cambios en su conformación con

variaciones en la temperatura o concentraciones de sal, los sensores basados en aptámeros son potencialmente regenerables.

A pesar de las ventajas comparativas de los aptámeros frente a los anticuerpos, también poseen algunos inconvenientes. Se pueden mencionar, entre otros, los siguientes problemas (Lakhin, A.V., 2013): (1) La rápida degradación de los aptámeros (especialmente los aptámeros de ARN) por nucleasas en medios biológicos, y particularmente en la sangre, es un problema serio que limita sus aplicaciones prácticas. El tiempo medio de degradación de los oligonucleótidos en la sangre va desde los pocos minutos a varias decenas de minutos dependiendo de la concentración del oligonucleótido y la estructura conformacional. Dado que este rango de tiempo no es aceptable para la mayoría de las aplicaciones terapéuticas, se han desarrollado varios métodos para proteger los aptámeros de la degradación por nucleasas, como por ejemplo la modificación de nucleótidos durante su proceso de selección SELEX, con grupos como los siguientes: nucleósido 2'-amino pirimidina, nucleósido 2'-fluoropirimidina, nucleósido 2'-O-metilpurina y nucleósido 2'-O-metilpirimidina. (2) La eliminación de aptámeros desde el flujo sanguíneo vía filtración renal es otro impedimento para aplicaciones terapéuticas. La mayoría de los aptámeros tienen un peso molecular entre los 5 y 15 kDa y pueden ser fácilmente excretados por los riñones, capaces de eliminar sustancias con pesos moleculares inferiores a 30 – 50 kDa. La conjugación de aptámeros con polietilenglicol (PEG) es la solución más común a este problema. (3) Los aptámeros que reconocen una diana particular también se pueden unir a moléculas con estructura similar. Esta reactividad cruzada puede ser un obstáculo para aplicaciones terapéuticas, de detección de analitos, purificación de moléculas, etc. Este problema se puede evitar introduciendo un paso de selección negativa en el procedimiento SELEX utilizando moléculas estructuralmente similares.

## Aplicaciones de los aptámeros

Los aptámeros se han utilizado en una variedad muy amplia de aplicaciones, tanto en investigación básica como en el diagnóstico y terapia de enfermedades. Este hecho se ha visto reflejado en el gran número de publicaciones científicas directamente relacionadas a aptámeros de ADN y ARN reportadas desde su descubrimiento en 1990 hasta el año 2016: aproximadamente 17600 artículos, con una media de 650 artículos por año (Zon, J., 2013; Iliuk, A.B., 2011; Ku, T.H., 2015). Para conocer el número de artículos registrados los últimos años se recurrió a la base de datos Web of Science. La versatilidad de esta tecnología está reflejada en el hecho de que hay pocas áreas de investigación en las cuales los aptámeros no puedan ser aplicados (Bunka, D.H.J., 2006). La amplia gama de aplicaciones se puede dividir en cuatro grandes categorías (Figura 1.22).

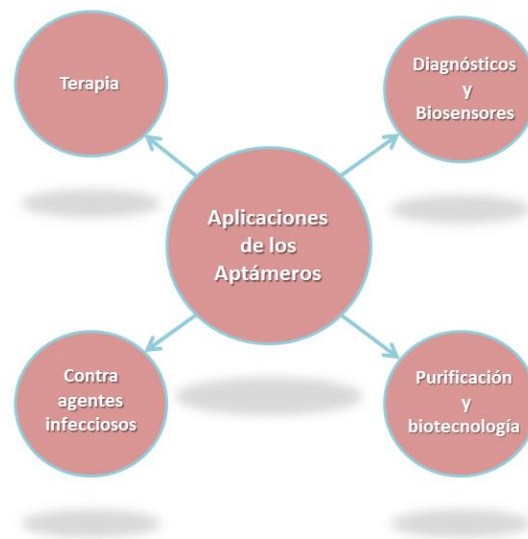


Figura 1.22. Principales áreas de aplicación de los aptámeros.

### Terapia

Los aptámeros tienen un enorme potencial como reactivos de diagnóstico. Las dianas terapéuticas potenciales se pueden dividir en dianas extracelulares e intracelulares. Los aptámeros contra dianas extracelulares pueden ser

administrados por vía subcutánea, rápidamente distribuidos a través del cuerpo y fácilmente absorbidos por las células como lo confirma el estudio realizado por Sandberg y colaboradores (Sandberg, J.A., 2000). La liberación de aptámeros a puntos anatómicos específicos es una realidad tanto en el uso clínico como en aplicaciones tópicas, por ejemplo la prevención en la interacción de patógenos con receptores en la superficie de la mucosa. La liberación de aptámeros a dianas intracelulares se ha llevado mayoritariamente a cabo mediante su incorporación en liposomas o en sistemas de vectores basados en virus (Bunka, D.H.J., 2006).

### Purificación y biotecnología

Uno de los usos más obvios es como medio de purificación por afinidad, dado que son moléculas específicas, tienen una alta afinidad y se pueden regenerar; de esta manera los aptámeros tienen la capacidad de discriminar ligandos estrechamente relacionados. La capacidad discriminatoria de los aptámeros fue demostrada con la purificación de D-arginina-vasopresina (constante de disociación ( $K_d = 1\mu\text{M}$ )) en presencia de su L-enantiómero, con el cual no se observó unión del aptámero (Michaud, M., 2003). Los aptámeros se pueden utilizar para monitorear el estado de fosforilación de proteínas, dando información relacionada a la actividad temporal de las proteínas en una cascada de señales y pasos bioquímicos. Un ejemplo de esta aplicación es el aptámero de ARN que reconoce e inhibe las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, Mitogen-Activated Protein Kinases) (Seiwert, S.D., 2000).

### Contra agentes infecciosos

Los aptámeros también tienen el potencial de ser usados como elementos anti-infecciosos. Los ARNs pueden funcionar como antibióticos si son seleccionados para inhibir proteínas bacterianas clave o para interrumpir la formación de la



membrana celular (Bunka, D.H.J., 2006). Por otro lado, dos ejemplos de interés respecto al uso de aptámeros en este sentido son el uso de estos como inhibidores de las infecciones virales crónicas HIV (Held, D.M., 2006) y la hepatitis C (Bellecave, P., 2003).

## Reactivos de diagnóstico y biosensores

La alta afinidad y especificidad de los aptámeros hacen que éstos sean unos reactivos de diagnóstico ideales. La mayoría de las aplicaciones de diagnóstico de los aptámeros se sustentan en los cambios conformacionales inducidos por los ligandos. Estos cambios pueden ser detectados por desactivación de fluorescencia (quenching) u otros mecanismos. En concreto, los llamados “aptámeros beacon” (aptámeros balizas) han demostrado su utilidad con una amplia gama de aplicaciones, que van desde la detección de contaminantes ambientales, monitoreo de carcinógenos, cuantificación de niveles de drogas en sangre (Bunka, D.H.J., 2006) o reconocimiento de proteínas (Li, J.J., 2002), hasta la detección de patógenos bacterianos (Rai, V., 2012; Bruno, J.G., 2012). El diseño de aptasensores es otra de las aplicaciones en las que se pueden encontrar numerosas publicaciones dedicadas a la detección de una gran variedad de dianas, desde moléculas pequeñas como ATP (Huang, H., 2010), adenosina (Wang, J., 2009), cocaína (Hua, M., 2010) o proteínas (Dua, P., 2011), hasta células completas (Ye, M., 2012; Iliuk, A.B., 2011; Kong, R.M., 2011; Song, K.M., 2012; Han, K., 2010; O’Donoghue, M.B., 2012; Medley, C.D., 2011).

De los antecedentes recopilados y expuestos en esta introducción respecto a la detección de enteropatógenos se plantean en el siguiente apartado, el objetivo general y los objetivos específicos de esta tesis.

## 1.4. Objetivos de la tesis

### 1.4.1. Objetivo general

Desarrollar un dispositivo biosensor capaz de detectar bacterias enteropatógenas usando aptámeros como elemento de reconocimiento.

### 1.4.2. Objetivos específicos

Primero. Realizar una búsqueda de los sistemas rápidos de detección e identificación de bacterias patógenas existentes en el mercado.

Segundo. Realizar una búsqueda de las investigaciones en los últimos cinco años respecto al desarrollo de sistemas para la detección de bacterias, utilizando aptámeros como elemento de reconocimiento.

Tercero. Caracterización de bacterias para: (1) Verificar la pertenencia de las bacterias a detectar (*S. typhimurium* y *E. coli* O157 Shiga) a los géneros *Salmonella* y *Escherichia* respectivamente. (2) Verificar la existencia de las proteínas de membrana: transportador ABC, OmpA y precursor OmpD en *S. typhimurium*. Estas proteínas corresponden a los sitios específicos a los que se unen los aptámeros previamente seleccionados. (3) Determinar la carga neta de las bacterias en las condiciones de experimentación.

Cuarto. Caracterizar la unión de los aptámeros a *S. typhimurium* por medio de microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía de fluorescencia.

Quinto. Optimizar las condiciones de trabajo desde el punto de vista de los parámetros físico-químicos y de procedimientos para poder optimizar posteriormente la respuesta de los biosensores diseñados.

Sexto. Estudiar la respuesta de los biosensores diseñados utilizando tres de las bacterias enteropatógenas más relevantes desde el punto de vista de las enfermedades transmitidas por alimentos, como son *E. coli* O157 Shiga, *S. typhimurium* y *Shigella sonnei*.

Séptimo. Estudiar la selectividad de los biosensores diseñados utilizando cuatro bacterias pertenecientes a diferentes familias, incluyendo la familia de las Enterobacteriaceae: *E. coli* k5, de la familia Enterobacteriaceae, no patógena; *Proteus mirabilis* de la familia Enterobacteriaceae, patógena a nivel de sistema urinario; *Bacillus cereus*, de la familia Bacillaceae, patógena en menor grado a nivel de sistema digestivo; *Kocuria lutea*, de la familia Micrococcaceae, patógeno oportunista.

Octavo. Comparar la respuesta colorimétrica y electroquímica para un mismo ensayo, basado en el uso de aptámeros.

Noveno. Comparar el comportamiento de los diferentes biosensores electroquímicos diseñados.

## 1.5. Referencias

Abbaspou, B.; Norouz-Sarvestani, F.; Noori, A. and Soltani, N. **Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of staphylococcus aureus.** Biosens. Bioelectron 2015; 68: 149.

Bard, A.J. and Faulkner, L.R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications** 1980; Vol. 2. Wiley New York

Baylis, C.; Uyttendaele, M.; Joosten, H. and Davies, A. **The enterobacteriaceae and their significance to the food industry..** Report Commissioned by the ILSI Europe Emerging Microbiological Issues Task Force. December, 2011.

Bellecave, P.; Andreola, M.L.; Ventura, M.; Tarrago-Litvak, L.; Litvak, S. and Astier-Gin, T. **Selection of DNA aptamers that bind the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus and inhibit viral RNA synthesis in vitro.** Oligonucleotides 2003; 13: 455.

Bond, A.A.M. and Scholz, F. **Electroanalytical methods: guide to experiments and applications** 2010: Springer

Brands, D. A. **Salmonella.** Deadly diseases and epidemics. 2006.

Brenner, D.J. and Farmer, J.J. **Family I Enterobacteriaceae.** In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2005: 587-607.

Bruno, J.G. and Carrillo, M.P. **Development of Aptamer Beacons for Rapid Presumptive Detection of Bacillus Spores.** J Fluoresc. 2012; 22: 915.

Bunka, D.H.J. **Aptamers come of age – at last.** Nat rev microbiol. 2006; 4: 589.

Chakraborty, S. and Newton, A. C. **Climate change, plant diseases and food security: an Overview**. Plant Pathol. J. 2011; 60: 2.

Chambers, J. P. **Biosensor Recognition Elements**. Curr. Issues Mol. Biol. 2008; 10: 1.

Collings, A. and Caruso, F. **Biosensors: recent advances**. Rep Prog Phys. 1997; 60: 1397.

Compton, R.G. and Banks, C.E. **Understanding voltammetry**. 2007: World Scientific.

Compton, R.G. **Understanding Voltammetry**. 2011, Vol. 2., London: Imperial College Press. 429.

Doessing, H. and Vester, B. **Locked and Unlocked Nucleosides in Functional Nucleic Acids**. Molecules 2011; 16: 4511.

Dua P.; Kim S. and Lee D. **Nucleic acid aptamers targeting cell-surface proteins**. Methods. 2011; 54: 215.

Duan, N.; Wu, S.; Zhu, C.; Ma, X.; Wang, Z.; Yu, Y. and Jiang Y. **Dual-color upconversion fluorescence and aptamer-functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the simultaneous detection of Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus**. Anal Chim Acta. 2012; 723: 1.

Duan, N.; Ding, X.; Wu, S.; Xia, Y.; Ma, X.; Wang, Z. and Chen, J. **In vitro selection of a DNA aptamer targeted against Shigella dysenteriae**. J Microbiol Meth. 2013; 94: 170.

Duan, N.; Wu, S.; Chen, X.; Huang, Y.; Xia, Y.; Ma, X. and Wang, Z. **Selection and characterization of aptamers against salmonella typhimurium using whole-bacterium systemic evolution of Ligands by exponential enrichment (SELEX).** J Agr Food Chem. 2013; 61: 3229.

Dwivedi, H.P.; Smiley, R.D. and Jaykus, L.A. **Selection of DNA aptamers for capture and detection of Salmonella Typhimurium using a whole-cell SELEX approach in conjunction with cell sorting.** Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97: 3677.

Eggins, B. R. **Chemical Sensors and Biosensors.** Analytical Techniques in the Sciences (AnTS) John Wiley & Sons, West Sussex, England, 2002.

Ellington A.D. and Szostak J.W. **In Vitro Selection of RNA Molecules that Bind Specific Ligands.** Nature. 1990; 346: 818.

Fang, Z.; Wu, W.; Lu, X, and Zeng, L. **Lateral flow biosensor for DNA extraction-free detection of salmonella based on aptamer mediated strand displacement amplification.** Biosens Bioelectron. 2014; 56: 192.

Frost,L.A. and Sullivan,D.L. **Developments in medical sensors - Opportunities for biosensors in medical diagnosis and drug discovery/therapeutics (technical insights),**  
[http://www.reseacrhandmarkets.com/reports/developmentsmedical\\_sensors.htm](http://www.reseacrhandmarkets.com/reports/developmentsmedical_sensors.htm).  
[2010.](#)

Fukushima, M.; Kakinuma, K., and Kawaguchi, R. **Phylogenetic Analysis of Salmonella, Shigella, and Escherichia coli Strains on the Basis of the gyrB Gene Sequence.** J clin microbiol. 2002; 40: 2779.

Gambari, R. **Peptide nucleic acids: a review on recent patents and technology transfer**. Expert Opin. Ther. Patents. 2014; 24: 3.

Geenen, F. **Characterization of Organic Coatings with Impedance Measurements; A study of Coating Structure, Adhesion and Underfilm Corrosion**. 1990, Ph-D thesis, TU-Delft.

González, I.; Martín, R.; García, T.; Morales, P.; Sanz, B. and Hernández, P. E. **Polyclonal antibodies against live cells of Pseudomonas fluorescens for the detection of psychrotrophic bacteria in refrigerated meat using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay**. J Dairy Sci. 1994; 77: 3552.

Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Voro,s J. and Reimhult, E. **Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures**. Sensors. 2008; 8: 1400.

Han, K.; Liang, Z. and Zhou, N. **Design Strategies for Aptamer-Based Biosensors**. Sensors. 2010; 10: 4541.

Held, D.M.; Kissel, J.D.; Patterson, J.T.; Nickens, D.G. and Burke, D.H. **HIV-1 inactivation by nucleic acid aptamers**. Front. Biosci. 2006; 11: 89.

Hernandez, R.; Valles, C.; Benito, A.M.; Maser, W.K.; Rius, F.X. and Riu, J.. **Graphene-based potentiometric biosensor or the immediate detection of living bacteria**. Biosens Bioelectron. 2014; 54: 553.

Hilbert, F.; Smulders, F.J.M.; Chopra-Dewasthaly, R. and Paulsen P. **Salmonella in the wildlife-human interface**. Food Res Int. 2012; 45: 603.

Hoffmann, S. and Tobenna, D. A. **Making Sense of Recent Cost-of-Foodborne-Illness Estimates**. EIB-118, U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service, September 2013.

Hua, M.; Tao, M.; Wang, P.; Zhang, Y.; Wu, Z.; Chang, Y. and Yang, Y. **Label-free Electrochemical Cocaine Aptasensor Based on a Target-inducing Aptamer Switching Conformation.** Anal Sci. 2010; 26: 1265.

Huang, H. ; Tan, Y. ; Shi, J. ; Lianga, G. and Zhu, J.J. **DNA aptasensor for the detection of ATP based on quantum dots electrochemiluminescence.** Nanoscale. 2010; 2: 606.

Hyeon, J.Y.; Chon, J.W.; Choi, I.S.; Park, C.; Kim, D.E. and Seo, K.H. **Development of RNA aptamers for detection of Salmonella Enteritidis.** J Microbiol Meth.. 2012; 89: 79.

Iliuk, A.B.; Hu, L.; and Tao, W.A. **Aptamer in Bioanalytical Applications.** Anal. Chem. 2011; 83: 4440.

James, W. **Aptamers.** Encyclopedia of Analytical Chemistry. R.A. Meyers (Ed.). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 2000. p. 4848.

Jia, F.; Duan, N.; Wu, S.; Ma, X.; Xia,Y.; Wang, Z. and Wei, X. **Impedimetric aptasensor for Staphylococcus aureus based on nanocomposite prepared from reduced graphene oxide and gold nanoparticles.** Microchim Acta. 2014; 81: 967.

Joshi, R.; Janagama, H.; Dwivedi, H. P.; Senthil Kumar, T.M.A. ; Jaykus, L.A.; Schefers, J. and Sreevatsan, S. **Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of Salmonella enterica serovars.** Mol Cell Probe. 2009; 23: 20.



Jyoti, A.; Vajpayee P.; Singh, G.; Bali Patel, C.; Chand Gupta, K. and Shanker, R. **Identification of Environmental Reservoirs of Nontyphoidal Salmonellosis: Aptamer-Assisted Bioconcentration and Subsequent Detection of Salmonella Typhimurium by Quantitative Polymerase Chain Reaction.** Environ. Sci. Technol. 2011; 45: 8996

Kissinger, P. T. **Electrochemistry for the Non-Electrochemist.** Curr Sep. 2002; 20: 2.

Kong, H.Y. and Byun, J. **Nucleic Acid Aptamers: New Methods for Selection, Stabilization, and Application in Biomedical Science.** Biomol Ther. 2013; 21: 423.

Kong, R.M.; Zhang X.B.; Chen, Z. and Tan, W. **Aptamer-Assembled Nanomaterials for Biosensing and Biomedical Applications.** Small. 2011; 7: 2428.

Ku, T.H.; Zhang, T.; Luo, H.; Yen, T.M.; Chen, P.W.; Han, Y. and Lo, Y.H. **Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing.** Sensors. 2015; 15: 16281.

Labib, M.; Zamay, A.S.; Kolovskaya, O.S.; Reshetneva, I.T.; Zamay, G.S.; Kibbee, R.J.; Sattar, S.A.; Zamay, T.N. and Berezovski, M.V. **Aptamer-Based Viability Impedimetric Sensor for Bacteria.** Anal. Chem. 2012; 84: 8966.

Lakhin, A.V.; Tarantul, V.Z. and Gening, L.V. **Aptamers: Problems, Solutions and Prospects.** Acta naturae. 2013; 5: 34.

Lazcka, O.; Del Campo, F.J. and Muñoz, F.X. **Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors.** Biosens Bioelectron. 2007; 22: 1206.

Lee, H.J.; Kim, B.C.; Kim, K.W.; Kim, Y.K.; Kim, J. and Oh, M.K. **A sensitive method to detect Escherichia coli based on immunomagnetic separation and real-time PCR amplification of aptamers.** Biosens Bioelectron. 2009; 24: 3550.

Lee, J.O. **Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors.** Anal Bioanal Chem. 2008; 390: 1023.

Li, H.; Ding, X.; Peng, Z.; Deng, L.; Wang, D.; Chen, H. and He Q. **Aptamer selection for the detection of Escherichia coli K88.** Can. J. Microbiol. 2011; 57: 453.

Li, J.J.; Fang, X. and Tan, W. **Molecular Aptamer Beacons for Real-Time Protein Recognition.** Biochem Bioph Res Co. 2002; 292: 31.

Lipman, N.S.; Jackson, L.R.; Trudel, L.J. and Weis-Garcia, F. **Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources.** ILAR Journal 2005; 46: 258.

Liu, G.; Yu, X.; Xue, F.; Chen, W.; Ye, Y.; Yang, X.; Lian, Y.; Yan, Y. and Zong, K. **Screening and preliminary application of a DNA aptamer for rapid detection of Salmonella O8.** Microchim Acta. 2012; 178: 237.

Lowe, R.S. **Overview of biosensor and bioarray technologies.** Handbook of Biosensors and Biochips. 2007; 1: 7.

Luo, C. ; Lei, Y. ; Yan, L. ; Yu, T. ; Li, Q. ; Zhang, D. ; Ding, S. ; Ju, H. **A Rapid and Sensitive Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Direct Detection of Escherichia Coli O111.** Electroanal. 2012; 24: 1186.

Luong J.H.T, Male K. B., Glennon J. D. **Biosensor technology: Technology push versus market pull.** Biotechnol Adv. 2008; 26: 492.

Maccini, M. **A brief story of biosensor technology. Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevice.** 2006. Edited by Maria Teresa Giardi and Elena V. Piletska. Landes Bioscience

Maeng, J.S.; Kim, N. ; Kim, C.T. ; Han, S.R. ; Lee, Y.J. ; Lee, S.W. ; Lee, M.H. and Cho, Y.J. **Rapid Detection of Food Pathogens Using RNA Aptamers-Immobilized Slide.** J. Nanosci. Nanotechnol. 2012; 12: 5138.

Martín de Santos, R. **Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos.** Monografía XXXI: Aspectos higiénicos de los alimentos microbiológicamente seguros. 2010; 2.

Medley, C.D.; Bamrungsap, S.; Tan, W.; Smith, J.E. **Aptamer-Conjugated Nanoparticles for Cancer Cell Detection.** Anal. Chem. 2011; 83: 727.

Meseguer Lloret, S. **Métodos quimioluminiscentes en química analítica.** 2004, Tesis doctoral. Universitat de Valencia.

Michaud, M.; Jourdan, E. ; Villet, A. ; Ravel, A. ; Grosset, C. and Peyrin, E. **A DNA aptamer as a new target specific chiral selector for HPLC.** J. Am. Chem. Soc. 2003; 125: 8672.

Nagel, B.; Dellweg, H. and Gierasch, L. M. **Glossary for chemist of terms used in biotechnology.** . Pure Appl. Chem. 1992; 64: 143.

Nyachuba, D. G. **Foodborne illness: is it on the rise?.** Nutr Rev. 2010; 68: 257.

O'Donoghue, M. B.; Shi, X.; Fang, X. and Tan, W. **Single-molecule atomic force microscopy on live cells compares aptamer and antibody rupture forces.** Anal Bioanal Chem. 2012; 402: 3205.

Ohk, S.H.; Koo, O.K.; Sen, T.; Yamamoto C.M. and Bhunia, A.K. **Antibody-aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of *Listeria monocytogenes* from food.** J Appl Microbiol. 2010; 109: 808.

Park, H.C.; Baig, I.A.; Lee, S.C.; Moon, J.Y. and Yoon, M.Y. **Development of ssDNA Aptamers for the Sensitive Detection of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*.** Appl Biochem Biotechnol. 2014; 174: 793.

Pejcic, B. and De Marco, R. **Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization.** Electrochim Acta. 2006.; 51: 6217.

Pohanka, M. and Skladal, P. **Electrochemical biosensors—principles and applications.** J Appl Biomed. 2008; 6: 57.

Puerta-García A. y Mateos-Rodríguez F. **Enterobacterias.** Medicine. 2010; 10: 3426.

Pupo, G.M. **Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics.** PNAS. 2000; 97:10569.

Rai, V.; Nyine, Y.T.; Hapuarachchi, H.C.; Yap, H.M.; Ng, L.C. and Toh C.S. **Electrochemically amplified molecular beacon biosensor for ultrasensitive DNA sequence-specific detection of *Legionella sp.*** Biosens Bioelectron. 2012; 32: 133.

Reichert, J. M. **Monoclonal antibodies as innovative therapeutics.** Curr. Pharm. Biotechnol. 2008; 9: 423.

Robertson, D.L. and Joyce G.F. **Selection in Vitro of an RNA Enzyme that Specifically Cleaves Single-stranded DNA.** Nature. 1990; 344: 467.

Ronkainen, N.J. **Electrochemical biosensors**. Chem. Soc. Rev. 2010; 39: 1747.  
Ruigrok, V. J. B. **Alternative affinity tools: more attractive than antibodies?** Biochem. J. 2011; 436: 1.

Ruigrok, V.J.B.; Levisson, M.; Hekelaar, J.; Smidt, H.; Dijkstra, B.W. and van der Oost, J. **Characterization of Aptamer-Protein Complexes by X-ray Crystallography and Alternative Approaches**. Int. J. Mol. Sci. 2012; 13: 10537.

Sandberg, J.A.; Parker, V.P.; Blanchard, K.S.; Sweedler, D.; Powell, J.A.; Kachensky, A.; Bellon, L.; Usman, N.; Rossing, T.; Borden, E. and Blatt, L.M. **Pharmacokinetics and tolerability of an antiangiogenic ribozyme (Angiozyme) in healthy volunteers**. J. Clin. Pharmacol. 2000; 40: 1462.

Sarrionandia, M.A.E.; Herrera León, S. and Simón Baamonde, C. **Gastroenteritis invasivas, ¿algo nuevo?**. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2011; 29: 55.

Scharff, R. L. **Economic Burden from Health Losses Due to Foodborne Illness in the United States**. J. Food Protect. 2012; 75: 123.

Sefah, K. **Development of DNA aptamers using Cell-SELEX**. Nat. Protoc. 2010; 5: 1169.

Seiwert, S.D.; Nahreini, T.S.; Aigner, S.; Ahn, N.G. and Uhlenbeck, O.C. **RNA aptamers as pathway-specific MAP kinase inhibitors**. Chem. Biol. 2000; 7: 833.

Singh, G.; Vajpayee, P.; Rani, N.; Jyoti, A.; Gupta, K.C. and Shanker, R. **Bio-capture of S. Typhimurium from surface water by aptamer for culture-free quantification**. Ecotox Environ Safe. 2012; 78: 320.

Smuc, T.; Il-Young, A. and Henning, U. **Nucleic acid aptamers as high affinity ligands in biotechnology and biosensorics.** J Pharmaceut Biomed. 2013; 81: 210.

Song, K.M.; Lee, S. and Ban, C. **Aptamers and Their Biological Applications.** Sensors. 2012; 12: 612.

Song, S.; Cho, Y.S.; Lee, S.J. and Hah, S.S. **Aptamer-Based Precipitation as an Alternative to the Conventional Immunoprecipitation for Purification of Target Proteins.** Bull. Korean Chem. Soc. 2014; 35: 2665.

Song, S.; Wang, L.; Li, J.; Zhao, J. and Fan, C. **Aptamer-based biosensors.** Trends Analyt Chem. 2008; 27: 108.

Souza dos Reis, R. and Horn F. **Enteropathogenic Escherichia coli, Samonella, Shigella and Yersinia: cellular aspects of hostbacteria interactions in enteric diseases.** Gut. Pathog. 2010; 2: 8.

Sumedha, D.J. **Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics.** Clin. Chem. 1999; 45: 1628.

Swaminathan, B.; Barrett, T.J. and Fields, P. **Surveillance for human Salmonella infections in the United States.** J. AOAC Int. 2006; 89: 553.

Tauxe, R.V. and Pavia, A.T. **Salmonellosis: nontyphoidal. In Bacterial infections of humans: epidemiology and control.** Edited by: Evans A, Brachman P. New York: Plenum 1998:613-628.

Theavenot, D.R.; Toth K., Durst R.A. and Wilson G.S. **Electrochemical biosensors: Recomendad definitios and classification.** Pure Appl. Chem. 2001;71.

Tuerk C. and Gold L. **Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase.** Science. 1990; 249: 505.

Turner, A.P.F. **Biosensors: sense and sensibility.** Chem. Soc. Rev. 2013; 42: 3184.

Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G.S. **Biosensors, fundamentals and applications.** Oxford University Press, 1987.

Wang, J. **Analytical Electrochemistry.** John Wiley & Sons VCH, Hoboken, New Jersey, USA, 2006.

Wang, J.; Wang, F. and Dong, S. **Methylene blue as an indicator for sensitive electrochemical detection of adenosine based on aptamer switch.** J Electroanal Chemi. 2009; 626: 1.

Welch, R.A. **The Genus Escherichia.** Prokaryotes. 2006; 6: 60.

Wells, J.M. and Bennik, M.H.J. **Genomics of food-borne bacterial pathogens.** Nutr. Res. Rev. 2003; 16: 21.

Wu, W.; Zhang, J.; Zheng, M.; Zhong, Y.; Yang, J.; Zhao, Y.; Wu, W.; Ye, W.; Wen, J ; Wang, Q. and Lu, J. **An Aptamer-Based Biosensor for Colorimetric Detection of Escherichia coli O157:H7.** PloS ONE. 2012; 7: 1.

Wu, W.; Zhang, J.; Zheng, M.; Zhong, Y.; Yang, J.; Zhao, Y.; Wu, W.; Ye, W.; Wen, J.; Wang, Q. and Lu, J. **An Aptamer-Based Biosensor for Colorimetric Detection of Escherichia coli O157:H7.** PloS ONE 2012; 7: 1.

Wu, W.H.; Li, M.; Wang, Y.; Ouyang, H.X.; Wang, L.; Li, C.X.; Cao, Y.C.; Meng, Q.H. and Lu J.X. **Aptasensors for rapid detection of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium.** *Nanoscale Res. Lett.* 2012; 7: 658.

Ye, M.; Hu, J ; Peng, M.; Liu, J.; Liu, J.; Liu, H.; Zhao, X. and Tan, W. **Generating Aptamers by Cell-SELEX for Applications in Molecular Medicine.** *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 3341.

Zelada-Guillen, G.A.; Sebastian-Avila, J.L.; Blondeau, P.; Riu, J. and Rius, F.X. **Label-free detection of Staphylococcus aureus in skin using real-time potentiometric biosensors based on carbon nanotubes and aptamers.** *Biosens Bioelectron.* 2012; 31: 226.

Zelada-Guillen, G.A.; Bhosale, S.V.; Riu, J. and Rius, F.X. **Real-Time Potentiometric Detection of Bacteria in Complex Samples.** *Anal Chem.* 2010; 82: 9254.

Zhang, L.L. and Zhao, X.S. **Carbon-based materials as supercapacitor electrodes.** *Chem. Soc. Rev.* 2009; 38: 2520.

Zimmermann, G.R.; Wick, C.L.; Shield, T.P.; Jenison, R.D. and Pardi, A. **Molecular interactions and metal binding in the theophylline-binding core of an RNA aptamer.** *RNA.* 2000; 6: 659.

Zon, J. <http://zon.trilinkbiotech.com/2013/11/04/aptamers-chemistry-bests-mother-natures-antibodies/>. 2013.

Zoski, C.G. **Handbook of Electrochemistry.** 2007. Elsevier



***CAPÍTULO 2. Estado del arte de la detección de bacterias  
mediante el uso de aptámeros como elemento de  
reconocimiento***

## **Capítulo 2. Estado del arte de la detección de bacterias mediante el uso de aptámeros como elemento de reconocimiento.**

### **2.1. Introducción**

Los trabajos publicados sobre la selección y/o utilización de aptámeros como elementos de reconocimiento en métodos de análisis para la detección de bacterias son limitados. Estos están centrados mayoritariamente en las bacterias pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae*, debido a la importancia de este grupo de bacterias en las enfermedades transmitidas por los alimentos contaminados.

En este capítulo hemos recopilado la mayor información posible respecto a sistemas de detección de bacterias diseñados con aptámeros como elemento de reconocimiento. Se han separado los trabajos científicos a nivel de géneros, presentándose en primer lugar *Salmonella*, *Escherichia* y *Shigella*, dentro de los cuales se encuentran los enteropatógenos más relevantes. También se presentan los trabajos relacionados a los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus* y *Campylobacter*.

Dentro de estos trabajos científicos también aparecen microorganismos de los géneros *Vibrio*, *Lactobacillus* y *Pseudomona* como elementos a ser detectados. Estas bacterias aparecen en sistemas de detección múltiple, especialmente en los trabajos relacionados con *Salmonella* y *Escherichia*.

Muchos han sido los intentos por desarrollar sistemas de detección que permitan alertar tempranamente sobre la presencia de microorganismos patógenos en diferentes medios. Por lo mismo la variedad de estos sistemas, que se pueden encontrar tanto en la literatura como en el mercado, es muy amplia. Como se observa en algunos apartados del capítulo 1 y a lo largo de este capítulo 2 se pueden encontrar una serie de elementos muy diversos que componen estos

sistemas de detección, como diferentes tipos de elementos de reconocimiento, diversos tipos de transductores, nanomateriales, etc. Dentro de los métodos de detección rápida, como se muestra en la Figura 1.5 del capítulo 1, están los biosensores y dentro de este grupo, los biosensores electroquímicos, que es el objetivo final a desarrollar en esta tesis doctoral.

Como se verá a lo largo de este capítulo no todos los sistemas planteados corresponden a un biosensor. Sin embargo a través de estos trabajos científicos podremos encontrar una variedad de estrategias de detección en donde, por un lado todos utilizan aptámeros como elemento de reconocimiento, y por otro lado todos buscan, de alguna manera, mejorar los sistemas de detección. Esta mejora está principalmente focalizada en incrementar la sensibilidad del sistema, bajar los límites de detección y disminuir los tiempos de análisis.

Los nanomateriales, como las nanopartículas de oro, puntos de carbono, puntos cuánticos, nanotubos de carbono, nanopartículas magnéticas, grafeno, nanopartículas de conversión ascendente y otros, son uno de los elementos utilizados con frecuencia en los trabajos mostrados en el presente capítulo. La finalidad es mejorar los parámetros de comportamiento de los sistemas de detección. Los nanomateriales son y serán prominentes candidatos a considerar en el diseño y construcción de sistemas de detección debido a la posibilidad de inmovilizar una cantidad optimizada de unidades de bioreceptor en un volumen reducido y actuar, además, como elemento de transducción (Holzinger, M., 2014).

## **2.2. Detección de bacterias del género *Salmonella***

Unas de las bacterias más utilizadas como objetivo a ser detectadas, son aquellas pertenecientes al género *Salmonella*. En general, la razón de este interés por desarrollar sistemas de detección simples para estos patógenos es porque *Salmonella* se encuentra dentro de los 10 patógenos que más inciden en la salud

de la población mundial. Este grupo de bacterias ocasiona un gran número de enfermedades y muertes que generan altos costos (Batz, M.B., 2011).

### 2.2.1. Detección por PCR

Uno de los primeros trabajos orientados a la utilización de aptámeros como elementos de reconocimiento de *S. typhimurium* fue el desarrollado por Joshi y colaboradores en el cual se seleccionaron 5 aptámeros de ADN (Joshi, R., 2009). Estos aptámeros fueron seleccionados en contra de 3 proteínas de la membrana externa de la bacteria: precursor OmpD, OmpA y transportador ABC. En un trabajo posterior (Book, B., 2011) se determinaron las constantes  $K_D$  de dos de estos aptámeros, obteniéndose valores de 0.1285 y 0.3772 nM. En el trabajo realizado por Joshi, uno de los aptámeros se marcó con biotina y fue acoplado sobre partículas magnéticas conjugadas con estreptavidina. Usando esta plataforma se capturó la bacteria y se realizó la detección mediante la extracción de su ADN, y posterior amplificación por medio de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa con la transcriptasa inversa RT-PCR. El LOD obtenido en este trabajo estuvo en el rango  $10 - 10^2$  CFU/mL. En un desarrollo posterior se utilizó la misma estrategia, utilizando un aptámero seleccionado mediante Cell-SELEX con una  $K_D$  de 1.73  $\mu$ M. El LOD alcanzado en la detección de *S. typhimurium* con la PCR cuantitativa (qPCR) estuvo en el rango  $3.4 \times 10^2 - 3.4 \times 10^3$  CFU/mL (Dwivedi, H.P., 2013).

En una aplicación del trabajo realizado por Joshi (Joshi, R., 2009), se utilizó uno de los aptámeros seleccionados para detectar la presencia de *S. typhimurium* (Figura 2.1). El sistema basado en partículas magnéticas modificadas con el aptámero se utilizó para la captura de la bacteria en muestras de agua. A continuación, se extrajo el ADN de la bacteria y se realizó la hibridación con una baliza molecular diseñada para el gen *ttr*. La hibridación produce la separación del fluoróforo y el quencher, generando fluorescencia. Finalmente la cuantificación se realizó por la técnica qPCR, lográndose un LOD de 100 CFU/mL (Jyoti, A., 2011).

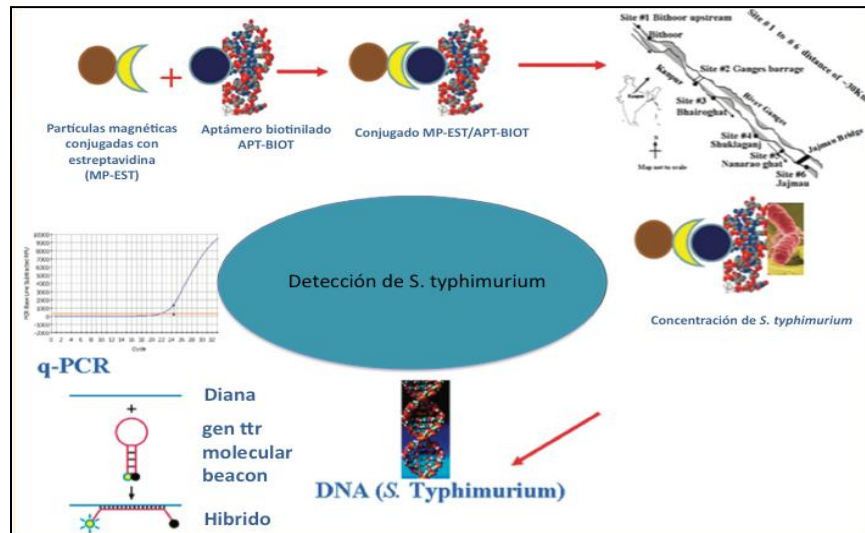


Figura 2.1. Detección de *S. typhimurium* mediante qPCR, después de capturar la bacteria con partículas magnéticas en una muestra de agua (Jyoti, A., 2011).

El mismo LOD se alcanzó en un trabajo realizado por el mismo grupo, utilizando la misma estrategia para la captura y detección de *S. typhimurium* en muestras de agua contaminadas (Singh, G., 2012). La diferencia con el trabajo anterior del grupo estuvo en el diseño de la baliza molecular, que en este caso se desarrolló para la hibridación con el gen *invA*.

En un desarrollo alternativo en cuanto al número de aptámeros empleados en una estrategia de detección, se utilizaron dos aptámeros de ADN con afinidad para diferentes proteínas de la membrana externa de *S. enteritidis*. Esta bacteria es la causa de la salmonelosis pandémica en humanos a través de los alimentos contaminados, en parte debido a que tiene la capacidad única de contaminar los huevos sin causar una enfermedad observable en las aves infectadas (Guard-Petter, J., 2001). Uno de los aptámeros se biotiniló para permitir su inmovilización sobre partículas magnéticas modificadas con estreptavidina. Las partículas modificadas con el aptámero se utilizaron para capturar la bacteria. El segundo aptámero (sin modificar) se utilizó para la detección, sirviendo de plantilla para su amplificación (Figura 2.2). La hebra simple de ADN amplificada se detectó en un

biosensor de flujo lateral, lográndose un LOD de 10 CFU/mL y un rango de detección lineal de  $10 - 10^6$  CFU/mL (Fang, Z., 2014).

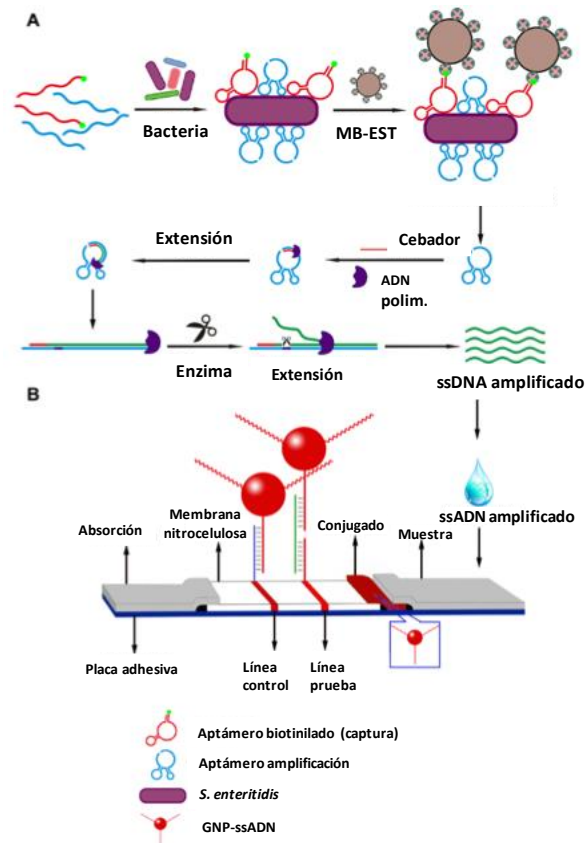


Figura 2.2. Esquema de la detección basada en aptámeros. (A) Descripción esquemática del enriquecimiento magnético de la bacteria y la amplificación por desplazamiento de la hebra del aptámero. Las bacterias primero se mezclan con un exceso de aptámeros. Después de la incubación, se agregan partículas magnéticas (MP) cubiertas con estreptavidina, y los complejos MP-aptámero-bacteria son recuperados por un separador magnético. El aptámero del complejo es directamente amplificado por desplazamiento de hebra isoterma. (B) El producto amplificado es cargado sobre la zona para la muestra, para la posterior detección visual (Fang, Z., 2014).

Una diferencia notable entre los trabajos realizados por Joshi (Joshi, R., 2009) y Dwivedi (Dwivedi, H.P., 2013) fue la  $K_D$  de los aptámeros utilizados para reconocer la bacteria. La  $K_D$  del primer estudio es alrededor de 13000 veces más pequeña que la correspondiente al segundo estudio, lo que implica que hay una mayor afinidad aptámero-bacteria en el estudio realizado por Joshi. Probablemente esta diferencia en las  $K_D$  aptámero-bacteria pudo ser una de las causas de la diferencia en los LODs obtenidos.

La diferencia en el gen utilizado por Jyoti (Jyoti, A., 2011) y Singh (Singh, G., 2012) para diseñar la baliza molecular no generó un efecto en el LOD del sistema de detección, lo que indica que ambos genes tienen afinidades similares por el ADN de la bacteria, en las zonas correspondientes de cada gen.

En el sistema de detección desarrollado por Fang (Fang, Z., 2014) en el cual se utilizaron dos aptámeros (uno de captura y el otro para la detección), el de detección se usó como plantilla para la obtención de una cadena de ADN de hebra simple y su detección en una tira de flujo lateral. La complejidad de este sistema radica en los pasos requeridos para lograr la obtención del ADN de hebra simple: requiere la utilización de un equipo PCR lo que encarece el sistema de detección y también extiende el tiempo total de análisis. Sin embargo, el soporte final de detección (tira de flujo) es un sistema fácil de usar y portable, sin requerimientos de personal técnico especializado. Por lo demás, el LOD alcanzado con este sistema de detección (10 CFU/mL) mejoró considerablemente respecto de los trabajos previamente descritos.

## 2.2.2 Detección óptica

### *Colorimetría*

La detección colorimétrica atrae mucha atención debido a su bajo costo, simplicidad y utilidad práctica. Dado que los cambios de color pueden ser detectados a simple vista, los ensayos colorimétricos no requieren instrumentación cara o sofisticada y pueden ser aplicados en análisis de campo y en diagnóstico en el punto de atención. Para la transformación de los eventos de detección en cambios de color se han desarrollado nuevos materiales, incluyendo nanopartículas de oro (GNPs), nanopartículas magnéticas (MNPs), nanotubos de carbono (CNTs), óxido de grafeno (GO) y polímeros conjugados (Song, Y., 2011). La incorporación de estos materiales en los procesos de detección otorga diferentes ventajas, tales como amplificación de señal, separación selectiva de

moléculas y transducción de señal entre otras, que en definitiva permiten alcanzar mejores LODs, mayores sensibilidades y tiempos reducidos de detección.

Yuan y colaboradores (Yuan, J., 2014a) utilizaron dos aptámeros diferentes para la detección de *S. typhimurium* en una estrategia tipo sándwich (Figura 2.3) con detección visual. Uno de los aptámeros (biotinilado) se inmovilizó sobre una microplaca modificada con estreptavidina a través del enlace biotina-estreptavidina. La bacteria diana y un segundo aptámero conjugado sobre GNPs fueron incubados en los pocillos de la microplaca formándose un complejo aptámero/bacteria/aptámero-GNPs. Se agregó a los pocillos una solución de iones  $Ag^+$ , cuya reducción a Ag metálica catalizada por las GNPs se utilizó para mejorar la señal y se midió la absorbancia. Con esta técnica el LOD calculado fue de 7 CFU/mL, con rango de detección lineal de  $10 - 10^6$  CFU/mL y tiempo de análisis de 3 h (Yuan, J., 2014a).

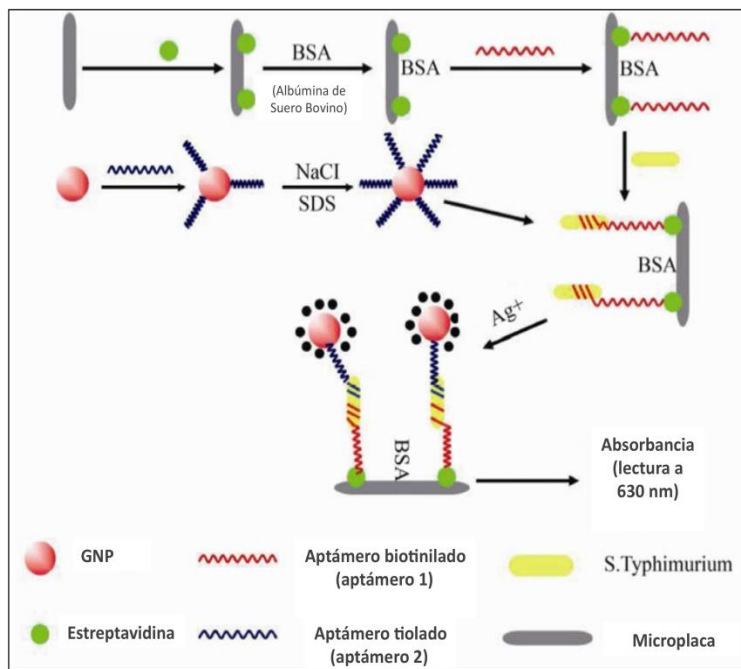


Figura 2.3. Ilustración esquemática de la detección de *S. typhimurium* utilizando un aptámero marcado con GNPs que actúan como catalizador de la reducción de los iones  $Ag^+$  añadidos en solución (Yuan, J., 2014a).



Para el desarrollo de otro sistema de detección colorimétrico de *S. typhimurium*, se seleccionó un aptámero de ADN con una  $K_D$  de 19.59 nM con afinidad por los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de la bacteria. La estrategia utilizada en este biosensor consistió en funcionalizar micropartículas magnéticas (MMP) con el aptámero seleccionado, lo que permitió la captura de la bacteria para su posterior unión a un anticuerpo primario (anticuerpo de detección). A partir de este punto, tres métodos de detección fueron comparados (Figura 2.4): Primero, usando un anticuerpo secundario marcado con la peroxidasa de rábano picante (HRP) para la detección colorimétrica. Segundo, usando un anticuerpo secundario marcado con fosfatasa alcalina para la detección por quimioluminiscencia. Tercero, la utilización de una nanosonda compuesta de GNPs conjugadas con HRP y anticuerpo secundario, para detección colorimétrica. Los resultados obtenidos respecto al LOD fueron  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^3$  CFU/mL respectivamente. El rango de detección lineal para las tres alternativas de detección fue de  $10^3 - 10^8$  CFU/mL (Wu, W., 2014b).

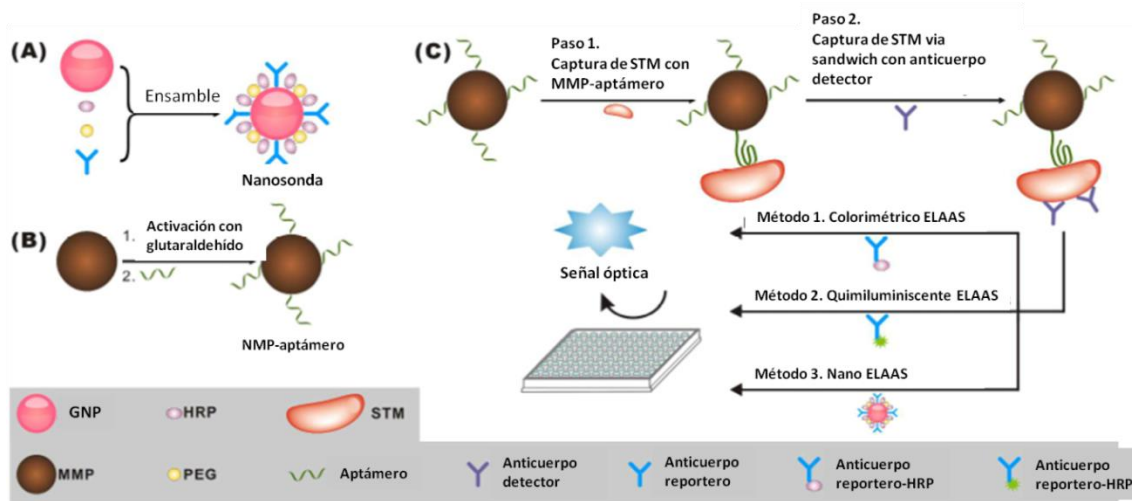


Figura 2.4. Detección de *S. typhimurium* usando tres estrategias tipo sándwich aptámero-anticuerpo enlazado a enzima (Enzyme-Linked Antibody-Aptamer Sandwich Assay, ELAAS): ELAAS colorimétrico, ELAAS quimioluminiscente y nano-ELAAS. (A) Preparación de nanosondas. (B) Preparación de MMP-aptámero. (C) Comparación de los tres métodos de amplificación de señal. GNP: nanopartícula de oro; MMP: micropartículas magnéticas; HRP: peroxidasa de rábano picante; PEG: polietilenglicol; AP: fosfatasa alcalina; STM: *S. typhimurium* (Wu, W., 2014b).

Analizando los trabajos llevados a cabo para la detección colorimétrica de bacterias correspondientes al género *Salmonella*, vemos que el implementado por Yuan (Yuan, J., 2014a) alcanza un LOD significativamente más bajo (7 CFU/mL), dos y tres órdenes de magnitud menor que el llevado a cabo por Wu (Wu, W., 2014b).

En ambos estudios se trabajó en la modalidad tipo sandwich. En el primero de ellos dos aptámeros participaron en esta configuración y en el segundo un aptámero y un anticuerpo fueron los componentes del sandwich. En este último caso el aptámero tuvo la función de reconocer y capturar por medio de partículas magnéticas la bacteria *S. typhimurium*. La detección colorimétrica se efectuó utilizando un anticuerpo (Ab) primario seguido de un Ab secundario marcado con HRP en un caso, y en el otro, GNPs conjugadas con Ab secundario y HRP (Figura 2.4). En ambos diseños se utilizaron las GNPs de modo de amplificar la señal, lo que permite reducir el LOD. El uso de GNPs en el segundo trabajo como herramienta de amplificación resultó en una reducción del LOD ( $10^4$  a  $10^3$  CFU/mL) con respecto a la alternativa sin amplificación. Sin embargo, este valor está muy por encima al logrado en el primer sistema de detección colorimétrico basado en el uso de dos aptámeros, en el cual se produce la amplificación de la señal al precipitar la plata.

Finalmente dentro de los sistemas de detección colorimétricos para *Salmonella*, está el trabajo de Ning (Ning, Y., 2014), que será también mencionado en los trabajos de detección por fluorescencia y cuyo objetivo fue la detección de *Salmonella paratyphi* (*S. paratyphi*), que es una bacteria de real importancia por causar la fiebre paratifoidea. Se utilizó un aptámero de ADN con una  $K_D$  de 27 nM respecto a la afinidad con la proteína flagelina, una proteína globular que forma parte de la estructura del flagelo y cuya función es la locomoción. La estrategia empleada (Figura 2.5) consistió en usar una sonda de ADN que contiene una deoxiribozima (ADNzima) en un extremo y el aptámero marcado con fluoresceína en el otro extremo. Por un lado la adición de hemina permite la actividad de la

ADNzima, que cataliza la oxidación del sustrato ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), generando un cambio de color y por tanto cambios en las medidas de absorbancia. La sonda libre interacciona con nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs), impidiendo la conformación de la ADNzima y bloqueando la fluorescencia de la fluoresceína. En presencia de la bacteria el aptámero interacciona con la proteína flagelina, liberándose de su interacción con los SWCNTs, quedando libres la ADNzima y la fluoresceína. En este estudio el extremo de la sonda que contiene la ADNzima permitió una detección colorimétrica, alcanzando un LOD de  $10^6$  CFU/mL, con un rango lineal de  $10^6 - 10^8$  CFU/mL (Ning, Y., 2014). Estas concentraciones son extremadamente altas, con lo cual este sistema de detección no es competente para el desarrollo de un biosensor para la detección de *S. paratyphi*, dada la baja dosis infectiva (DI) de esta bacteria.

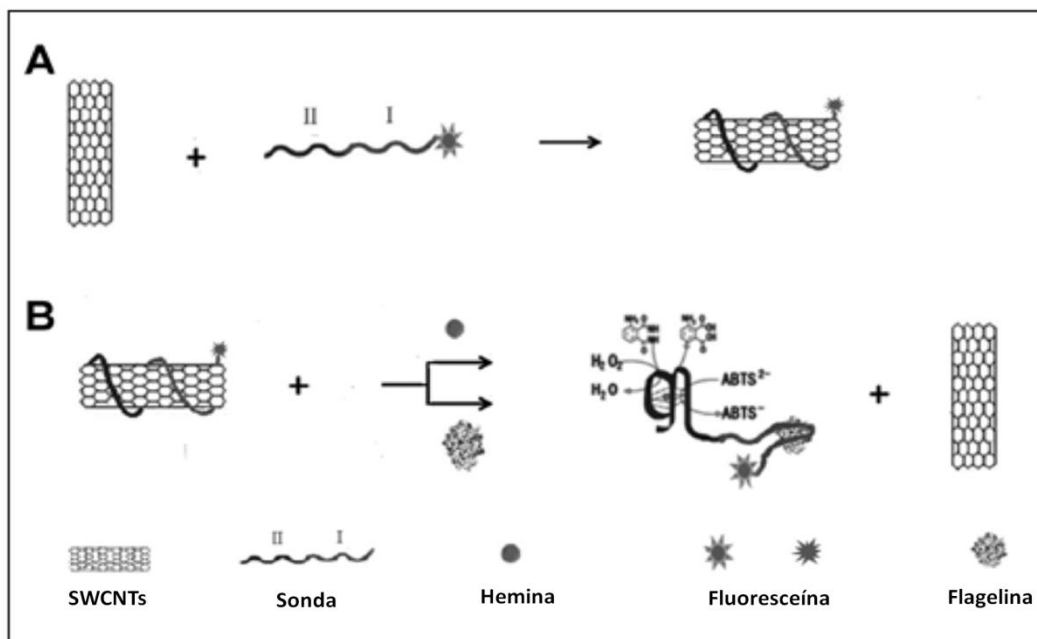


Figura 2.5. Representación de la plataforma dual espectrofotométrica-fluorescente para la detección de la proteína flagelina A de *S. paratyphi* (Ning, Y., 2014).

## *Fluorescencia*

La fluorescencia es una técnica recurrente para la detección en general y particularmente para observar la presencia de bacterias. Tanto es así que de los trabajos que reportamos en este capítulo, en el 40 % de ellos se utiliza la fluorescencia como técnica de detección (Tabla 2.1 del Apéndice II.1).

Una de las bacterias del género *Salmonella* encontrada en la literatura sobre aptámeros es la perteneciente al grupo O8 (*Salmonella* O8), relacionada con gastroenteropatía y polirradiculoneuropatía (Kondo, H., 1994). En el único trabajo encontrado para esta bacteria, un aptámero de ADN con una  $K_D$  de 32.04 nM se marcó con fluoresceína y se incubó sobre un frotis, en donde previamente se había depositado un inóculo de la bacteria *Salmonella* O8. Mediante microscopía de fluorescencia se detectó la presencia de la bacteria en un tiempo total de ensayo entre 1.5 a 2 h (Liu, G., 2012). Este trabajo sólo permitió conocer la presencia o ausencia de la bacteria.

Siguiendo la misma dirección del trabajo anterior, en relación al uso de fluoróforos para la detección de bacterias, un aptámero de ADN con  $K_D$  de 6.33 nM se conjugó con carboxifluoresceína (FAM) o con biotina para detectar la presencia de *S. typhimurium*. El aptámero biotinilado se utilizó para posteriormente formar un complejo con nanopartículas magnéticas modificadas con avidina mediante la unión biotina-avidina. Una muestra con bacterias se incubó con ambos aptámeros modificados. Después de la separación de la bacteria desde la muestra mediante captura magnética, se realizaron medidas de fluorescencia para la detección (Figura 2.6), obteniéndose un LOD de 25 CFU/mL y un rango de detección lineal de  $50 - 10^6$  CFU/mL (Duan, N., 2013a).

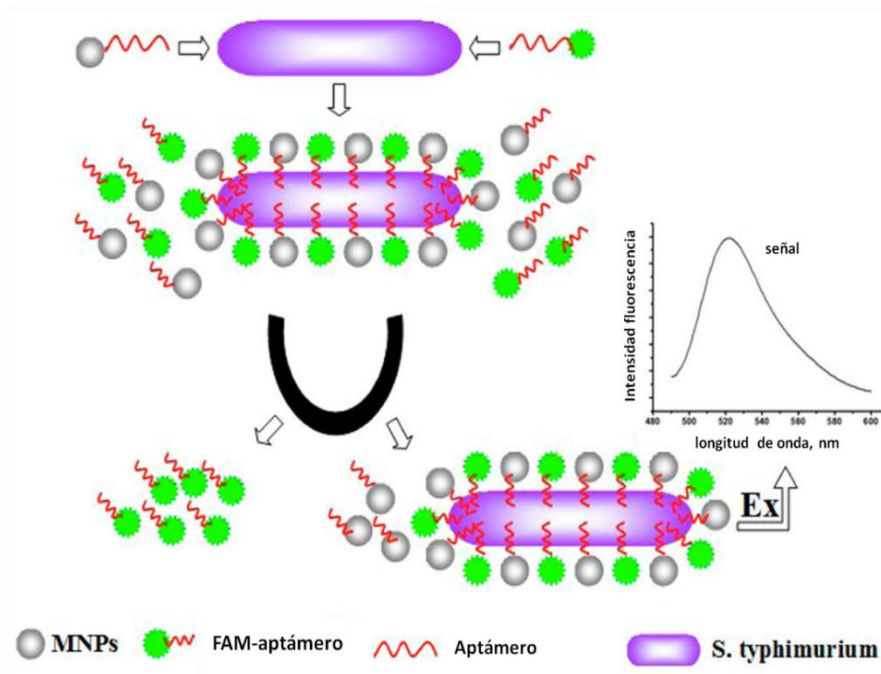


Figura 2.6. Ilustración esquemática del bioensayo fluorescente para la determinación de *S. typhimurium*. MNPs: nanopartículas magnéticas; FAM: carboxifluoresceína (Duan, N., 2013a).

Un aptámero de ADN previamente seleccionado por Kolovskaya (Kolovskaya, O, 2013) con  $K_D$  de 15.4 nM, se marcó con el fluoróforo FAM para su utilización como elemento de reconocimiento en un biosensor óptico para la detección de *S. enteritidis* (Figura 2.7). En este nuevo diseño de biosensor la fluorescencia se desactiva cuando el aptámero es absorbido sobre GO. En presencia de la bacteria, el aptámero se desacopla del GO para unirse a la bacteria, observándose una recuperación de la fluorescencia. En este ensayo el LOD alcanzado fue de 40 CFU/mL, con un tiempo de ensayo de 30 min (Wu, W., 2014a).

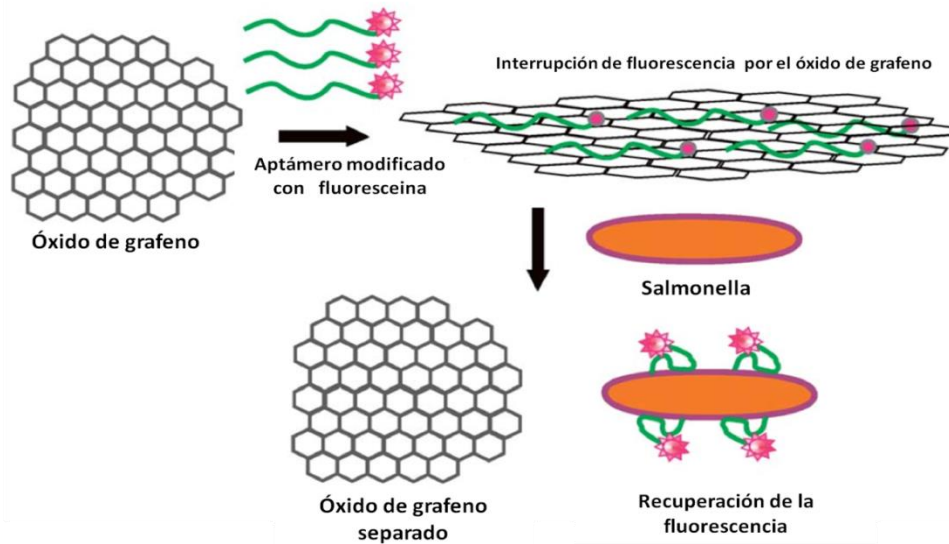


Figura 2.7. Ilustración esquemática del aptasensor para la detección de *Salmonella enteritidis* (Wu, W., 2014a).

Otra estrategia alternativa para la detección de *S. paratyphi*, fue mencionada previamente en el apartado de detección colorimétrica en el trabajo desarrollado por Ning (Ning, Y., 2014), en el cual se utilizó una sonda de ADN con una deoxiribozima (ADNzima) en un extremo y el aptámero marcado con fluoresceína en el otro extremo. La molécula de fluoresceína libre permitió medir cambios en la intensidad de la fluorescencia, alcanzando un LOD de  $10^5$  CFU/mL. Los rangos de detección fueron  $10^5 - 10^{10}$  CFU/mL y  $10^6 - 10^{10}$  CFU/mL para las detecciones por fluorescencia y absorbancia respectivamente (Ning, Y., 2014).

Uno de los últimos trabajos reportados para la detección de *S. typhimurium* mediante fluorescencia (Wang, R., 2015) hace uso de los puntos de carbono (CD, carbon dot). Las propiedades electrónicas excepcionales de los CDs como donadores y aceptores de electrones los dotan con un amplio potencial en aplicaciones optométricas, catálisis y sensores (Wang, Y., 2014). En la estrategia desarrollada para la detección de *S. typhimurium*, los CDs con grupos carboxilo libres fueron conjugados con el aptámero modificado con un grupo amino por medio de enlaces amida. Tras la incubación de la bacteria diana con el aptámero marcado, la superficie de esta se cubrió del complejo CD-aptámero. Dado el

carácter fluorescente de los CDs, se realizaron medidas de fluorescencia para la detección (Figura 2.8), lográndose un LOD de 50 CFU/mL con un rango de detección lineal de  $10^3$  a  $10^5$  CFU/mL. El tiempo total del ensayo fue de 2 h (Wang, R., 2015).

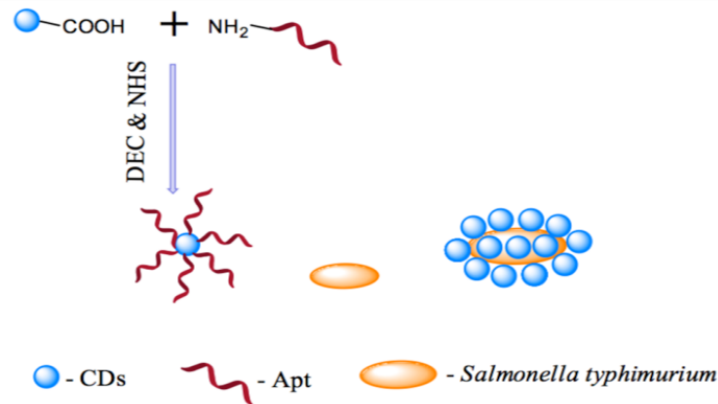


Figura 2.8. Esquema del proceso de acoplamiento del aptámero marcado con CD a la bacteria. (Wang, R., 2015).

La estrategia utilizada por Liu (Liu, G., 2012) para *Salmonella* O8, en la cual la detección se realizó directamente sobre un frotis con el aptámero marcado con fluoresceína, es muy sencilla y rápida (1.5 h). Sin embargo, el resultado solo indica la presencia o ausencia de bacterias. Normalmente se prefiere la cuantificación de la contaminación microbiológica, y no solo una medida cualitativa como presencia/ausencia.

La captura magnética de la bacteria *S. typhimurium* como paso previo a la detección por fluorescencia, le permitió al trabajo de Duan (Duan, N., 2013a) mejorar los parámetros de detección. Es así como alcanzó un LOD de 25 CFU/mL, logrando un rango lineal de detección amplio. También se lograron parámetros de comportamiento similares (LOD = 40 CFU/mL) en el sistema de detección desarrollado por Wu (Wu, W., 2014a) para *S. enteritidis*. El GO utilizado en este caso permitió la detección sencilla por activación/desactivación de la fluorescencia en función de la presencia/ausencia de la bacteria, en un tiempo bastante corto (30 min). Aproximadamente el mismo LOD (50 CFU/mL) se logró utilizando los

CDs como elemento generador de fluorescencia. Los CDs están actualmente emergiendo como una prometedora clase de sonda fluorescente debido al bajo fotoblanqueo, la ausencia de parpadeo óptico y su excelente biocompatibilidad. Los CDs poseen un beneficio adicional sobre los fluoróforos orgánicos y puntos cuánticos, los cuales están limitados por su fotoblanqueo o por los potenciales peligros asociados a los metales pesados como el cadmio y el plomo. Estos elementos químicos, con los cuales se pueden formar los puntos cuánticos, son elementos cancerígenos, y por tanto una desventaja a la hora de utilizarlos. Las excelentes propiedades de los CDs, por lo tanto, han generado magníficas perspectivas en aplicaciones como sensores (Wang, Q., 2014).

A diferencia de los resultados obtenidos en los sistemas previos de detección por fluorescencia, en donde se alcanzaron LODs menores a 100 CFU/mL, los parámetros de detección alcanzados por Ning (Ning, Y., 2014) no fueron satisfactorios. Tanto el LOD ( $10^5$  CFU/mL) como el rango lineal para la detección de *S. paratyphi*, resultaron con valores poco convenientes, lo que no resulta atractivo desde el punto de vista de su utilidad sabiendo, por ejemplo, que la DI es de 1000 microorganismos (Leggett, H.C., 2012). Además en esta estrategia se utiliza una sonda compleja compuesta en un extremo por un aptámero marcado con un fluoróforo, y en el otro extremo una ADNzima. Esta doble funcionalidad de la sonda podría verse afectada por la interacción entre ambos extremos, lo que redundaría finalmente en la obtención de intensidades de señal más bajas en comparación a las logradas con las moléculas (aptámero y ADNzima) separadas.

### *Quimioluminiscencia*

La quimioluminiscencia es la emisión de radiación electromagnética, normalmente en la región del visible o infrarrojo cercano, producida por una reacción química. Para que se dé la quimioluminiscencia es necesario que la reacción produzca un exceso de energía, lo cual es bastante frecuente sobretodo en reacciones rédox. Pero el hecho de que este exceso de energía se disipe con emisión



quimioluminiscente, depende en gran medida de la estructura molecular de los intermedios o productos de reacción (Meseguer Lloret, S., 2004).

Una estrategia similar a la desarrollada por Ning (Ning, Y., 2014) para la detección de *S. paratyphi*, fue llevada a cabo por Yang (Yang, M., 2013). Esta vez se utilizó un aptámero de ADN diferente contra la proteína flagelina, con una  $K_D$  de 47 nM. Al igual que el caso anterior, se diseñó una sonda compuesta por el aptámero en un extremo y una ADNzima en el otro extremo (Figura 2.9). También la presencia de SWCNT produjo un plegamiento de la sonda alrededor de los nanotubos. La presencia de la bacteria diana y la molécula hemina produjo el desacoplamiento de la sonda de los SWCNT, uniéndose la parte del aptámero a la bacteria y la parte de la ADNzima a la molécula hemina. La estructura adoptada por la ADNzima sobre la hemina permitió catalizar la oxidación de luminol por el  $H_2O_2$ , generando en este caso quimioluminiscencia. Se alcanzó un LOD de  $10^3$  CFU/ mL y un rango de detección lineal de  $10^3 - 10^7$  CFU/mL (Yang, M., 2013).

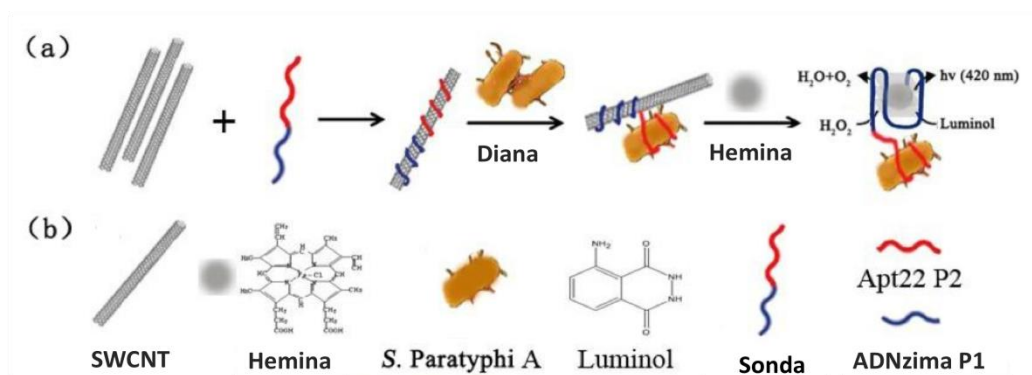


Figura 2.9. Método de detección basado en el autoensamblaje no covalente de SWCNT y un aptámero sonda marcado con una ADNzima. (a) Esquema de detección de *S. paratyphi*. (b) Elementos implicados en la detección (Yang, M., 2013).

El segundo estudio basado en la detección por quimioluminiscencia, fue citado en las estrategias de detección de *S. typhimurium* por colorimetría (Wu, W., 2014b). En este, la tercera alternativa de detección se basó en el uso de un anticuerpo secundario marcado con la enzima AP para la detección por quimioluminiscencia. El LOD logrado con este sistema fue de  $10^4$  CFU/mL.

Comparando los dos sistemas previamente reportados para la detección de *Salmonella* por quimioluminiscencia, se observa que los valores del parámetro LOD ( $10^3$  y  $10^4$  CFU/ mL) son relativamente altos en comparación, por ejemplo, con la detección por fluorescencia o algunas colorimétricas. Al igual como se discutió anteriormente, la sonda con doble funcionalidad (aptámero-ADNzima) conllevaría a una posible interacción entre los extremos, lo que finalmente se vería reflejado en intensidades de señal más bajas debido a una pérdida de la actividad de la ADNzima en este caso.

### 2.2.3. Detección piezoeléctrica

Los materiales piezoeléctricos tales como el cuarzo pueden ser usados para detectar cambios de masa debidos a sus propiedades piezoeléctricas. El cristal de cuarzo cuando se corta apropiadamente y se aplica una cierta presión AC (AC: corriente alterna) tiene una oscilación a cierta frecuencia. Esta frecuencia es muy sensible a la masa del cristal. La microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) es un método electroacústico adecuado para el análisis de masa y viscoelasticidad de capas adsorbidas en una interfase sólido/solución o sólido/aire. La QCM mide una masa por unidad de área mediante cambios de frecuencia de un resonador de cristal de cuarzo (Chang, B., 2008).

Se realizó la detección de *S. typhimurium* mediante un sistema piezoeléctrico en el cual se utilizó un sensor de QCM (Figura 2.10). En un primer paso se capturó la bacteria diana desde una muestra mediante la separación por partículas magnéticas conjugadas con el aptámero de ADN previamente utilizado en el trabajo desarrollado por Dwivedi (Dwivedi, H.P., 2013) basado en detección por PCR. El electrodo de oro del sensor QCM se funcionalizó con ácido 6-mercaptohexadecanoico (MCH). Se activó el grupo carboxilo del MCH para dejar un grupo imino expuesto y reaccionar con el aptámero modificado con un grupo amino ( $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-aptámero}$ ). La interacción de la bacteria diana con el aptámero

inmovilizado sobre la superficie del cristal de cuarzo provocó cambios de frecuencia, medidos como señal de detección. Los parámetros LOD y rango lineal de detección fueron  $10^2$  y  $10^2 - 4 \times 10^4$  CFU/mL respectivamente (Ozalp, V.C., 2015).

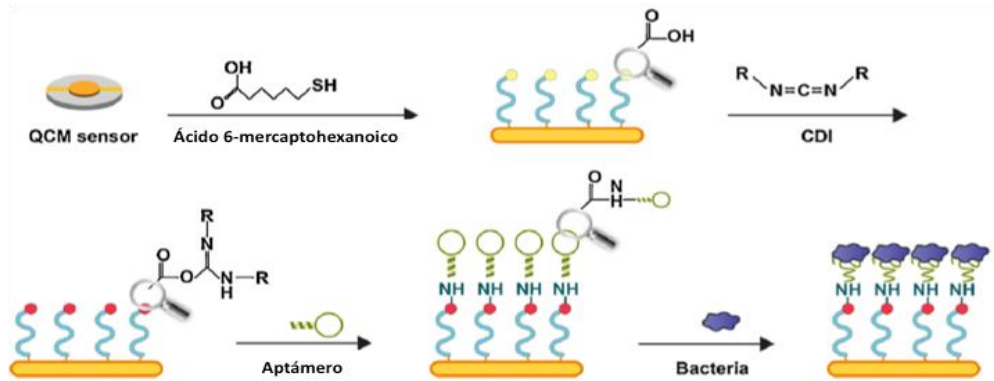


Figura 2.10. Química de la funcionalización superficial del sensor QCM para la captura y detección de *S. typhimurium* (Ozalp, V.C., 2015).

#### 2.2.4. Detección electroquímica

En este apartado se muestran los trabajos de los sistemas de detección electroquímicos que cumplen la condición de biosensor como se aclaró en la introducción previa.

##### *Biosensores electroquímicos*

De la literatura encontrada para la selección y/o detección de *S. enteritidis* mediante aptámeros, la mayoría han sido aptámeros de ADN, sin embargo también se puede encontrar la selección de un aptámero de ARN (Hyeon, J.Y., 2012).

Labib y colaboradores seleccionaron un aptámero por medio de Cell-SELEX, que presenta una  $K_D$  de 7 nM (Labib, M., 2012a), para la detección electroquímica de

esta misma bacteria (Figura 2.11). El aptámero tiolado fue autoensamblado sobre las nanopartículas de oro incorporadas en un electrodo serigrafado de carbono. La unión de la bacteria al aptámero inmovilizado causa un aumento de la resistencia interfacial, medida por EIS. El LOD alcanzado fue de 600 CFU/mL, con un rango lineal de  $10^3 - 10^5$  CFU/mL y un tiempo de detección de 10 min (Labib, M., 2012a).

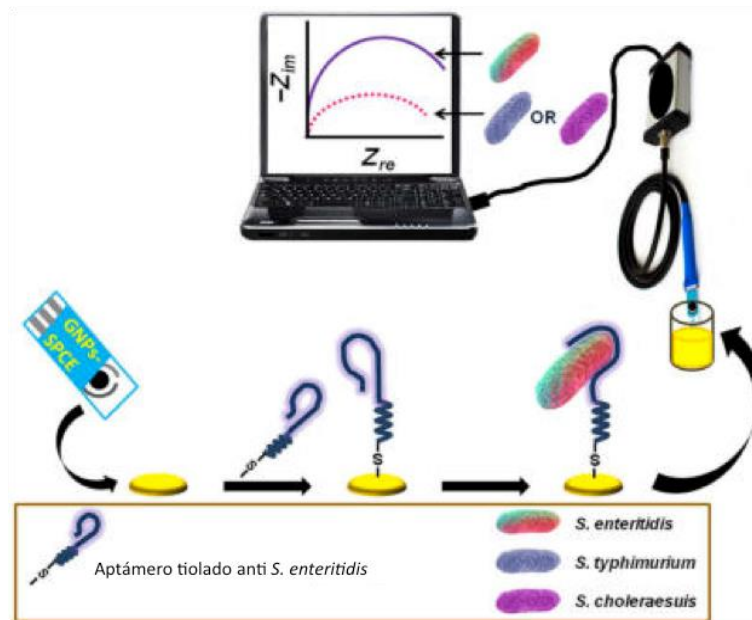


Figura 2.11. Diagrama esquemático de un biosensor impedimétrico para la detección de *S. enteritidis* (Labib, M., 2012a).

Una de las enterobacteriaceae que causa mayor índice de mortandad es *Salmonella typhi* (*S. typhi*) debido a que provoca la fiebre tifoidea que anualmente causa unas 600000 muertes en el mundo (Crump, J.A., 2004). A pesar de la gravedad de los efectos provocados por esta bacteria, son minoritarios los trabajos encontrados en lo que respecta a la detección de esta bacteria usando aptámeros como molécula de reconocimiento. De acuerdo a nuestra revisión sólo hemos podido encontrar un trabajo, basado en detección potenciométrica. En este, un aptámero de ADN con una alta afinidad por la proteína del pili tipo IVB ( $K_D = 8.56$  nM), se utilizó en un sistema de detección en el cual SWCNTs fueron adsorbidos sobre la superficie de un electrodo de carbón vítreo y luego se inmovilizó un aptámero aminado sobre los SWCNTs con grupos carboxilo mediante enlaces

amida. La presencia de *S. typhi* produce el desacoplamiento parcial del aptámero para unirse a la bacteria (Figura 2.12), generando un cambio en el registro del potencial. Con este sistema se pudo alcanzar un LOD de 0.2 CFU/mL, en menos de 1 min, con un rango de detección entre 0.2 – 10<sup>3</sup> CFU/mL (Zelada-Guillen, G.A., 2009).

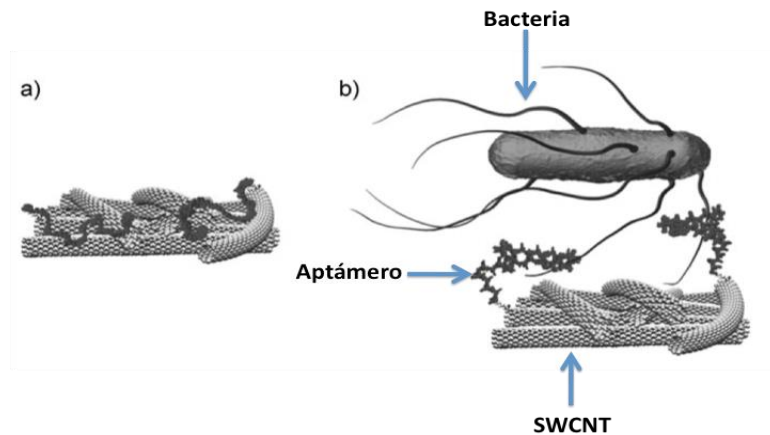


Figura 2.12. Interacción aptámero-bacteria. (a) Aptámeros autoensamblados sobre SWCNTs. (b) Representación esquemática de la interacción entre la bacteria diana y el sistema híbrido aptámero-SWCNT (Zelada-Guillen, G.A., 2009).

A diferencia del caso anterior, una de las bacterias con más referencias encontradas en el área de biosensores para su detección con el uso de aptámeros, fue *S. typhimurium*. Utilizando Cell-SELEX, se seleccionó otro aptámero para esta bacteria, con una  $K_D$  de 25 nM. La estrategia utilizada por los autores del trabajo fue la misma para la detección de *S. enteritidis*. La utilización de esta técnica permitió alcanzar un LOD de 600 CFU/mL con un rango de detección de 10<sup>3</sup> – 10<sup>5</sup> CFU/mL (Labib, M., 2012b).

En otro estudio para la detección electroquímica de *S. typhimurium*, Ma y colaboradores diseñaron una nueva estrategia para la detección directa de *S. typhimurium* mediante EIS (Ma, X., 2014). Para tal detección se utilizó un aptámero de ADN tiolado. En esta estrategia (Figura 2.13) se utilizó un electrodo de carbón vítreo modificado con GO sobre el cual se electrodepositaron GNPs. A

continuación se inmovilizó el aptámero tiolado sobre las GNPs. La presencia de bacterias resultó en un aumento de la resistencia de la interfase electrodo-solución. Se llegó a un LOD de 3 CFU/mL y un rango de detección lineal de 2.4 – 2.4 x 10<sup>3</sup> CFU/mL (Ma, X., 2014).

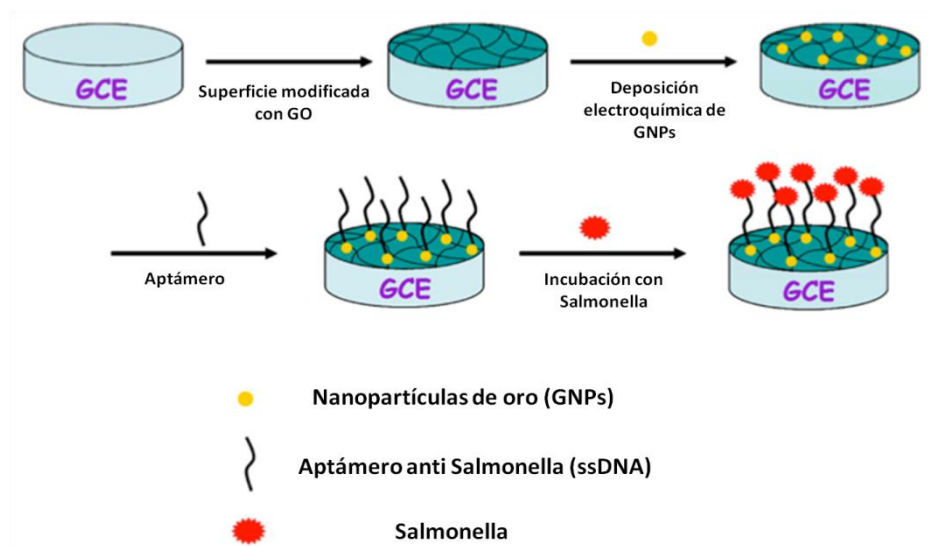


Figura 2.13. Ilustración esquemática de la detección electroquímica de *S. typhimurium*. GCE: electrodo de carbono vítreo; GO: óxido de grafeno (Ma, X., 2014).

De los biosensores electroquímicos previamente descritos, en tres de ellos se utilizó EIS. Esta es una técnica sensible y poderosa para el análisis de las propiedades interfaciales relacionadas a eventos de bioreconocimiento que ocurren en superficies modificadas (Bahadır, E.B., 2016). Las limitaciones de esta técnica son los varios requerimientos para obtener un espectro de impedancia válido. Teóricamente hay tres requerimientos básicos para medidas de impedancias AC: linealidad, estabilidad y causalidad. La exactitud de las medidas de EIS no solo depende de la precisión técnica de la instrumentación, también depende de los procedimientos de operación (Bahadır, E.B., 2016). Respecto a la linealidad, la amplitud debe ser lo suficientemente pequeña, de manera que la respuesta de la celda se pueda asumir como lineal, pero lo suficientemente grande como para medir esa respuesta. La condición de estabilidad establece que el

estado general del sistema no debe cambiar significativamente durante la adquisición de datos. Tanto el rango de frecuencias como las condiciones de las medidas influyen en esta condición. Finalmente la condición de causalidad establece que la respuesta debe estar directamente correlacionada con el estímulo aplicado. En este caso el aislamiento de la celda para evitar perturbaciones externas es importante. En las tres estrategias que usaron EIS como técnica de detección, los aptámeros fueron modificados con un grupo tiol para luego ser inmovilizados sobre una superficie de oro. Esta es una metodología bastante utilizada, dado que requiere un mínimo o nulo tratamiento de superficies y un procedimiento sencillo para formar una monocapa de autoensamblaje (SAM, self-assembled monolayer) de moléculas tioladas. Los tiempos de detección una vez formada la SAM de aptámeros sobre los electrodos son muy cortos dado que el siguiente paso es incubar la muestra y realizar la medida que toma unos minutos. El uso de GNPs también se ha utilizado en los tres sistemas de detección con EIS. Estas nanopartículas incrementan el área superficial del electrodo y por tanto los sitios de unión de las moléculas tioladas, dando como resultado una amplificación en la señal. En los últimos años se ha mejorado el comportamiento de los biosensores electroquímicos y en particular los aptasensores, incorporando nuevos nanomateriales en su preparación. Es el caso del GO utilizado como transductor en el trabajo de Ma (Ma, X., 2014), en el cual se logró un LOD bastante menor respecto a los otros sistemas de detección con EIS. Por otro lado, en el sistema de detección desarrollado por Zelada-Guillen (Zelada-Guillen, G.A., 2009) el aptámero fue modificado con un grupo amino y fue inmovilizado covalentemente via enlace amida sobre los SWCNTs utilizados como transductor. La notable capacidad de transferencia de carga entre fases heterogéneas de los SWCNTs junto con su marcada capacitancia de doble capa, explican su comportamiento transductor (Crespo, G.A., 2009). La técnica electroquímica utilizada en este biosensor, la potenciometría, es una de las técnicas más simples y más extendidas. En el caso del trabajo de Zelada-Guillen se utilizó un electrodo potenciométrico en estado sólido, una herramienta atractiva para el bioanálisis de muestras líquidas en tiempo real. La combinación de este tipo de electrodo con los

SWCNTs, permitió alcanzar un LOD muy bajo (0.2 CFU/mL), uno de los LOD más bajos encontrados en la literatura de los biosensores para bacterias. Además el tiempo de ensayo, una vez construido el aptasensor, fue muy corto, menor a los 60 s, indicando que el equilibrio entre aptámero y bacteria se alcanza en forma rápida (Zelada-Guillen, G.A., 2009).

Un análisis general de todos los sistemas de detección utilizados en la detección de bacterias pertenecientes al género *Salmonella* muestra que desde el punto de vista del LOD, los valores más bajos se lograron con la detección electroquímica. También los tiempos de detección fueron bastante más reducidos, menores a 10 min. Las estrategias adoptadas en los sistemas electroquímicos fueron más simples que las desarrolladas, en general, en otros sistemas de detección. En el lado opuesto se encuentran los sistemas colorimétricos en donde se reportaron los LODs, rangos lineales y tiempos de análisis más altos, con algunas excepciones.

Aproximadamente el 70% de los trabajos llevados a cabo para detectar alguna especie del género *Salmonella*, utilizaron nanomateriales con la finalidad de mejorar uno o más parámetros del sistema de detección, lo que demuestra la creciente importancia de estos elementos en la preparación de los sistemas de detección. Aunque el uso de estos nanomateriales por si solos no garantiza la mejora, ya que dependerá entre otras cosas de la estrategia utilizada, sí se observan en general mejores resultados. Observamos en este apartado que cada uno de los nanomateriales utilizados tuvo una función específica: las GNPs se utilizaron para amplificar la señal, las MNPs como elementos de captura y concentración y, por lo mismo, de ampliación de la señal, el GO como desactivador de la fluorescencia, los SWCNTs como elementos que mejoran la transducción de la señal, y los CDs como señal fluorescente.



### 2.3. Detección de bacterias del género *Escherichia*

*Escherichia* es otro de los géneros que incluyen patógenos de alto riesgo, aunque en general son minoritarias las bacterias que tienen el carácter de peligrosas. Una de ellas es *Escherichia coli* O157:H7 que ha sido objeto de numerosos estudios para su detección (Wu, S.Y., 2015).

#### 2.3.1. Detección por PCR

*E. coli* DH5 $\alpha$  es una cepa considerada no patógena que pudo ser detectada con un aptámero de ARN. La bacteria fue capturada y aislada por partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos. Este complejo (partícula-anticuerpo-bacteria), como se ve en la Figura 2.14, fue incubado con el aptámero, que se unió a la superficie de las bacterias capturadas. El aptámero fue liberado por calentamiento y luego amplificado por PCR en tiempo real. Se obtuvo un LOD de 10 CFU/mL y un rango lineal de detección  $10^1 - 10^7$  CFU/mL para esta estrategia de detección (Lee, H.J., 2009).

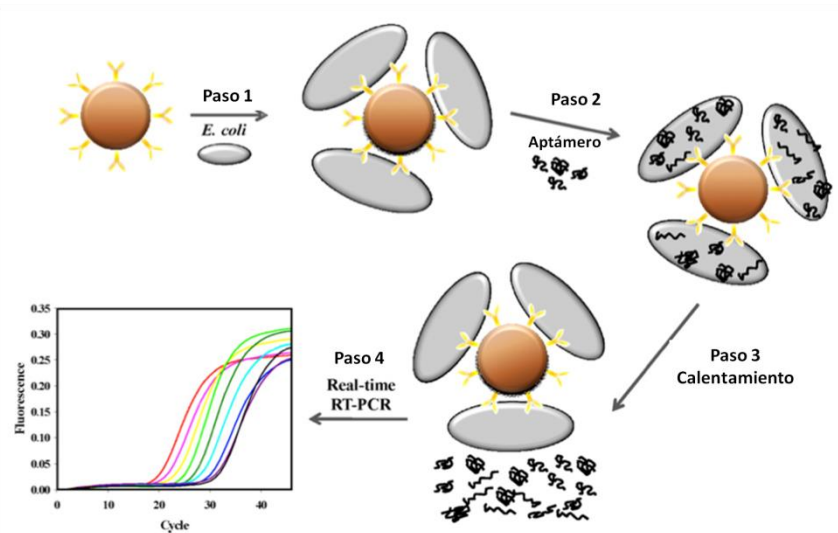


Figura 2.14. Esquema para la detección de *E. coli* DH5 $\alpha$  en un ensayo combinado de separación inmunomagnética, sándwich y amplificación del aptámero (Lee, H.J., 2009).

Una estrategia sándwich similar a la utilizada para la detección de *S. enteritidis* basada en la utilización de dos aptámeros, uno de captura y otro de detección

(Fang, Z., 2014), se utilizó para la detección de *E. coli* O157:H7. Tal como se describió anteriormente, esta estrategia incluyó la amplificación del aptámero de detección por PCR y su detección en un dispositivo de flujo lateral. Se alcanzó un LOD de 10 CFU/mL y un rango lineal de  $10 - 10^6$  CFU/mL (Wu, W., 2015).

Aunque los LODs alcanzados para *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* O157:H7 fueron significativamente bajos (10 CFU/mL), siguen siendo altos en términos prácticos. El valor del LOD tiene especial importancia cuando se trata de *E. coli* O157:H7 dado su alto grado de patogenicidad. La DI de este microorganismo es muy baja: alrededor de 10 células bacterianas. Por otro lado algunos trabajos determinan que 2 bacterias en 25 g (25 mL) de alimento son suficientes para causar infección sin que la bacteria se haya multiplicado en el alimento, sino simplemente sobrevivido (Rubeglio, E.A., 2007).

Se observa que los mejores resultados se obtuvieron con el uso del dispositivo de flujo lateral. En aquel sistema, ayudado con GNPs como amplificador de señal, se logró el menor LOD y el más amplio rango lineal de detección. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente para la misma estrategia, tiene el inconveniente de requerir la generación y amplificación de ssADN.

Si bien es cierto que la DI está dada en número de microorganismos y el LOD está dado en concentración de microorganismos (CFU/mL), el parámetro DI nos permite saber la “utilidad” de un determinado LOD. Así, en dispositivos para la detección de microorganismos con DIs muy bajas (patógeno con peligrosidad alta) deberían obtenerse LODs considerablemente bajos. Y por el contrario, para patógenos con un DI elevado no es necesario alcanzar LODs extremadamente bajos. Un ejemplo es el caso anterior, en el cual se alcanzó un LOD de 10 CFU/mL para la detección de *E. coli* O157:H7 (con un DI de 10 células). Es decir, si existen 10 células de esta bacteria en un volumen, por ejemplo, de 100 mL de alimento o agua, el dispositivo anteriormente expuesto no será capaz de detectarlas.

### 2.3.2 Detección óptica

#### Colorimetría

La selección de dos aptámeros con afinidad hacia LPS se utilizó en una nueva estrategia de detección de *E. coli* O157:H7 (Figura 2.15). Los aptámeros fueron conjugados, via enlace amida, sobre nanovesículas de polidiacetileno (PDA) de coloración azul. En presencia de la bacteria diana, las nanovesículas cambiaron a una coloración roja profunda. El PDA es un sistema polimérico extraordinario, el cual muestra propiedades cromáticas únicas. Está formado por la unión 1,4 de monómeros diacetilénicos por medio de irradiación ultravioleta. El polímero resultante es intensamente azul, debido a la deslocalización electrónica. El PDA puede experimentar rápidos cambios de coloración azul-rojo debido a perturbaciones externas como cambios de temperatura, pH, y presión superficial. El mecanismo molecular correspondiente al cambio de color se cree que es un cambio en la estructura del polímero, Esta transformación conformacional del polímero inducida externamente produce un acortamiento de este, dando como resultado el color rojo (Jelinek, R., 2007). Se realizaron medidas de absorbancia para la cuantificación, obteniéndose un LOD de  $10^4$  CFU/mL y un rango de detección de  $10^4 - 10^8$  CFU/mL, en un tiempo de ensayo de 2 h (Wu, W., 2012).

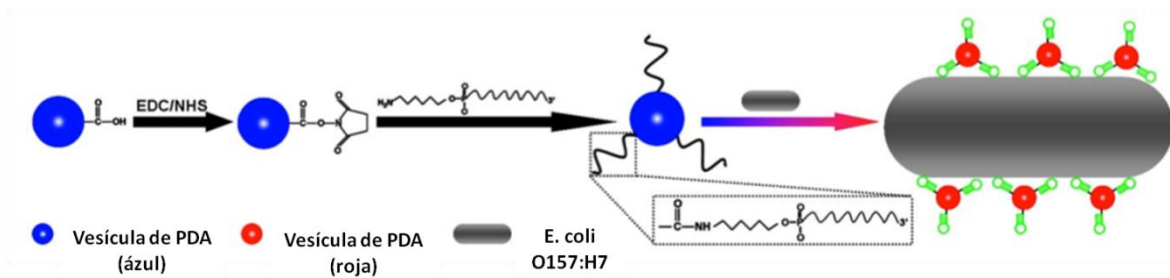


Figura 2.15. Principio de detección de *E. coli* O157:H7 usando un aptasensor basado en vesículas de PDA (Wu, W., 2012).

## Fluorescencia

Para la bacteria *E. coli* k88, Li y colaboradores seleccionaron cuatro aptámeros de ADN con afinidad por las proteínas de la fimbria con las siguientes  $K_D$ : 44, 36, 43 y 25 nM (Li, H., 2011). Los aptámeros se modificaron con FAM en 5' y se realizaron medidas de fluorescencia en solución de bacterias de concentración entre  $10^2$  y  $10^8$  CFU/mL, incrementándose la intensidad de la fluorescencia a medida que se incrementó la concentración de *E. coli* k88.

Para esta misma cepa, se aplicó otra estrategia de detección basada en medidas de fluorescencia, utilizando una librería de aptámeros de ADN con  $K_D$ s de 15, 52, 66 y 106 nM, también con afinidad por las proteínas de la fimbria. Tal como se muestra en el sistema de detección ilustrado en la Figura 2.16, los aptámeros utilizados para la detección fueron modificados en 5' con el fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Por otro lado, se modificaron partículas magnéticas conjugadas con streptavidina con anticuerpos anti-*E.coli* k88 biotinilados, lo cual permitió la separación magnética de las bacterias. Luego las bacterias ligadas a las partículas fueron incubadas con los aptámeros modificados con FITC. La detección se realizó utilizando espectroscopía de fluorescencia con un LOD de  $1.1 \times 10^3$  CFU/mL en cultivo puro y  $2.2 \times 10^3$  CFU/mL en una muestra fecal contaminada artificialmente (Peng, Z., 2014).

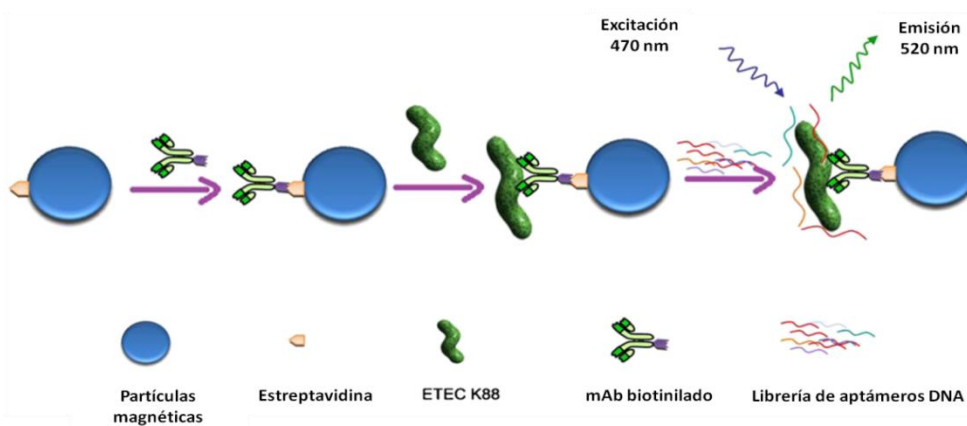


Figura 2.16. Esquema de la estrategia de detección basada en una librería de aptámeros de ADN como reporteros, combinada con tecnología de separación inmunomagnética (Peng, Z., 2014).

Tanto los sistemas de detección por fluorescencia como el colorimétrico con nanovesículas son sistemas más sencillos, respecto a los presentados en la detección por PCR. Los valores de los parámetros de comportamiento de los sistemas de detección por fluorescencia son mejores que los correspondientes a los ensayos por colorimetría. Los LODs, por ejemplo, en la detección fluorimétrica son uno y dos órdenes de magnitud menores que los obtenidos mediante detección colorimétrica. Estos resultados coinciden con la mayor sensibilidad atribuída a los ensayos fluorimétricos respecto de los colorimétricos (Bell, C.W., 2013).

### 2.3.3. Detección electroquímica

#### *Sistemas electroquímicos*

Una detección cronopotenciométrica (Figura 2.17) de la bacteria *E. coli* O157 se realizó en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) al cual se le integró un electrodo con membrana selectiva a iones protamina. Cuando una corriente anódica es aplicada al electrodo, los iones protamina son transportados a través de la membrana desde la solución interna a la muestra, lo cual da como resultado un potencial de respuesta. En ausencia de la bacteria diana se produce la unión entre la protamina y el aptámero de ADN, debido a una fuerte interacción electrostática entre el aptámero con grupos fosfato cargados negativamente y la protamina con grupos guanidino cargados positivamente. El LOD alcanzado fue de 10 CFU/mL y el rango de detección de  $10 - 10^4$  CFU/mL (Lei, J., 2015).

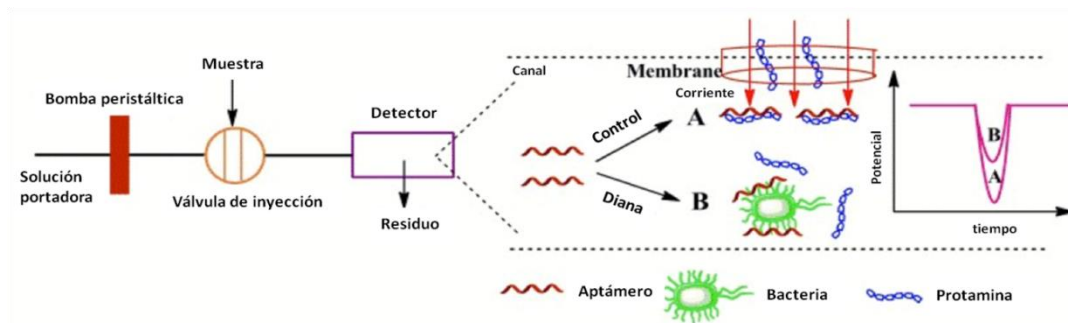


Figura 2.17. Ilustración esquemática de la detección cronopotenciométrica por inyección en flujo de *E. coli* O157 usando un electrodo de membrana sensible a protamina (Lei, J., 2015).

### Biosensores electroquímicos

Zelada-Guillen y colaboradores desarrollaron un biosensor potenciométrico para la detección de *E. coli* CETC 675, utilizada como un sustituto no patogénico de la bacteria patógena *E. coli* O157:H7. Este biosensor se basó en la estrategia empleada por los mismos autores para la detección de *S. typhi*, basada en la medida de cambios de potencial cuando la bacteria interacciona con el aptámero inmovilizado sobre SWCNTs adsorbidos en la superficie de un electrodo de carbón vítreo (Zelada-Guillén, G.A., 2009). Con esta estrategia se lograron LODs de 6 y 26 CFU/mL en muestras de leche y jugo de manzana respectivamente. El rango lineal de detección fue de  $4 - 10^4$  CFU/mL (Zelada-Guillen, G.A., 2010).

También se han desarrollado aptasensores para otra cepa de *E. coli*: *E. coli* O111. Mediante un aptámero de ADN con afinidad hacia los LPS de esta bacteria, el aptasensor logró un LOD de 112 CFU/mL en PBS y 305 CFU/mL en una muestra problema en un tiempo de 3.5 h. Como se muestra en la Figura 2.18, el biosensor se preparó mediante la inmovilización de un oligonucleótido tiolado (sonda de captura complementaria a una parte de la secuencia del aptámero) sobre la superficie de un electrodo de oro, permitiendo la hibridación con el aptámero. La presencia de la bacteria diana provocó la deshibridación del aptámero y permitió la hibridación de una sonda de detección biotinilada. Con la incorporación del

complejo estreptavidina-AP se determinó electroquímicamente la actividad de la enzima y en forma indirecta la presencia de la bacteria (Luo, C., 2012).

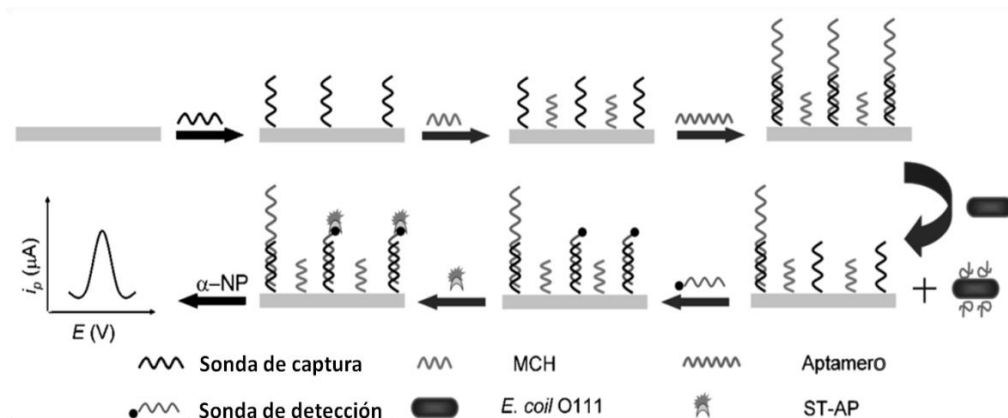


Figura 2.18. Principio del biosensor electroquímico para la detección de *E. coli* O111 (Luo, C., 2012).

Una alternativa interesante a la estrategia anterior fue estudiar el efecto de detectar *E. coli* KCTC 2571 utilizando un cóctel de tres aptámeros o bien cada uno de los aptámeros individualmente (Figura 2.19) (Kim, Y.S., 2013). Los aptámeros seleccionados, con  $K_D$  en el rango de 12.4 a 25.2 nM, se modificaron en 3' con un grupo amino. Una monocapa autoensamblada de ácido 3-3' ditiodipropiónico se formó sobre los electrodos de oro serigrafiados, permitiendo la inmovilización de los aptámeros aminados mediante enlaces amida. Se utilizó la voltametría cíclica para cuantificar la interacción bacteria-aptámero y los resultados obtenidos para el LOD fueron: entre  $3.2 \times 10^3$  y  $1.07 \times 10^4$  CFU/mL para los aptámeros individuales y  $3.7 \times 10^2$  CFU/mL para el cóctel de tres aptámeros (Kim, Y.S., 2014).

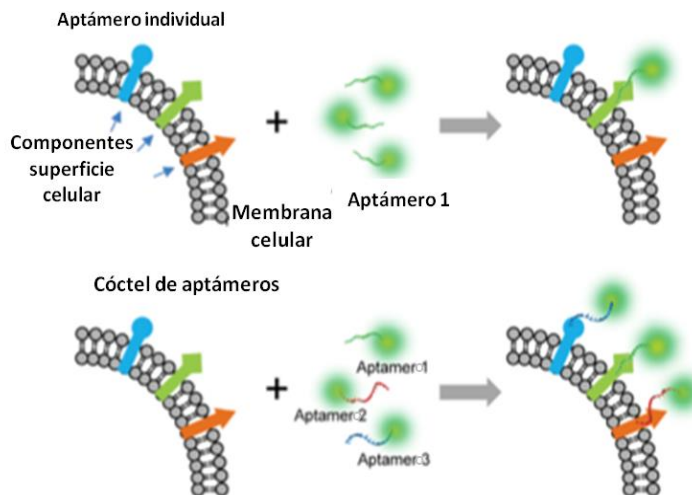


Figura 2.19. Concepto esquemático de la mejora de la señal mediante el uso de un cóctel de aptámeros para la detección de células bacterianas (Kim, Y.S., 2014).

De los cuatro trabajos referidos previamente, con las técnicas potenciométricas (potenciometría y la cronopotenciometría) se lograron los LODs más bajos (6 y 10 CFU/mL). De estas estrategias la más simple en su desarrollo fue la diseñada por Zelada-Guillén (Zelada-Guillén, G.A., 2010), puesto que una vez construido el biosensor (Electrodo-SWCNT-Aptámero), las medidas se registran rápidamente con la presencia/ausencia de la bacteria diana. Una vez más el nanomaterial SWCNT fue utilizado como transductor lo que posibilitó los buenos parámetros obtenidos. Aún siendo 6 CFU/mL un valor muy bueno respecto a la mayoría de los LODs obtenidos en muchos trabajos, para los efectos de determinaciones reales aquel valor deja de ser interesante, pues la DI de *E. coli* O157:H7 es muy baja (10 microorganismos). En el sistema de detección cronopotenciométrico (Lei, J., 2015), la utilización de un sistema FIA lo transforma en un sistema de detección más complejo, debido al número de elementos que componen estos sistemas (bombas peristálticas, tubos de plástico, válvulas de inyección, etc). A pesar de la complejidad del equipamiento en el sistema FIA, este tiene la ventaja de poder realizar una detección en forma continua, rápida y reproducible. Además acoplado a un sistema de filtración en línea, el sistema FIA puede ser usado para detectar bacterias en muestras reales con matrices complejas. Aunque el LOD alcanzado



en este sistema (10 CFU/mL) es un valor bajo, no es suficiente en la práctica para la detección de *E. coli* O157 en muestras reales. Esta es una bacteria productora de la toxina verocitotoxina, causante del síndrome hemolítico urémico, importante factor de mortalidad y falla renal (Khanna, R., 2008). Como ya se ha mencionado anteriormente, la DI para este patógeno es de 10 microorganismos (Leggett, H.C., 2012), un valor muy reducido y que lo transforma en un desafío para el desarrollo de sistemas orientados a su detección.

El sistema FIA con detección cronopotenciométrica (Lei, J., 2015) se contrapone con el sistema de Zelada–Guillén (Zelada-Guillén, G.A., 2010), y en general con los biosensores electroquímicos, los cuales son relativamente pequeños y se pueden adaptar más fácilmente a plataformas portables.

En la estrategia utilizada por Luo (Luo, C., 2012) para la detección de *E. coli* O111, los sucesivos pasos de incubación requeridos para llegar a realizar las medidas electroquímicas (incubación de la bacteria más incubación de la sonda de detección) provocan un incremento del tiempo total de análisis. Por otro lado, *E. coli* O111 es uno de los causante de brotes de diarrea infantil severa (Campos, L.C., 1994), con una DI estimada en menos de 100 microorganismos (Paton, J.C., 1998), lo que implica que el resultado de este biosensor no cumple las expectativas de tener mediciones convenientes.

El último biosensor electroquímico expuesto en este apartado comparó la utilización de aptámeros individuales con un cóctel de tres aptámeros. El resultado fue una reducción en el LOD de uno a dos órdenes de magnitud cuando se combinan tres aptámeros. Probablemente al tener diferentes aptámeros con afinidades por diferentes sitios de la bacteria, esto conlleva a que el microorganismo quede “anclado” a la superficie del electrodo por muchos más sitios que en el caso de un solo aptámero. Esta es una estrategia simple, debido a que una vez funcionalizada la superficie del electrodo con los aptámeros, las medidas electroquímicas son inmediatas luego de la incubación con las bacterias. Aunque hubo una reducción en el LOD al pasar de uno a tres aptámeros, sigue

siendo un valor alto al compararlo, por ejemplo, con el trabajo de Zelada-Guillén (Zelada-Guillen, G.A., 2010)

## **2.4. Detección de bacterias del género *Shigella***

Dentro de la familia de las Enterobacteriaceae, *Shigella* es una de las que tiene mayor incidencia dentro de las enfermedades transmitidas por alimentos, tal como la Shigellosis. Esta enfermedad es comúnmente conocida como disentería bacilar aguda (Sur, D., 2004). Dos de las especies de relevancia en este tipo de problemas son *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*) y *Shigella sonnei* (*S. sonnei*).

### 2.4.1. Detección óptica

#### *Fluorescencia*

En relación a *S. sonnei* se utilizaron dos aptámeros de ADN destinados a detectar la bacteria, con  $K_D$  de 5.98 nM y 14.32 nM. Para ello se incubó uno de los aptámeros biotinilado en una microplaca modificada con estreptavidina. Posteriormente se agregaron las bacterias, que fueron capturadas por el aptámero inmovilizado, y finalmente se incubó el segundo aptámero conjugado con hexaclorofluoresceína que se enlazó a las bacterias capturadas (Figura 2.20). Se midieron los cambios en la intensidad de fluorescencia, lográndose detectar la bacteria con un LOD de 30 CFU/mL y un rango lineal de  $10^2 - 10^7$  CFU/mL (Gong, W., 2015).

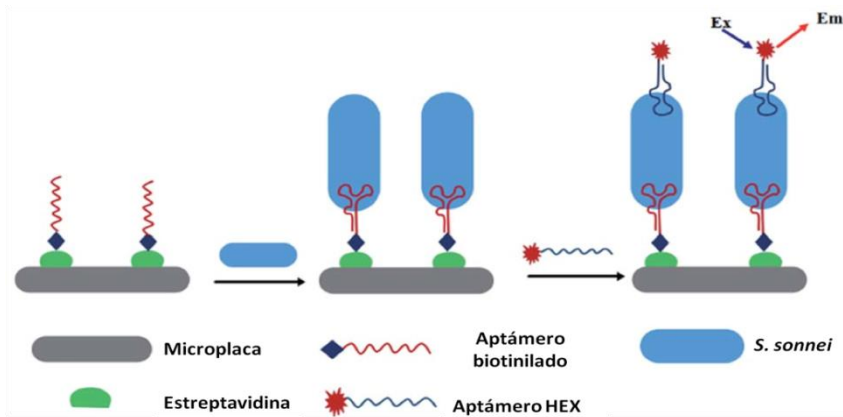


Figura 2.20. Ilustración del ensayo tipo sándwich con dos aptámeros (captura y detección) para detectar *S. sonnei* (Gong, W., 2015).

Respecto a *S. dysenteriae*, una de las especies causante de la más grave disentería, se ha reportado la selección de un aptámero de ADN mediante Cell-SELEX, con una  $K_D$  de 23.47 nM. La estrategia de detección utilizada con este aptámero fue similar al trabajo anterior (Gong, W., 2015). Esta vez el aptámero fue marcado con el fluoróforo FAM para ser utilizado en una microplaca recubierta con avidina. Finalmente se realizaron medidas de intensidad de fluorescencia con un espectrofluorómetro, obteniéndose un LOD de 50 CFU/mL (Duan, N., 2013b).

Ambos sistemas de detección alcanzaron LODs muy similares, con una estrategia relativamente sencilla, en donde la interacción aptámero-bacteria se efectuó en un soporte como es la microplaca. Los sucesivos tiempos de incubación de los diferentes elementos que componen la estrategia (bacteria y aptámero marcado con fluoróforo) llevan a que se incremente el tiempo total de análisis, siendo esto una desventaja si se compara con otros sistemas que requieren de menos pasos en el procedimiento general de detección. Por otro lado, si tomamos en consideración que las DIs de *S. sonnei* y *S. dysenteriae* son 500 y 10 microorganismos respectivamente (Kothary, M.H., 2001), podemos concluir que los LODs obtenidos no son lo suficientemente bajos para lograr una utilización efectiva de los sistemas de detección, especialmente para el caso de *S. dysenteriae*.

## 2.5. Detección de bacterias del género *Streptococcus*

Entre los patógenos correspondiente al género *Streptococcus* hay algunas especies que producen enfermedades como infecciones supurativas, fascitis necrotizante, escarlatina, síndrome de shock tóxico estreptocócico (STSS), infecciones sistémicas invasivas y endocarditis. Un ejemplo de estos patógenos es el *Streptococcus* del grupo A, denominado GAS por las siglas Group A *Streptococcus* y también llamado *Streptococcus pyogenes* (Shi, X., 2014).

### 2.5.1. Detección óptica

#### *Colorimetría*

Savory y colaboradores desarrollaron un aptasensor colorimétrico para la detección de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), un patógeno cariogénico que es el agente etiológico predominante de la caries dental (Savory, N., 2014). El sistema de detección se preparó inmovilizando el aptámero tiolado sobre oro coloidal. Este complejo Au-aptámero se agregó a una solución que contenía *S. mutans* y después de un periodo de incubación, la solución del complejo Au-aptámero-bacteria se filtró mediante una membrana de afinidad para capturar la bacteria. Este tipo de membranas construidas de polímeros sintéticos están modificadas con moléculas que tienen una alta afinidad por otras moléculas las cuales se desean separar, como proteínas por ejemplo. Finalmente se realizó una detección colorimétrica del oro coloidal que quedó unido a la bacteria retenida sobre la membrana. Con este sistema se obtuvo un LOD de  $10^5$  CFU/mL con un rango lineal de detección de  $10^5 - 10^8$  CFU/mL (Savory, N., 2014).

## 2.5.2. Detección piezoeléctrica

Se desarrolló un biosensor piezoeléctrico para la detección de la bacteria GAS basado en un aptámero de ADN, alcanzando un LOD de 12 CFU/mL con un rango de detección lineal de  $3 \times 10^2 - 3 \times 10^6$  CFU/mL en un tiempo de ensayo de 40 min. Para llevar a cabo tal detección, la superficie de oro de un electrodo interdigitado (IDE) se modificó con p-aminotiofenol (Figura 2.21). Luego mediante enlaces amida entre grupos amino del p-aminotiofenol y grupos carboxilo de SWCNTs se inmovilizaron estos últimos sobre la superficie del IDE. Finalmente el aptámero se unió a los SWCNTs mediante enlaces tipo apilamiento  $\pi$ - $\pi$ . La presencia de la bacteria diana y su unión al aptámero causó el desacoplamiento de este, dejando los SWCNTs libres, generando así cambios en la frecuencia del sensor piezoeléctrico de QCM (Shi, X., 2014).

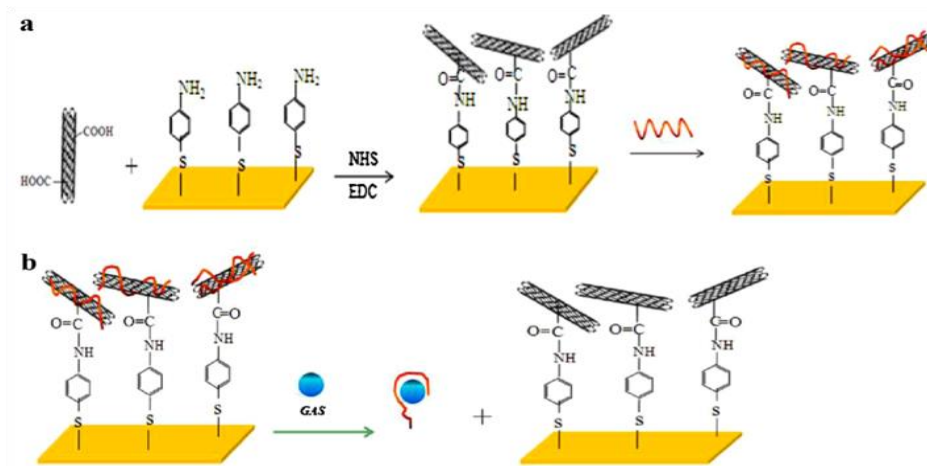


Figura 2.21. Diagrama esquemático para (a) la modificación de un IDE con aptámero y (b) la detección de la bacteria GAS basada en el desacoplamiento de los aptámeros desde los SWCNTs para unirse a la bacteria GAS (Shi, X., 2014).

Ambos sistemas de detección difieren significativamente en los resultados obtenidos. Casi 10000 veces más pequeño resultó el LOD en el sistema de detección piezoeléctrico, además de proporcionar un rango de detección lineal más amplio. El tiempo de análisis del sistema piezoeléctrico una vez construido el

aptasensor es un tiempo suficientemente corto (40 min), pues basta la presencia de la bacteria para producir un cambio en la frecuencia. Por otra parte el sistema con oro coloidal requiere un primer paso de incubación con la bacteria para posteriormente continuar con un procedimiento de filtración y finalmente realizar las medidas de fluorescencia. Esto implica un incremento sustancial del tiempo de análisis.

## **2.6. Detección de bacterias del género *Staphylococcus***

Dentro de los patógenos bacterianos que más se utilizan como diana para el desarrollo de aptasensores, de acuerdo a nuestra revisión bibliográfica, se encuentra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Esta bacteria es un patógeno bacteriano importante que produce una variedad de toxinas y causa una amplia gama de infecciones, incluyendo la infección de los tejidos blandos, la intoxicación alimentaria estafilocócica, e incluso enfermedades potencialmente mortales, como la neumonía, endocarditis, osteomielitis, artritis y sepsis (Zelada-Guillen, G.A., 2012).

### 2.6.1. Detección óptica

#### *Colorimetría*

Yuan y colaboradores desarrollaron un sistema colorimétrico para la detección de *S. aureus* en una microplaca, en la cual un aptámero de ADN biotinilado se inmovilizó sobre los pocillos modificados con avidina (Yuan, J., 2014b). Posteriormente se agregaron a los pocillos consecutivamente los siguientes elementos: la bacteria diana, el conjugado aptámero-biotinilado/estreptavidina-HRP, tiramina biotinilada (amplificación de la señal), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y avidina-catalasa. Después de esto la catalasa consumió el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente y se agregó cloruro de oro (III) trihidratado que produjo un cambio de color en los pocillos (Figura 2.22).

Finalmente se realizaron medidas de absorbancia, obteniendo un LOD de 9 CFU/mL y un rango de detección lineal de  $10 - 10^6$  CFU/mL (Yuan, J., 2014b).

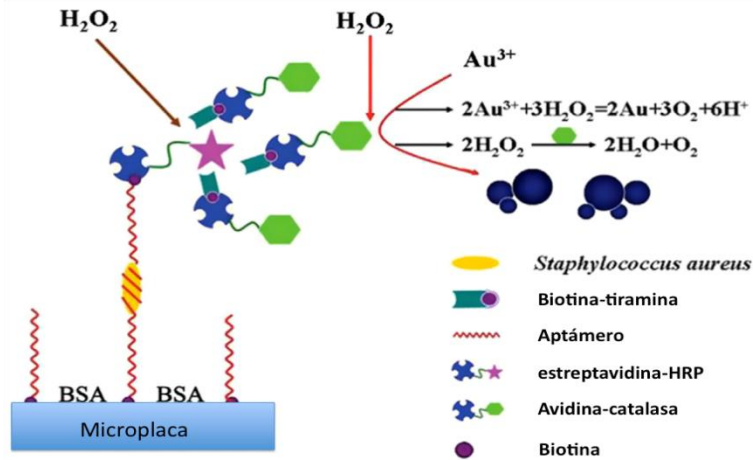


Figura 2.22. Ilustración de la detección colorimétrica de *S. aureus* basada en la amplificación de la señal mediante tiramina (Yuan, J., 2014b).

El mismo autor realizó una variante al sistema de detección anterior para la detección de *S. aureus*. Esta vez se utilizó 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en vez del cloruro de oro (III) trihidratado para generar un cambio de color. El LOD resultante fue de 8 CFU/mL, con un rango de detección de  $10 - 10^7$  CFU/mL (Yuan, J., 2014c).

El autor de los trabajos antes descritos para *S. aureus* siguió la misma estrategia para la detección de *S. typhimurium* (Yuan, J., 2014a), con la variante que en este caso el aptámero secundario fue marcado con GNPs como catalizador para la reducción de iones  $Ag^+$ . Desde el punto de vista de los resultados en los parámetros de comportamiento de los sistemas de detección, tanto el LOD como el rango lineal fueron prácticamente iguales, con valores bastante reducidos en el caso de los LODs. A diferencia del caso de *S. typhimurium* estos valores de LOD de 9 y 8 CFU/mL para la detección colorimétrica de *S. aureus* son valores útiles, puesto que la DI de estos microorganismos es relativamente alta ( $10^5$  bacterias) (Leggett, H.C., 2012).

### *Dispersión de luz*

Posteriormente se logró un LOD muy bajo (1 CFU/mL) para la detección de *S. aureus* utilizando dos métodos alternativos de detección óptica. Ambos métodos se basaron en el uso de GNPs conjugadas con un aptámero biotinilado (Aptámero1-GNPs). Esta conjugación se realizó por intermedio de un ADN tiolado parcialmente complementario con el aptámero (Figura 2.23 a). En el primer método (detección directa), luego de incubar directamente el conjugado Aptámero1-GNPs con *S. aureus*, se eluyeron los complejos ADN-GNPs unidos a la bacteria (Figura 2.23 b). En el segundo método (amplificación por partículas), se incubaron las bacterias con el conjugado Aptámero1-GNPs y partículas magnéticas conjugadas con un aptámero aminado (Aptámero2-MPs) (Figura 2.27 c). El complejo resultante se aisló mediante un magneto. Luego se eluyó el Aptámero1 y se incubó con un exceso de ADN-GNPs y estreptavidina-MPs. El ADN-GNPs se capturó con estreptavidina-MPs en presencia del Aptámero1 (biotinilado) tras su hibridación con el ADN complementario del ADN-GNP. Finalmente se eluyeron los complejos ADN-GNPs. Por ambos métodos se analizó la intensidad de la señal de la luz dispersada luego de excitar las GNPs con luz laser de longitud de onda de 638 nm. Los aptámeros utilizados en esta nueva estrategia fueron ambos de ADN con  $K_{DS}$  de 129 y 35 nM para el aptámero biotinilado y el aminado respectivamente. El tiempo de ensayo fue de 1.5 h (Chang, Y.C., 2013).



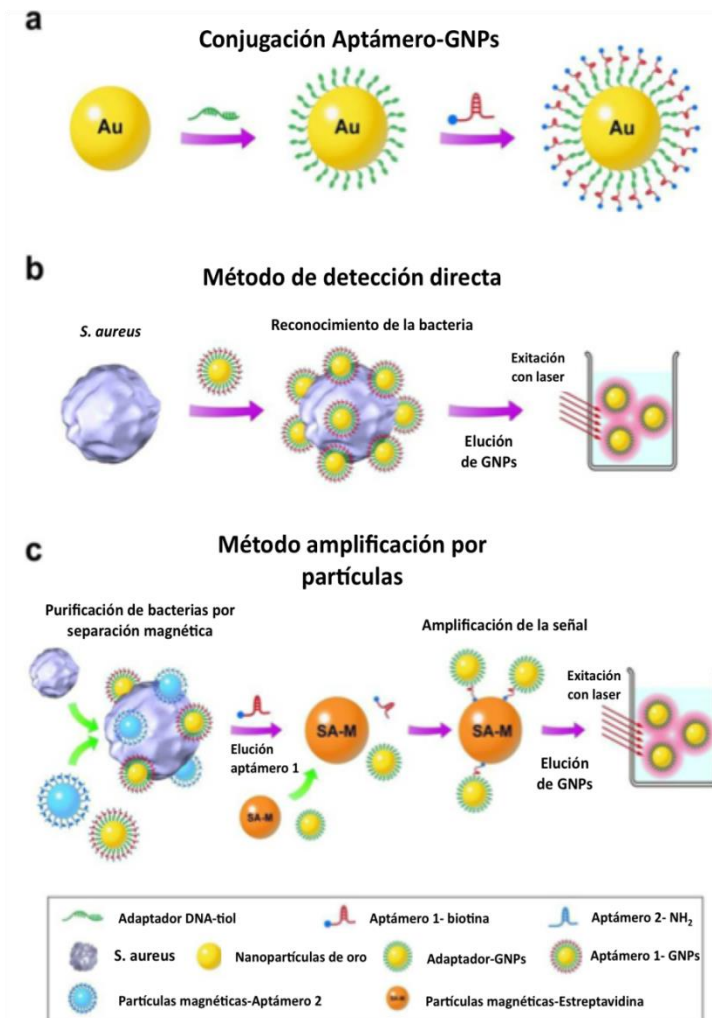


Figura 2.23. Diagrama que muestra los pasos seguidos para la detección directa y amplificada de *S. aureus* (Chang, Y.C., 2013).

En esta estrategia de detección se combinó una vez más el aptámero con GNPs para la detección de *S. aureus*. La amplificación, gracias a las partículas magnéticas y las GNPs, permitió alcanzar un LOD muy bajo (1 CFU/mL) en un tiempo relativamente corto (1.5 h). Este es uno de los LOD más bajos logrados, no solo dentro de los ensayos colorimétricos, sino también considerando la totalidad de los trabajos mostrados. Si bien es un LOD muy bueno y un tiempo de análisis considerablemente corto, el número de elementos involucrados en el proceso de detección, particularmente en la amplificación por partículas, es muy alto y esto hace que la estrategia sea un tanto vulnerable a los cambios de las condiciones óptimas de cualquiera de los elementos participantes.

## 2.6.2. Detección electroquímica

### *Sistemas electroquímicos*

En un intento por lograr buenos parámetros de comportamiento en la detección de *S. aureus*, se diseñó una estrategia nueva utilizando dos aptámeros con diferente modificación: biotinilado y tiolado. El aptámero biotinilado primario (aptámero de captura) se inmovilizó sobre partículas magnéticas cubiertas con estreptavidina (Figura 2.24). El aptámero tiolado secundario (aptámero señal) se conjugó con nanopartículas de plata (AgNP). En presencia de la bacteria diana se formó el complejo aptámero/bacteria/AgNP sobre las partículas magnéticas. Mediante voltametría de redisolución anódica de las AgNPs se detectó y cuantificó la bacteria. El LOD calculado fue de 1 CFU/mL, con un rango de detección dinámico de  $10 - 10^6$  CFU/mL (Abbaspou, B., 2014).

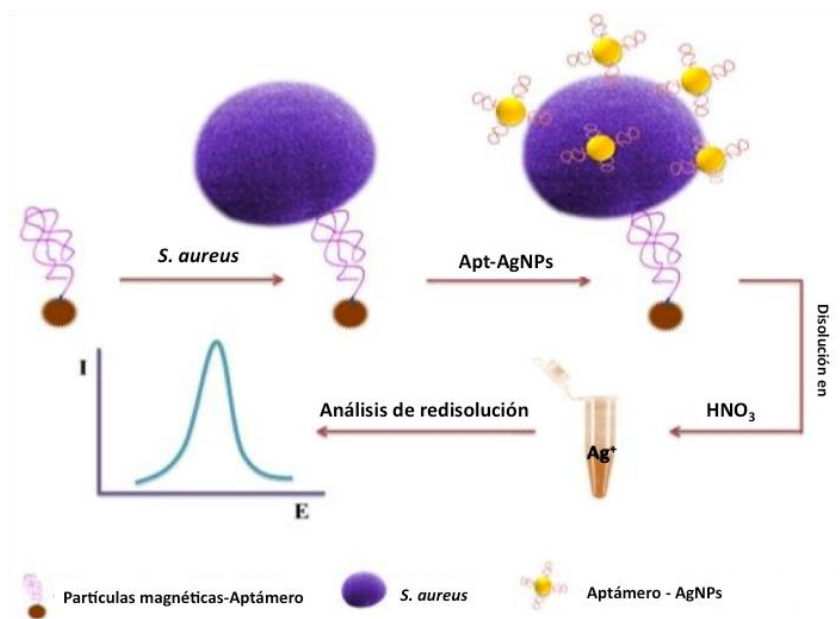


Figura 2.24. Representación esquemática de la determinación electroquímica de *S. aureus* basada en el uso de AgNPs conjugadas con aptámero (Abbaspou, B., 2014).

## Biosensores electroquímicos

En uno de los primeros trabajos desarrollados para la detección de *S. aureus*, los autores aplicaron la misma estrategia utilizada en la detección potenciométrica de *S. typhi*, basada en la unión de la bacteria al aptámero immobilizado via enlace amida sobre SWCNTs, estos últimos utilizados como nanomaterial transductor de señal (Zelada-Guillén, G.A., 2009). En este trabajo se utilizaron dos aptámeros, uno modificado con un grupo amino y el otro con un grupo pirenil para su enlace covalente y no covalente respectivamente a SWCNTs (Figura 2.25). Se realizaron medidas potenciométricas en presencia y ausencia de la bacteria, lográndose un LOD de 800 CFU/mL con la funcionalización covalente, y  $10^7$  CFU/mL con la no covalente, con un tiempo de respuesta corto ( $< 1$  min) (Zelada-Guillén, G.A., 2012).

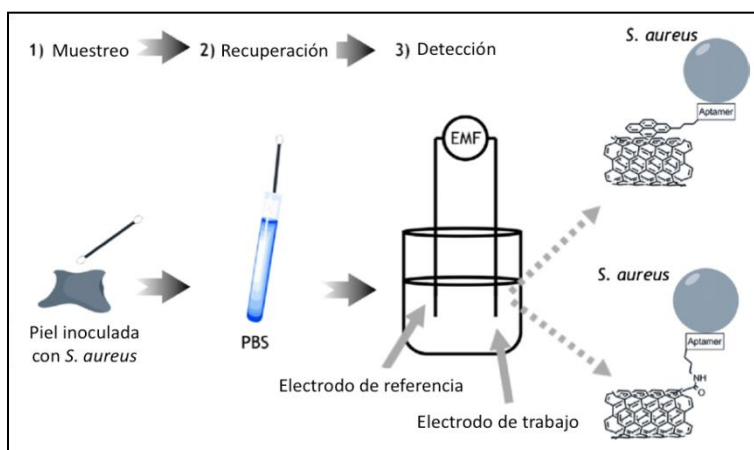


Figura 2.25. Secuencia en la estrategia de detección de *S. aureus*, basado en el acople-desacople del aptámero sobre los SWCNTs (Zelada-Guillén, G.A., 2012).

Los resultados del LOD difieren en forma considerable dependiendo de la funcionalización utilizada para inmovilizar el aptámero sobre los SWCNTs. El biosensor con funcionalización covalente logró detectar concentraciones de *S. aureus* cinco órdenes de magnitud por debajo del correspondiente biosensor con funcionalización no covalente. Por otro lado el biosensor con funcionalización no

covalente mostró rangos de detección lineal más limitados, pero con una sensibilidad más alta que su homólogo con funcionalización covalente (Zelada-Guillen, G.A., 2012).

Un novedoso biosensor potenciométrico para la detección de *S. aureus* se desarrolló utilizando dos tipos de funcionalización diferente (covalente e interacciones  $\pi$ - $\pi$ ) de un aptámero de ADN sobre electrodos de carbón modificados (Figura 2.26).

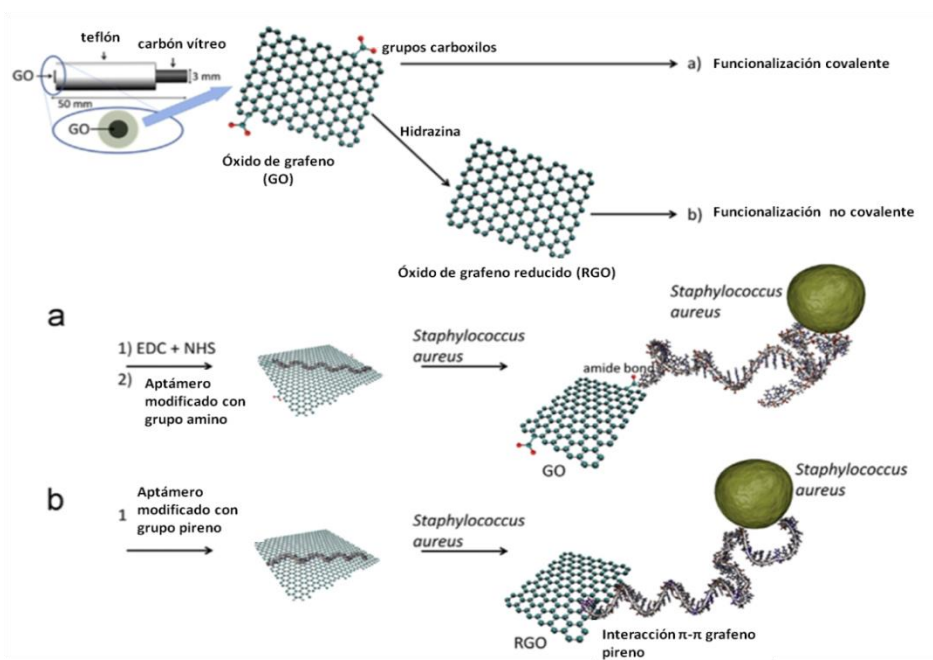


Figura 2.26. Esquema del proceso de funcionalización y detección de *S.aureus*. Arriba: Ilustración esquemática del aptasensor potenciométrico. (a) Funcionalización covalente de GO con el aptámero anti-*S. aureus*. (b) Funcionalización no covalente de RGO con el aptámero anti-*S. aureus* (Hernandez, R., 2014).

Uno de los aptámeros fue modificado con un grupo pireno y el otro con un grupo amino. Se modificó la superficie de los electrodos de carbón vítreo con GO y óxido de grafeno reducido (RGO) para ser usados como transductor y superficie de anclaje de los aptámeros conjugados con los grupos amino y pireno respectivamente. Luego de inmovilizar los aptámeros en los correspondientes

electrodos, mediante enlaces amida e interacciones  $\pi$ - $\pi$  respectivamente, estos se incubaron con la bacteria diana y se llevaron a cabo medidas potenciométricas. No hubo diferencias respecto al LOD (1 CFU/mL) usando ambas estrategias de funcionalización y el tiempo usado en el ensayo fue de 1 – 2 min (Hernández, R., 2014).

Otra estrategia que también explota el uso de RGO, se basa en el uso de un aptámero de ADN tiolado que se autoensambló sobre GNPs unidas a RGO, este último adsorbido sobre la superficie de un electrodo de carbón vítreo (Figura 2.27). Se detectaron y registraron cambios de corriente, específicamente las variaciones en la resistencia a la transferencia de carga por medio de EIS en función de la presencia o ausencia de *S. aureus*. 10 CFU/mL fue el LOD calculado y el rango lineal de detección fue  $10 - 10^6$  CFU/mL (Jia, F., 2014).

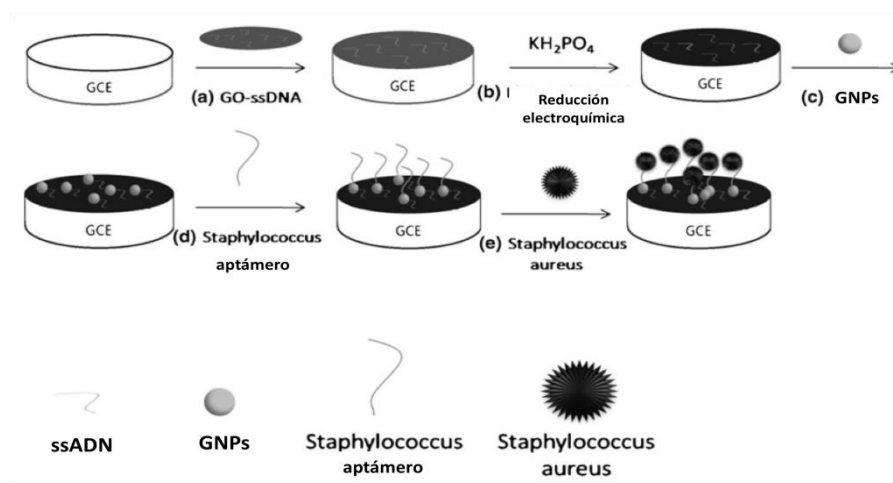


Figura 2.27. Representación esquemática de la modificación de la superficie del electrodo de carbón vítreo y de la detección de *S. aureus* (Jia, F., 2014).

De los trabajos de detección de *S. aureus* previamente descritos, en dos de ellos se utilizó la potenciometría como técnica de detección electroquímica. Las estrategias fueron similares, solo se diferenciaron por el nanomaterial utilizado como transductor. En el trabajo de Zelada-Guillén (Zelada-Guillen, G.A., 2012) se

utilizaron SWCNTs y en el de Hernández (Hernandez, R., 2014) se utilizó tanto el GO como el RGO, siendo el GO el equivalente al SWCNT para la funcionalización covalente de los aptámeros correspondientes. El aptámero utilizado en ambos trabajos fue el mismo (Cao, X., 2009). A pesar de las similitudes de ambos trabajos, los LODs fueron bastantes diferentes (800 y 1 CFU/mL respectivamente), aunque los tiempos de detección fueron similares, tiempos de respuesta cortos.

El otro sistema de detección desarrollado, con el cual se lograron parámetros de detección interesantes fue el de Abbaspou (Abbaspou, B., 2014) con una detección mínima de 1 CFU/mL y un rango muy amplio de detección,  $10 - 10^6$  CFU/mL . En este sistema tanto las partículas magnéticas, como herramienta para capturar y concentrar las bacterias, como las AgNPs, permitieron incrementar la señal. De manera similar las GNPs en el trabajo de Jia (Jia, F., 2014) ayudaron al incremento de la señal, además de utilizar el GO como transductor. La utilización de estos nanomateriales junto a la técnica EIS permitió alcanzar un LOD bajo, aunque no llegó a superar los límites logrados por los trabajos previamente analizados.

Analizando todos los estudios relativos a la detección de *S. aureus*, se observa que en general se lograron buenos resultados, en especial los relativos a los LODs. De acuerdo a Hennekinne (Hennekinne, J.A., 2012) se ha determinado la intoxicación alimentaria estafilocócica, debida a la presencia de la toxina estafilococal en restos de alimentos, con una concentración de  $10^5$  bacterias por gramo de alimento. Por tanto los resultados obtenidos son efectivos a la hora de desarrollar un dispositivo para la detección de esta bacteria en muestras reales.

## **2.7. Detección de bacterias del género *Listeria***

El género *Listeria* contiene seis especies, de las cuales dos son patógenas: *Listeria monocytogenes*, causante de enfermedades transmitidas por alimentos en humanos, y *Listeria ivanovii*, un patógeno animal (Khelef, N., 2006).

*Listeria monocytogenes* (*L. monocitogenes*) puede causar listeriosis, una grave enfermedad con altos niveles de hospitalización y casos de muerte. El principal síndrome clínico asociado con la listeriosis incluye la infección del sistema nervioso, causando meningitis (Duan, N., 2013c).

### 2.7.1. Detección por PCR

Suh y colaboradores desarrollaron un sistema de detección para *L. monocitógenes* (Figura 2.28) siguiendo la estrategia previamente descrita por Dwivedi para *S. typhimurium* (Dwivedi, H.P., 2013). Se conjugaron partículas magnéticas modificadas con estreptavidina con un aptámero biotinilado de  $K_D$  de 35.7  $\mu\text{M}$  para capturar la bacteria. Tras la extracción del ADN de la bacteria y su posterior amplificación por qPCR, el LOD estimado fue de 20 – 200 CFU/mL (Suh, S.H., 2013). Si se compara este resultado con el obtenido para la detección de *S. typhimurium* (Dwivedi, H.P., 2013) vemos que el LOD obtenido para *L. monocitógenes* es un orden de magnitud menor. Probablemente la mayor afinidad del aptámero para *L. monocitogenes* ( $K_D = 35.7 \mu\text{M}$ ), respecto del correspondiente para *S typhimurium* ( $K_D = 1.73 \mu\text{M}$ ), produjo esta variación en el resultado final.

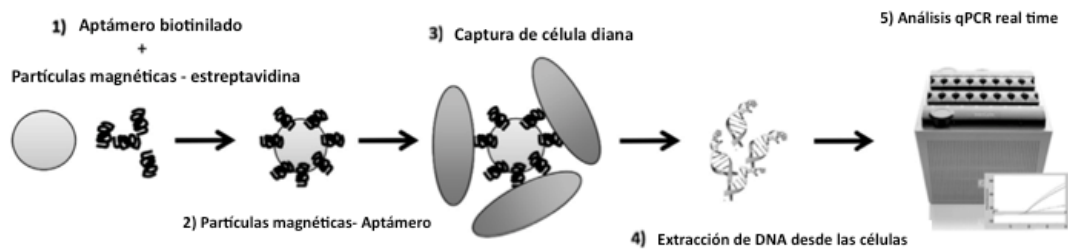


Figura 2.28. Diagrama de flujo del ensayo de captura magnética mediado por el aptámero y la detección por qPCR del ADN extraído (Suh, S.H., 2013).

La utilización de partículas magnéticas modificadas con aptámero a través de la interacción de la estreptavidina inmovilizada sobre las partículas y la biotina enlazada al aptámero es una herramienta complementaria que se utiliza en forma

recurrente como sistema de captura y concentración que permite la amplificación de señal. En este caso la concentración de las células de *L. monocytogenes* posibilitó la extracción del ADN necesario para la detección de la bacteria diana por PCR.

## 2.7.2. Detección óptica

### *Fluorescencia*

En la siguiente estrategia de detección de *L. monocytogenes*, basada en una configuración tipo sándwich, se utilizó un aptámero con  $K_D$  de 48.74 nM. El aptámero biotinilado se inmovilizó sobre una microplaca. Luego de incubar la bacteria diana, se agregó el mismo aptámero pero marcado con FAM y se realizaron medidas de fluorescencia. El LOD determinado fue de 75 CFU/mL y se obtuvo un rango de detección de  $10^2 - 10^7$  CFU/mL (Duan, N., 2013c).

Otra estrategia basada en detección óptica utilizando aptámeros para la detección de *L. monocytogenes* consistió en utilizar un aptámero específico para la proteína internalina A. Este aptámero se usó en un sensor de fibra óptica junto con un anticuerpo en una configuración tipo sándwich. Un anticuerpo policlonal biotinilado fue inmovilizado sobre la superficie de una fibra óptica, modificada con estreptavidina, para la captura de la bacteria. Luego el conjugado aptámero-Alexa Fluor 647 reportó la señal correspondiente a la presencia de *L. monocytogenes*. El LOD logrado fue de  $10^3$  CFU/mL (Ohk, S.H., 2010).

Los dos sistemas de detección por fluorescencia, uno basado en microplaca y el otro en fibra óptica como soporte sólido, utilizan la estrategia tipo sándwich. En el primer caso, es un sándwich con un único aptámero modificado con biotina o FAM para ser utilizado en los pasos de captura y detección respectivamente. En el segundo caso, un anticuerpo participa en la configuración sándwich para realizar la captura, mientras que un aptámero marcado con Alexa Fluor 647 permite la



detección. Los resultados muestran una diferencia en los parámetros calculados, lográndose mejores resultados con el sistema en microplaca, por cuanto hay una diferencia en el LOD mayor a un orden de magnitud ( $7.5 \times 10^1$  versus  $10^3$  CFU/mL).

### 2.7.3. Detección electroquímica

#### *Sistemas electroquímicos*

La misma estrategia utilizada para detectar potenciométricamente la presencia de *E. coli* O157 (Lei, J., 2015) se utilizó para la detección de *L. monocytogenes* (Figura 2.29). En ausencia de la bacteria diana, el aptámero con carga negativa interacciona electrostáticamente con los grupos guanidino de carga positiva, inhibiendo la respuesta potenciométrica de la protamina. En presencia de la bacteria, el aptámero se une a la bacteria evitando que el aptámero interactúe con la protamina, lo cual permite que la protamina sea detectada por el electrodo de membrana sensible al policatión. Las medidas potenciométricas permitieron detectar indirectamente la bacteria con un LOD de 10 CFU/mL (Ding, J., 2014).

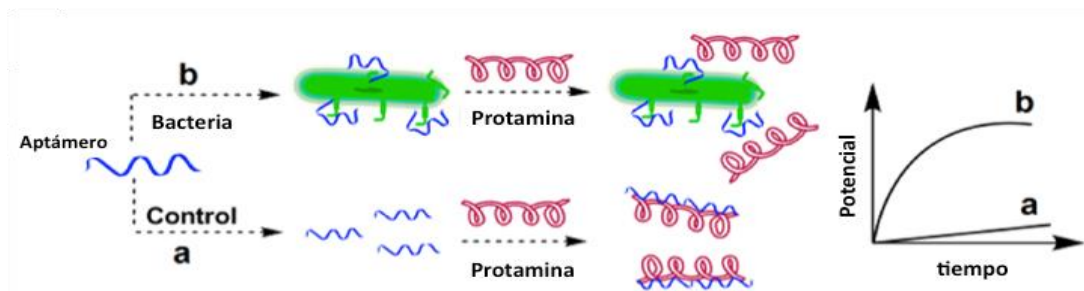


Figura 2.29. Ilustración esquemática del aptasensor potenciométrico de células bacterianas utilizando un electrodo de membrana sensible al policatión protamina (Ding, J., 2014).

#### *Biosensores electroquímicos*

Otra especie de *Listeria* utilizada como diana para ser detectada mediante un aptasensor es *Listeria innocua* (*L. innocua*). Aunque se reporta normalmente como

una bacteria inofensiva, sí hay antecedentes de que puede causar enfermedades en humanos (Perrin, M., 2003). La detección de esta bacteria se realizó en una plataforma de nanomateriales híbridos, basada en RGO y nanoplatino (Figura 2.30). Estos se depositaron sobre un electrodo de Pt/Ir para mejorar la transducción electroquímica durante el evento de reconocimiento. Un aptámero tiolado con afinidad por la proteína internalina A de *L. innocua* se inmovilizó sobre la superficie del electrodo y posteriormente se incubó la bacteria diana. Se realizaron medidas de voltametría cíclica y EIS. El LOD alcanzado con EIS fue de 100 CFU/mL, con un tiempo de análisis de 3 h (Vanegas, D.C., 2015).

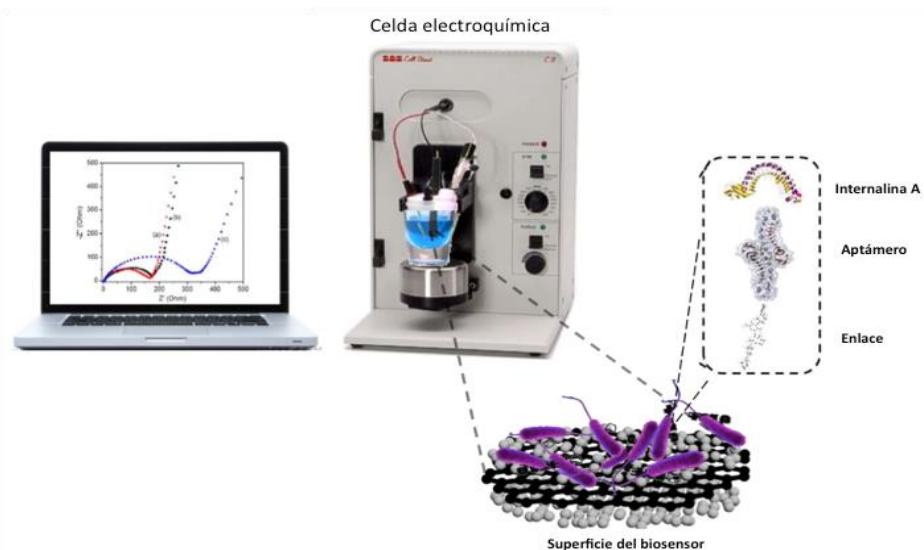


Figura 2.30. Enfoque conceptual usado para crear un aptasensor electroquímico para la detección de *Listeria spp.* El biosensor está formado por un material transductor compuesto de un híbrido metal-grafeno y un aptámero como sonda de captura (Vanegas, D.C., 2015).

Ambos sistemas de detección electroquímica difieren en un orden de magnitud en cuanto al LOD alcanzado, siendo menor en el sistema potenciométrico. El sistema de detección potenciométrico desarrollado por Ding (Ding, J., 2014) es más sencillo desde el punto de vista del aptámero, el cual no requiere ninguna modificación. Además dado que la detección se realiza en solución mediante el electrodo de membrana, no requiere el uso de superficies modificadas con

nanomateriales para la inmovilización del aptámero, como en el caso del trabajo realizado por Vanegas (Vanegas, D.C., 2015).

De acuerdo al estudio realizado por Leggett (Leggett, H.C., 2012) la DI de *L. monocytogenes* es  $10^3$  microorganismos, por lo tanto de los trabajos presentados para la detección de este patógeno, el correspondiente a Ding (Ding, J., 2014) es el que tiene mayores expectativas de ser aplicado en la evaluación de muestras reales, debido a su bajo LOD.

## **2.8. Detección de bacterias del género *Bacillus***

El género *Bacillus* incluye un rango de especies de interés humano. Esto se debe principalmente a: (1) el uso de bacterias pertenecientes a este género en aplicaciones industriales; (2) el empleo de esporas como sistema modelo para estudiar la diferenciación celular bacteriana y su resistencia a agentes o tratamientos descontaminantes; y (3) el rol de ciertas especies *Bacillus* que causan enfermedades en el humano (Økstad, O.A., 2011). Este género incluye tanto agentes causantes de graves enfermedades como el ántrax, como especies que sintetizan antibióticos importantes.

Se han encontrado dos trabajos con aptámeros desarrollados para la detección de especies de *Bacillus*, ambos basados en detección por fluorescencia. Uno relacionado a *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) y el otro a *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*)

### 2.8.1. Detección óptica

#### *Fluorescencia*

Entre los sistemas de detección basados en aptámeros para detectar especies de este género encontramos el desarrollado para *B. thuringiensis*. Esta bacteria es

perjudicial para el ser humano a concentraciones muy elevadas ( $10^{11}$  CFU/mL). El sistema de detección utilizó un aptámero tiolado que se conjugó con puntos cuánticos (QD) de CdSe, los cuales emiten fluorescencia a 655 nm, para formar el complejo aptámero-QD. Se incubó este complejo con la bacteria diana y se realizaron medidas de fluorescencia, llegando a un LOD de  $10^3$  CFU/mL (Ikanovic, M., 2007).

Dentro de las especies peligrosas está *B. anthracis*, causante del ántrax. En la estrategia desarrollada por Bruno (Bruno, J.G., 2012), se utilizó un aptámero con afinidad hacia el azúcar antrosa, localizado en el exosporium de la espora de *B. anthracis*. El aptámero se utilizó como baliza y fue marcado en 5' con el fluoróforo TYE 665 y en 3' con el quencher Iowa Black. Luego se incubó con una solución de bacterias diana y se hicieron medidas de fluorescencia, obteniéndose un LOD de  $3 \times 10^4$  esporas/mL.

Aunque ambos trabajos utilizaron la fluorescencia como señal de detección, el medio para lograrla fue distinto. En un caso se utilizaron QDs, los cuales son nanocristales fluoróforos cuya excitación y emisión son fundamentalmente diferentes a las de los fluoróforos orgánicos tradicionales (Deerinck, T.J., 2008) como el utilizado en el segundo trabajo de detección. Ambos LODs resultaron altos, con un mejor parámetro para el primer caso. La DI correspondiente a *B. anthracis* es de aproximadamente  $2 \times 10^4$  bacterias (Leggett, H.C., 2012), lo que incapacita al sistema de detección desarrollado por Bruno (Bruno, J.G., 2012).

## **2.9. Detección de bacterias del género *Campylobacter***

*Campylobacter* es bien reconocida como una de las principales causas de enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos. Los síntomas pueden ir desde leves a serias infecciones en los niños y en los adultos y síntomas neurológicos permanentes (Silva, J., 2011).

## 2.9.1 Detección óptica

### Fluorescencia

Se ha desarrollado un sistema de detección para *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) con la ayuda de dos aptámeros con alta afinidad para proteínas superficiales de la bacteria. Estos aptámeros fueron utilizados en un ensayo tipo sándwich (Figura 2.31), siendo modificados con QDs o partículas magnéticas, según si actúan para la detección o captura de la bacteria respectivamente. El ensayo se evaluó midiendo fluorescencia, utilizando tanto bacterias muertas como vivas, mostrando un LOD de 2.5 CFU/mL en solución tampón y de 10 – 250 CFU/mL en varias matrices de alimentos, con un tiempo de detección de 15 a 20 min. El ensayo mostró baja reactividad cruzada con especies fuera del género *Campylobacter*, pero mostró una importante reactividad cruzada con *C. coli* y *C. lari* (Bruno, J.G., 2009).

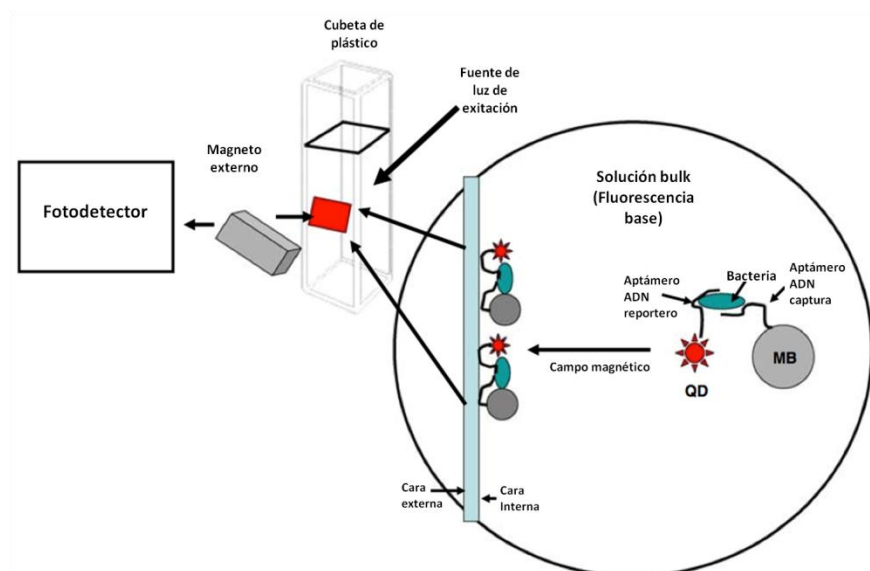


Figura 2.31. Enfoque conceptual del ensayo tipo sandwich con dos aptámeros modificados con QDs o partículas magnéticas, para la detección de *C. jejuni* (Bruno, J.G., 2009).

Con este sistema de detección para *C. jejuni* se logró un LOD reducido en un tiempo de análisis bastante corto. La reactividad cruzada con *C. coli* y *C. lari* no es un problema sustancial dado que la campilobacteriosis, que es la gastroenteritis causada por *Campylobacter spp.*, no solo es causada por *C. jejuni*, sino también por *C. coli* y *C. lari* (Klena, J.D., 2004). *C. jejuni* tiene una DI de 550 microorganismos (Leggett, H.C., 2012), lo que implica que este LOD le entrega al sistema de detección una cierta holgura para realizar medidas en muestras reales.

## **2.10. Detección de bacterias de múltiples géneros.**

En este apartado se mostrarán sistemas de detección que han sido desarrollados para evaluar la presencia de dos o tres bacterias. Básicamente se encontrarán dos grupos: aquellos que el sistema les permite detectar simultáneamente dos o tres bacterias en una sola medición y aquellos que el sistema sólo permite la detección de un solo microorganismo. En los sistemas simultáneos los aptámeros se encuentran presentes en forma conjunta en el sistema de detección y la señal obtenida registra la presencia o ausencia de todas las bacterias examinadas. En el otro grupo encontramos sistemas que permiten la incorporación de un solo aptámero y por ende la señal registrada mostrará la presencia o ausencia de una sola bacteria. Estos sistemas cambian el aptámero y luego registran la presencia de otra bacteria, entregándole al sistema la capacidad de detectar múltiples patógenos, pero no simultáneamente.

### 2.10.1. Detección óptica

#### *Colorimetría*

La necesidad de desarrollar biosensores para la detección de *E. coli* O157:H7 y otras bacterias patógenas se ve reflejada en el diseño de aptasensores encontrados en la literatura. En uno de estos trabajos se utilizaron dos aptámeros, anti-*E. coli* O157:H7 y anti-*S. typhimurium* con afinidad por proteínas de las

membranas externas de las dos bacterias. Estos aptámeros se unieron con GNPs formando el complejo aptámero-GNP, que evita la aglomeración de las GNPs. La presencia de la bacteria diana provoca la desorción de los aptámeros desde los complejos aptámero-GNP. La adición posterior de una alta concentración de sal produjo la aglomeración de las GNPs, generando un cambio de color de rojo a púrpura (Figura 2.32). Con este diseño se lograron LODs de  $10^5$  CFU/mL para ambas bacterias en un tiempo de 20 min (Wu, W.H., 2012).

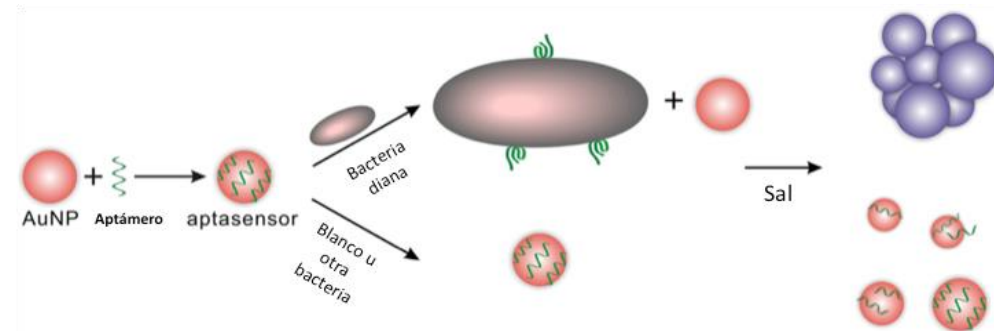


Figura 2.32. Principio experimental de la detección de bacteria utilizando aptámeros y GNPs (Wu, W.H., 2012).

En otro sistema de detección múltiple (Figura 2.33) para las bacterias *E. coli* O157:H7 y *E. coli* 8739 se utilizaron dos aptámeros diferentes contra proteínas de la membrana externa. Se usó un sistema de flujo lateral, basado en una estrategia sándwich con el mismo aptámero, para captura y detección, pero con modificaciones diferentes. El aptámero de captura se modificó con  $\text{NH}_2\text{-C}_6$  y se inmovilizó mediante UV en la membrana de nitrocelulosa de la tira para capturar la bacteria. El aptámero de detección se modificó con digoxigenina en 5' y biotina en 3'. Mediante la unión del complejo estreptavidina-QD (u oro coloidal) se visualizó la presencia de la bacteria. Los resultados mostraron unos LODs de 3000 células de *E. coli* 8739 y 6000 células de *E. coli* O157:H7 vivas por prueba, visibles mediante la detección con oro coloidal. El resultado mediante la detección con QDs fue de 300 células vivas por prueba para ambas bacterias (Bruno, J.G., 2014).

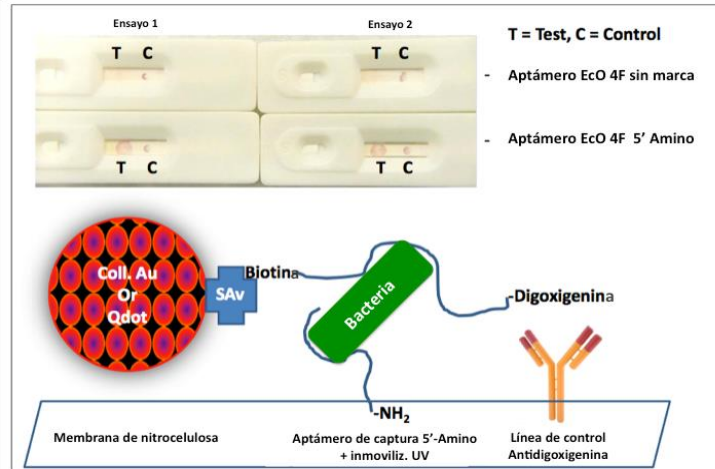


Figura 2.33. Arriba: Comparación de dos ensayos en tira de prueba de flujo lateral. Se muestra que para la inmovilización del aptámero aminado (aptámero de captura), la irradiación con UV fue necesaria, debido a que no se vio detección de la bacteria en los ensayos en los cuales la luz UV no fue utilizada inicialmente o en los cuales el aptámero de captura no fue marcado con un grupo amino. Abajo: esquema de la tira de prueba de flujo lateral (Bruno, J.G., 2014).

Comparando ambos sistemas de detección colorimétricos, se observa que el primero de ellos es muy simple por cuanto no requiere de ningún tipo de marcaje del aptámero, ni de procedimientos de inmovilización del aptámero sobre superficies. Tampoco requiere de instrumentación específica para observar los cambios de señal. Como sistema de detección es muy simple y se puede observar el cambio de color, debido a la presencia de bacterias, a simple vista. Sin embargo la mínima concentración que se logra detectar con este sistema es muy alta ( $10^5$  CFU/mL). En cambio el sistema de detección por flujo lateral requiere de procedimientos de marcaje e inmovilización de aptámeros, pero posee la ventaja de ser portable y requerir solo de la muestra a analizar una vez preparada la tira de detección.

### *Fluorescencia*

Se desarrolló un biosensor basado en una estrategia tipo sándwich (Figura 2.34) con tres aptámeros de ARN, anti-*E. coli* O157:H7, anti-*S. aureus* y anti-*S.*



*typhimurium*, con afinidad por la capa de LPS, el ácido teicoico y la proteína de membrana externa OmpC respectivamente. La estrategia seguida fue la misma llevada a cabo por Gong (Gong, W., 2015) basada en un sándwich de aptámeros, con la excepción que el aptámero de captura (tiolado) fue inmovilizado en una nanopelícula de plata, en cambio en el trabajo de Gong el aptámero biotinilado se inmovilizó sobre una microplaca modificada con estreptavidina. Esta estrategia permitió observar solo la presencia o ausencia de los patógenos (Maeng, J.S., 2012).

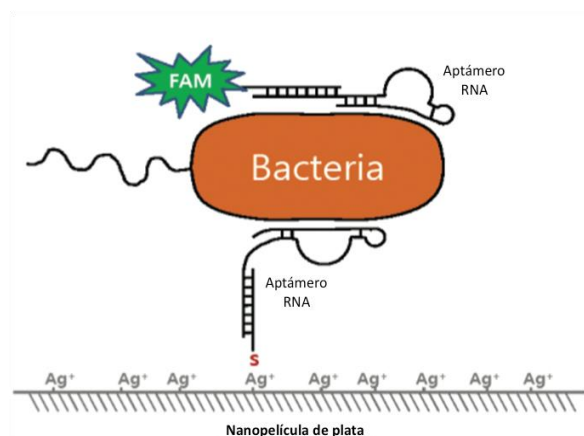


Figura 2.34. Dibujo esquemático del complejo aptámero-bacteria-aptámero marcado con fluoróforo inmovilizado sobre una película de plata (Maeng, J.S., 2012).

También se llevó a cabo la detección de *S. typhimurium* y *S. aureus* con aptámeros biotinilados de ADN, específicos para *S. typhimurium* (Joshi, R., 2009) y para *S. aureus* (Cao, X., 2009). Los aptámeros fueron inmovilizados sobre la superficie de nanopartículas magnéticas y sobre dos tipos de nanopartículas de conversión ascendente (UCNP), NaYF<sub>4</sub>:Yb/Tm y NaYF<sub>4</sub>:Yb/Er para *S. typhimurium* y *S. aureus* respectivamente, mediante la unión biotina-avidina. La conversión ascendente es un proceso óptico que involucra la conversión de fotones de baja energía en fotones de alta energía. La principal diferencia entre las UCNP y otros nanomateriales es que aquellas pueden emitir luz visible bajo irradiación cercana al infrarrojo (Chen, J., 2012). Al agregar las bacterias diana, estas se unen a los complejos aptámero-MNP y aptámero-UCNPs (Figura 2.35). Magnéticamente se

separan y se concentran las bacterias con las MNPs. Luego se mide la intensidad de la fluorescencia al excitar las UCNPs con una luz laser (980 nm), eligiéndose la emisión de 452 y 660 nm para monitorear *S. typhimurium* y *S. aureus* respectivamente. Los LODs para *S. typhimurium* y *S. aureus* fueron 5 y 8 CFU/mL respectivamente y se obtuvo un rango lineal de detección de  $10 - 10^5$  CFU/mL para ambas bacterias (Duan, N., 2012).

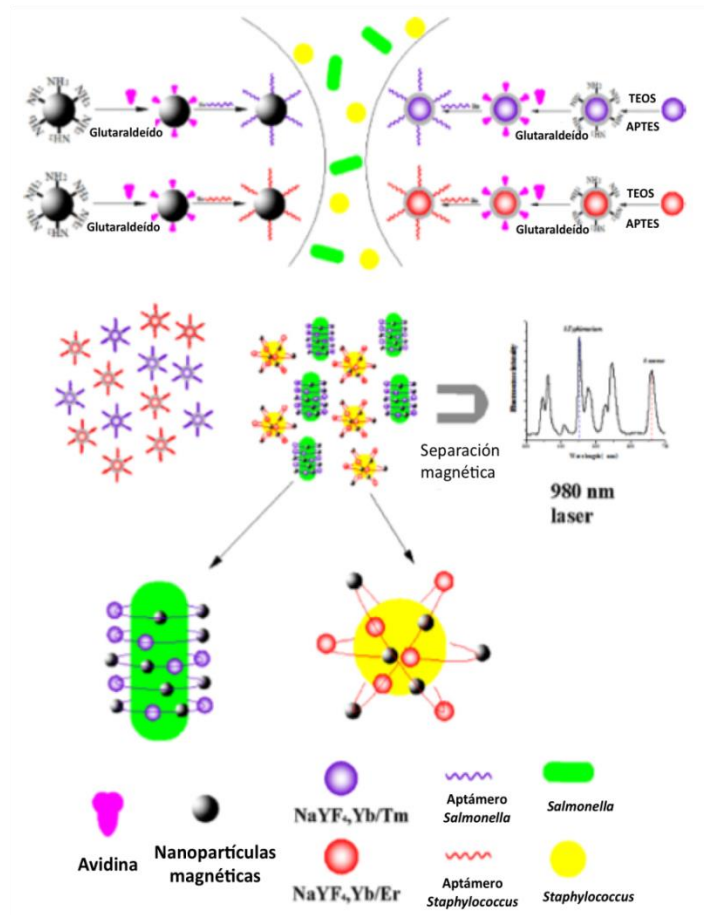


Figura 2.35. Proceso de fabricación de nanopartículas biofuncionalizadas y principio del bioensayo llevado a cabo. TEOS: tetraetilortosilicato; APTES: 3-aminopropiltrimetoxisilano. NaYF<sub>4</sub>:Yb/Er UCNP para *Staphylococcus*. NaYF<sub>4</sub>:Yb/Tm UCNP para *Salmonella* (Duan, N., 2012).

Uno de los trabajos de detección simultánea incluye *S. typhimurium* y *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) (Figura 2.36). Aptámeros de ADN aminados con afinidad para *S. typhimurium* y *V. parahaemolyticus*, fueron

conjugados a QDs (QD 535 y 585) cubiertos con grupos carboxilo. Utilizando citometría de flujo se detectaron las bacterias diana, aprovechando la capacidad de fluorescencia de los QDs, en un rango de detección lineal de  $3.4 \times 10^4 - 3.4 \times 10^7$  CFU/mL y  $3.8 \times 10^4 - 3.8 \times 10^7$  CFU/mL para *V. parahaemolyticus* y *S. typhimurium* respectivamente. El LOD de este sistema de detección alcanzó las  $5 \times 10^3$  CFU/mL para ambas bacterias (Duan, N., 2013d).

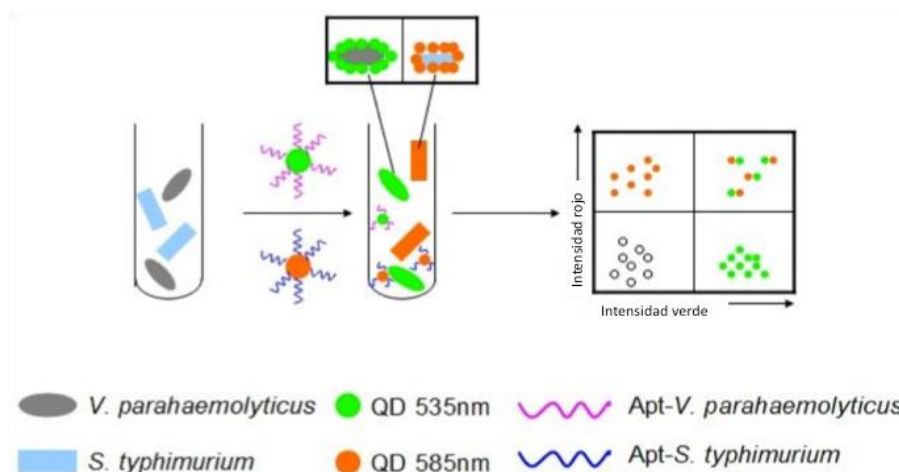


Figura 2.36. Esquema conceptual del ensayo de citometría de flujo para la detección de *V. parahaemolyticus* y *S. typhimurium* mediante el uso de aptámeros marcados con UCNPs (Duan, N., 2013d).

En un nuevo sistema se realizó la detección de tres patógenos: *S. typhimurium*, *S. aureus* y *Lactobacillus acidophylus* (*L. acidophylus*). Se integró sobre un sistema de microfluídica un biosensor basado en GO funcionalizado con aptámeros marcados con la molécula fluorescente Cy3 (Figura 2.37). Las  $K_D$  de los aptámeros para *S. aureus* y *L. acidophylus* fueron 35 y 13 nM, desconociéndose el valor correspondiente al aptámero para *S. typhimurium*. La estrategia seguida para la detección de las bacterias fue la misma utilizada por Wu (Wu, W., 2014a) para la detección de *S. enteritidis*, en la cual se utilizó el GO como inactivador de la molécula fluorescente que porta el aptámero. Este sistema de detección GO-Aptámero se acopló en un sistema de microfluídica híbrido PDMS/papel, el cual incluye dos capas de PDMS (capa superior y capa media) y una placa de vidrio en

el fondo sobre el cual se adhiere papel de cromatografía (Figura 2.37). Este papel, finalmente, sirve como sustrato para la adsorción de GO funcionalizado con aptámero. Los LODs alcanzados para cada bacteria fueron 11 CFU/mL, 61 CFU/mL y 800 CFU/mL para *L. acidophilus*, *S. typhimurium* y *S. aureus* respectivamente. Se obtuvieron rangos lineales de detección de 9.4 – 150 CFU/mL, 42.2 – 675 CFU/mL y  $10^4$  –  $10^6$  CFU/mL para *L. acidophilus*, *S. typhimurium* y *S. aureus* respectivamente, con un tiempo de ensayo de 10 min, una vez preparado el sistema de detección de microfluídica. Este sistema de detección tiene características relevantes: 1) la detección de bacterias requiere solamente un procedimiento de un paso, basado en la interacción del aptámero con el GO. Además la detección es directa, sin la preparación de muestras; 2) el sistema microfluídico híbrido PDMS/papel combina la ventaja de ambos sustratos. El papel facilita la inmovilización del GO modificado con los aptámeros marcados, evitando complicados tratamientos de superficie; y 3) es rápido (Zuo, P., 2013).

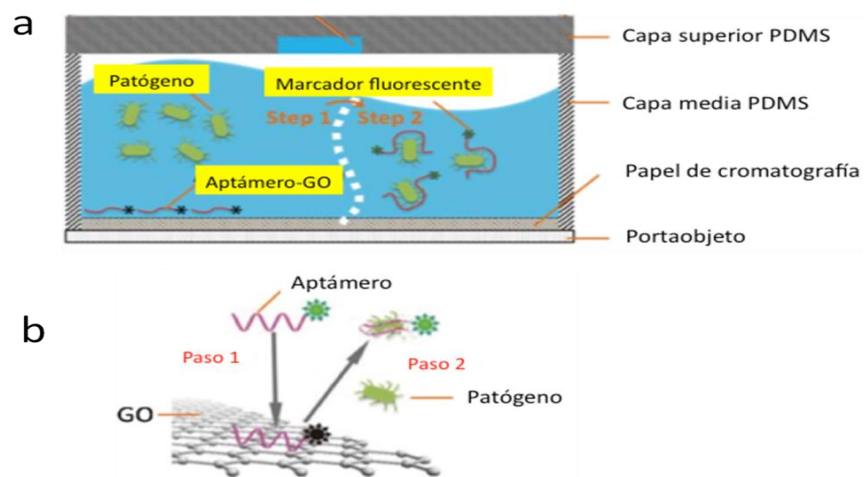


Figura 2.37. Esquema para la detección de bacterias patógenas. a) Esquema del sistema de microfluídica, b) Principio de detección (Zuo, P., 2013).

En otro sistema para detectar *S. typhimurium* y *V. parahaemolyticus*, la estrategia consistió en la utilización del fluoróforo AccuBlue, los aptámeros y hebras complementarias a los aptámeros para una hibridación parcial. Se utilizaron dos modos de detección (Figura 2.38): señal encendida y señal apagada. En la

primera, los aptámeros se unieron inicialmente a sus dianas respectivas, seguido por la adición de las hebras complementarias y el fluoróforo AccuBlue, utilizado en la detección de ADN de doble hebra. Las hebras complementarias se hibridaron con los aptámeros que no se unieron a las bacterias. Esto llevó a que el AccuBlue se insertara en las dobles hebras de ADN, mostrando un incremento significativo en la intensidad de la fluorescencia. En el segundo modo de detección, primero se produjo la hibridación entre los aptámeros y sus hebras complementarias, dando una alta intensidad de fluorescencia al agregar el AccuBlue. Cuando se agregaron las bacterias, los aptámeros se unieron a estas y se separaron de las respectivas hebras complementarias, reduciendo la intensidad de fluorescencia como consecuencia de la liberación del AccuBlue. Los LODs obtenidos fueron de 25 y 35 CFU/mL para *S. typhimurium* y *V. parahaemolyticus* respectivamente. El rango lineal de detección fue de 50 – 10<sup>6</sup> CFU/mL para ambas bacterias en un tiempo de detección de 1.5 h (Duan, N., 2014).

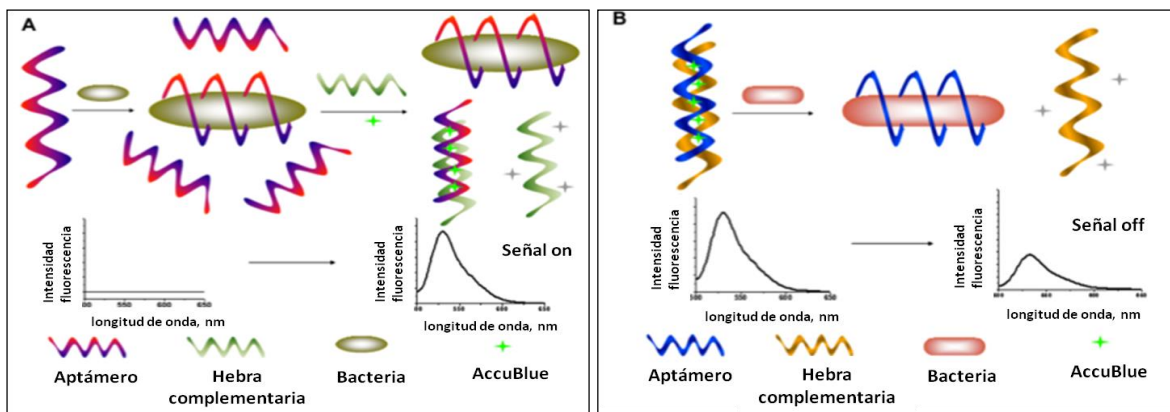


Figura 2.38. Esquema de la detección por fluorescencia de bacterias patógenas usando un aptasensor universal. (A) Basado en el modelo de “señal on”. (B) Basado en el modelo de “señal off” (Duan, N., 2014).

El mismo grupo de investigadores del trabajo anterior desarrolló una estrategia diferente para las mismas bacterias con dos aptámeros de ADN. Esta vez la estrategia se basó en la transferencia de energía de fluorescencia entre QDs como donadores, y nanopartículas de carbono o carbon dot (CD) como aceptores

de energía (Figura 2.39). Los QDs modificados con grupos carboxilo y los aptámeros modificados con grupos amino fueron conjugados para formar complejos QD-aptámero. La fluorescencia de los QDs es fuertemente inactivada por las CDs, por lo que en ausencia de las bacterias diana se forman los complejos QDs-aptámero-CD y se inactiva la fluorescencia. En presencia de la bacteria diana se forma el complejo QDs-aptámero-bacteria que da fluorescencia. Tanto el LOD como el rango lineal de detección fueron exactamente iguales al trabajo anterior (Duan, N., 2015).

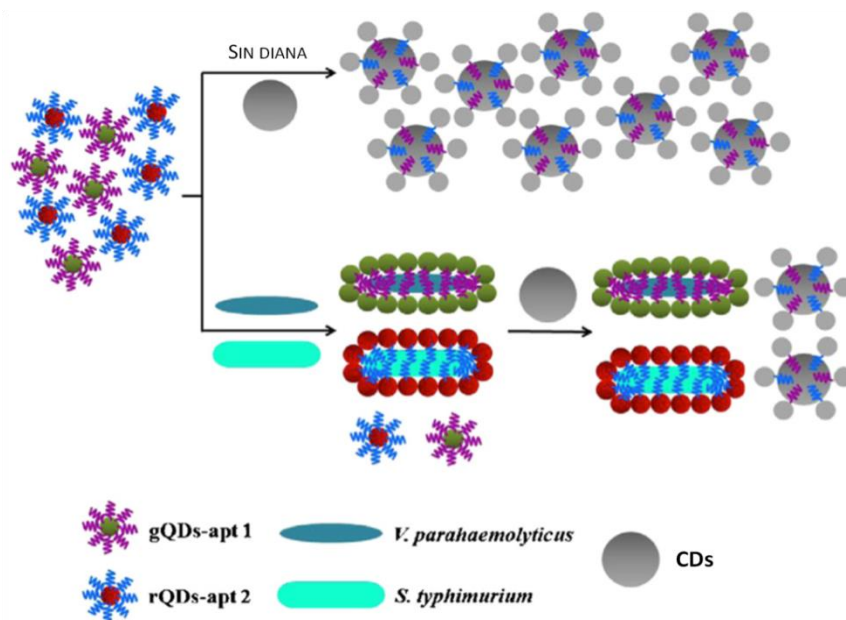


Figura 2.39. Diagrama de la transferencia de energía de resonancia fluorescente dual desde QDs-aptámero a CDs para la detección simultánea de bacterias patógenas. gQDs: puntos cuánticos verdes; rQDs: puntos cuánticos rojos; apt: aptámero; CD: puntos de carbono (Duan, N., 2015).

De los trabajos previamente descritos para la detección de múltiples bacterias por fluorescencia, en la mayoría de ellos la señal se logró con nanomateriales con propiedades fluorescentes como los QDs y las UCNPs.

Los resultados fueron muy variados en cuanto a los parámetros de comportamiento, obteniéndose los mejores resultados con las UCNPs para la

detección de *S. typhimurium* y *S. aureus*. Por otro lado una detección solo cualitativa se consiguió utilizando el fluoróforo FAM en una estrategia tipo sándwich para la detección de *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*.

### Luminiscencia

La detección simultánea de *S. typhimurium*, *S. aureus* y *V. parahemolyticus* se efectuó utilizando la misma estrategia seguida por Duan (Duan, N., 2012) basada en la utilización de UCNP como elementos emisores de luz. Los picos de emisión de luminiscencia de *S. aureus*, *V. parahemolyticus* y *S. typhimurium* fueron monitoreados a longitudes de onda de 477, 542 y 660 nm respectivamente (Figura 2.40). Los LODs calculados para este aptasensor fueron 25, 10 y 15 CFU/mL para *S. aureus*, *V. parahemolyticus* y *S. typhimurium* respectivamente y se obtuvo un rango lineal calculado de  $50 - 10^6$  CFU/mL (Wu, S., 2014).

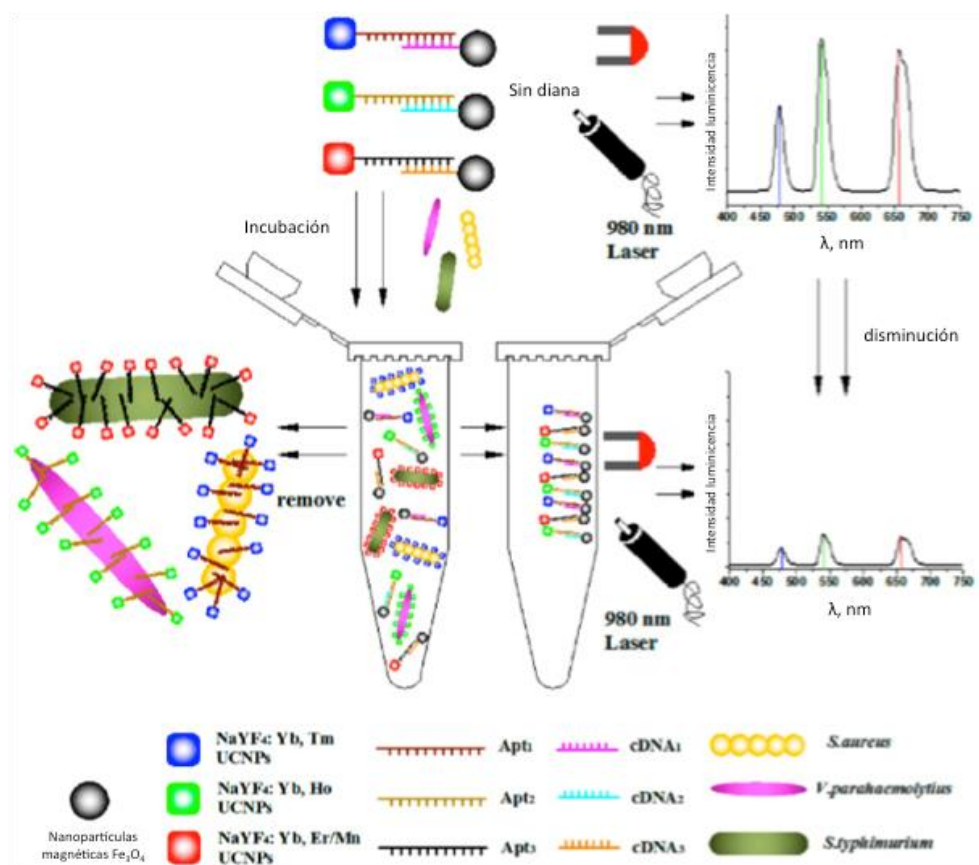


Figura 2.40. Ilustración del bioensayo de luminiscencia múltiple basado en UCNP modificadas con aptámeros para la detección simultánea de varias bacterias patógenas (Wu, S., 2014).

El patógeno *V. parahaemolyticus* fue utilizado en forma reiterada en los sistemas de detección por fluorescencia, como también en el sistema por luminiscencia. La DI de este patógeno está entre los  $10^5$  y  $10^7$  microorganismos (Daniels, N.A., 2000). En todos estos trabajos los LODs alcanzados son relativamente buenos, y en algunos casos muy buenos respecto al valor de la DI. Esto los transforma en sistemas de detección capacitados para analizar muestras contaminadas con *V. parahaemolyticus*.

#### *Resonancia de plasmones superficiales localizada (LSPR)*

*S. typhimurium*, *L. acidophylus* y *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*) se detectaron en forma simultánea mediante resonancia de plasmones superficiales localizada. La  $K_D$  reportada previamente para *L. acidophylus* fue de 13 nM (Hamula, C.L., 2008) y para *P. aeruginosa* fue de 17.27 nM (Wang, K.Y., 2011), no reportándose el valor de  $K_D$  para *S. typhimurium*. Para lograr la detección, sobre un portaobjeto de vidrio se depositaron una primera capa de oro, luego se depositaron nanopartículas de sílice y finalmente una segunda capa de oro (Figura 2.41).

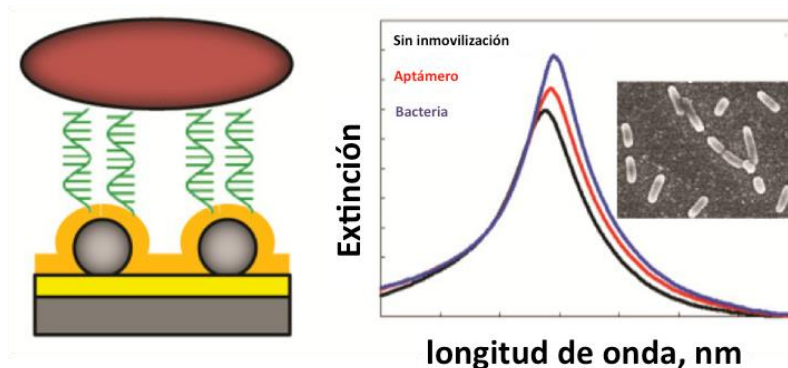


Figura 2.41. Sistema sensor LSPR (resonancia de plasmones superficiales localizada) funcionalizado con aptámeros ensamblados sobre una capa de oro nanoestructurada (Yoo, S.M., 2014).



Aptámeros tiolados con afinidad hacia las tres bacterias fueron inmovilizados sobre la superficie de la segunda capa de oro para poder unirse directamente a las bacterias presentes en la solución de incubación. La detección de las bacterias se realizó mediante medidas de resonancia de plasmones superficiales (SPR) registrando los cambios en los picos de extinción del plasmón, obteniéndose un LOD de 30 CFU por ensayo para las tres bacterias (Yoo, S.M., 2015).

La detección simultánea de *S. typhimurium*, *S. aureus* y *V. parahemolyticus* por luminiscencia utilizando UCNPs, dió como resultado LODs bajos y muy parecidos para las tres bacterias. También se logró un amplio rango lineal de detección. Un LOD similar se logró con el uso de LSPR, sin embargo la detección en este caso, aunque se efectuó para las tres bacterias, no fue una detección simultánea como el caso anterior.

Al hacer un análisis general de los sistemas de detección múltiples, podemos notar que la mayoría de los sistemas de detección están basados en la obtención de una señal fluorescente. Con los sistemas de detección por fluorescencia se lograron mejores resultados utilizando en general estrategias más complejas, alcanzando el LOD más bajo con el uso de UCNP. En el lado opuesto tenemos los colorimétricos, cuyas estrategias fueron mas simples, pero con los resultados menos favorables desde el punto de vista del LOD, aunque con tiempos de análisis cortos. Una de las ventajas más relevantes de varios de los sistemas de detección por fluorescencia es la posibilidad de detectar simultáneamente dos o más bacterias en una misma medida, lo cual le entrega un valor adicional importante, considerando que muchas muestras de alimentos contaminados pueden contener más de un patógeno.

## **2.11. Conclusiones**

Respecto a los sistemas de detección encontrados en la literatura, el mayor porcentaje de estos, por lejos, está orientado a la detección de las bacterias pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae* y en particular las bacterias

del género *Salmonella* son las que están presentes en gran parte de los trabajos presentados. Esto es debido al alto impacto de este grupo de bacterias en las enfermedades transmitidas por los alimentos, situación que se ve reflejada en el número de hospitalizaciones, el número de muertes y el costo monetario generado.

Dentro de la información recopilada se puede observar una amplia gama de estrategias, resultado de los numerosos intentos por desarrollar sistemas de detección eficientes. Dentro de las estrategias expuestas nos encontramos algunas que se repiten en la literatura de biosensores como la tipo sándwich. En la mayoría de los casos presentados, este tipo de estrategia involucra la presencia de dos aptámeros, uno de captura y uno de detección. También se puede encontrar la presencia de anticuerpos en combinación con aptámeros participando de este tipo de estrategia. En esta estrategia normalmente el aptámero de detección es marcado con algún fluoróforo o algún nanomaterial para amplificar la señal, pues el tamaño del aptámero es muy reducido comparado con la bacteria. En uno de los mejores resultados el aptámero de detección fue marcado con QDs (Bruno, J.G., 2009), y mediante medidas de fluorescencia se logró un LOD de 2.5 CFU/mL en un tiempo bastante reducido (15 min). El inconveniente de esta estrategia son los sucesivos pasos de incubación de los diferentes elementos del sándwich; a lo menos se requieren de 3 elementos para efectuar las mediciones.

Otra de las estrategias utilizadas en forma reiterada es la directa. Esta alternativa es simple y aunque normalmente no es sensible, esta puede mejorar significativamente cuando se utiliza con técnicas como EIS. Esta estrategia requiere en general de un mínimo de pasos por lo que generalmente los tiempo que se requieren para el análisis son bajos, como en el trabajo llevado a cabo por Labib (Labib, M., 2012a) en donde el tiempo de análisis fue de 10 min. En ocasiones el aptámero no requiere de marcajes con fluoróforos o nanomateriales, como por ejemplo en el sistema desarrollado por Zelada-Guillen (Zelada-Guillen, G.A., 2009).

Los sistemas de transducción mayoritariamente utilizados fueron los electroquímicos y ópticos, obteniéndose en general mejores LODs con los primeros. Sorprendentemente, el LOD más bajo obtenido (0.2 CFU/mL) se alcanzó con un sistema de detección potenciométrico. Los LODs más altos se obtuvieron con un sistema dual de detección espectrofotométrica-fluorescente ( $10^6$  a  $10^{10}$  CFU/mL), debido posiblemente a la menor sensibilidad de las técnicas espectrofotométricas.

Los nanomateriales se utilizaron en el 60% del total de los artículos científicos presentados en este capítulo. Los nanomateriales más utilizados fueron: GNPs, SWCNTs, GO y su derivado RGO, y finalmente los QDs. Las GNPs principalmente se utilizaron como elementos de amplificación de las señales, aportando mejoras notables en los parámetros característicos de detección. En cambio la función principal de los SWCNTs fue utilizarlos como elementos de transducción de señal, debido a la gran capacidad de transferencia de carga entre fases heterogéneas que poseen. Por su parte el GO fue empleado tanto como elemento de transducción, similar al SWCNT, y como desactivador de la fluorescencia. Por último los QDs se utilizaron para detecciones ópticas aprovechando su alto coeficiente de extinción.

La mayor parte de los trabajos fueron diseñados para la detección de un patógeno. Sin embargo se reportan estudios muy innovadores en los cuales se pueden detectar simultáneamente dos o más patógenos, lo que los hace muy atractivos desde el punto de vista del análisis clínico, medioambiental y el control de alimentos.

En relación a los parámetros de comportamiento obtenidos en los sistemas de detección ya revisados, podemos concluir que la gran mayoría de los trabajos reporta el LOD del sistema experimentado. Sin embargo respecto al rango lineal o dinámico, el tiempo de análisis, la sensibilidad y la selectividad del sistema, son menores los trabajos que entregan esta información. Un análisis completo de

cómo se comporta un determinado sistema de detección implica conocer más de un parámetro.

Como ocurre con todos los parámetros de comportamiento, los tiempos de análisis varían significativamente entre los sistemas de detección reportados. Los tiempos de análisis más cortos registrados (< 2 min) se obtuvieron utilizando la potenciometría como técnica electroquímica y con estrategias de detección directa.

Respecto a los aptámeros, se observa que la  $K_D$  en la mayoría de los casos es del orden nM. El valor más bajo encontrado fue 0.1285 nM y el más alto de 1.73  $\mu$ M para la misma bacteria, *S. typhimurium*. Estos aptámeros fueron utilizados en dos trabajos diferentes, utilizando la misma estrategia y método de detección. Los resultados (LODs) estuvieron en correspondencia a los valores de las constantes de disociación  $K_D$ . El estudio que utilizó el aptámero con una  $K_D$  de 0.1285 nM obtuvo un resultado en el LOD diez veces menor, lo que implica que la afinidad del aptámero por su diana es importante, pero no determinante en el resultado de los parámetros de comportamiento. Si se comparan los valores de las  $K_D$  observamos que la menor de ellas es 13000 veces más pequeña.

Lo anterior demuestra que para lograr que un sistema de detección se comporte eficientemente, es decir, que sea rápido, sensible, selectivo, con LODs bajos y otros atributos deseables, es necesario que confluyan una serie de condiciones. La selección óptima de un aptámero, la elección de una estrategia adecuada al analito a detectar, la elección de un método de detección (electroquímico, óptico, etc), la utilización de nanomateriales, el uso de dispositivos de microfluídica con sistemas de filtración, etc, llevará a que el sistema de detección sea robusto. Un sistema robusto permitirá el análisis de muestras reales, que es el objetivo final a conseguir.

Una de las principales limitaciones para lograr biosensores y en general sistemas de detección robustos es la reactividad cruzada producida por el aptámero seleccionado. Hoy en día la especificidad de los aptámeros es un parámetro que se debe mejorar, puesto que la selectividad es la característica más importante de un biosensor. Los parámetros como el LOD, tiempo de análisis, etc, se pueden mejorar con estrategias y métodos adecuados, nanomateriales convenientes, pero la selectividad depende sólo de la calidad del aptámero seleccionado.

## 2.12. Referencias

Abbaspou, B.; Norouz-Sarvestani, F.; Noori, A. and Soltani, N. **Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of staphylococcus aureus.** Biosens Bioelectron. 2015; 68: 149.

Bahadır, E.B. and Sezgintürk, M.K. **A review on impedimetric biosensors.** Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2016; 1: 248.

Batz, M.B.; Hoffmann, S. and Morris, J.G. **Ranking the Risks: The 10 Pathogen-Food Combinations With The Greatest Burden On Public Health** 2011. University of Florida, Emerging Pathogens Institute.

Bell, C.W.; Fricks, B.E.; Rocca, J.D.; Steinweg, J.M.; McMahon, S.K.; Wallenstein, M.D. **High-throughput Fluorometric Measurement of Potential Soil Extracellular Enzyme Activities.** J. Vis. Exp. 2013; 81: 50961.

Book, B.; Chen, J. and Irudayaraj, J. **Quantification of Receptor Targeting Aptamer Binding Characteristics Using Single-Molecule Spectroscopy.** Biotechnol. Bioeng. 2011; 108.

Bruno, J.G. and Carrillo M.P. **Development of Aptamer Beacons for Rapid Presumptive Detection of Bacillus Spores.** J Fluoresc. 2012; 22:915.

Bruno, J.G. **Application of DNA Aptamers and Quantum Dots to Lateral Flow Test Strips for Detection of Foodborne Pathogens with Improved Sensitivity versus Colloidal Gold.** Pathogens. 2014; 3: 341.

Bruno, J.G.; Phillips, T.; Carrillo, M.P. and Crowell, R. **Plastic-adherent DNA aptamer-magnetic bead and quantum dot sandwich assay for Campylobacter detection.** J Fluoresc. 2009; 19: 427.

Campos, L.C.; Whittam, T.S.; GOMES, T.A.T.; ANDRADE, J.R.C. and Trabulsi, L.R. **Escherichia coli Serogroup 0111 Includes Several Clones of Diarrheogenic Strains with Different Virulence Properties**. *Infect Immun*, 1994; 62: 3282.

Cao, X.; Li, S.; Chen, L.; Ding, H.; Xu, H.; Huang, Y.; Li, J.; Liu, N.; Cao, W.; Zhu, Y.; Shen, B. and Shao, N. **Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of Staphylococcus aureus**. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37: 4621.

Chang, B. and Zhao, T. **Quartz crystal microbalance study of DNA immobilization and hybridization for DNA sensor development**. 2008. Department of Civil and Environmental Engineering. Michigan State University.

Chang, Y.C.; Yang, C.Y.; Sun, R.L.; Cheng, Y.F.; Kao, W.C. and Yang, P.C. **Rapid single cell detection of Staphylococcus aureus by aptamer-conjugated gold nanoparticles**. *Sci. Rep.* 2013; 3: 1863.

Chen, J. and Zhao, J.X. **Upconversion Nanomaterials: Synthesis, Mechanism, and Applications in Sensing**. *Sensors*. 2012; 12: 2414.

Crespo, G A.; Macho, S.; Bobacka, J. and Rius, F.X. **Transduction mechanism of carbon nanotubes in solid-contact ion-selective electrodes**. *Anal. Chem.* 2009, 81, 676.

Crump, J.A.; Luby, S.P. and Mintz, E.D. **The global burden of typhoid fever**. *Bulletin of the World Health Organization* 2004; 82: 346.

Daniels, N.A.; MacKinnon, L.; Bishop, R.; Altekruuse, S.; Ray, B.; Hammond, R.M.; Thompson, S.; Wilson, S.; Bean, N.H.; Griffin, P.M. and Slutsker, L. **Vibrio parahaemolyticus Infections in the United States, 1973–1998**. *J. Infect. Dis.* 2000; 181: 1661.

Deerinck, T.J. **The Application of Fluorescent Quantum Dots to Confocal Multiphoton, and Electron Microscopic Imaging.** Toxicol Pathol. 2008; 36: 112.

Ding, J.; Lei, J.; Ma, X.; Gong, J. and Qin, W. **Potentiometric Aptasensing of Listeria monocytogenes Using Protamine as an Indicator.** Anal. Chem. 2014; 86: 9412.

Duan, N.; Wu, S.; Zhu, C. ; Ma, X.; Wang, Z.; Yu, Y. and Jiang Y. **Dual-color upconversion fluorescence and aptamer-functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the simultaneous detection of Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus.** Anal. Chim. Acta. 2012; 723: 1.

(a)Duan, N.; Wu, S.; Chen, X.; Huang, Y.; Xia, Y.; Ma, X. and Wang, Z. **Selection and characterization of aptamers against salmonella typhimurium using whole-bacterium systemic evolution of Ligands by exponential enrichment (SELEX).** J. Agric. Food Chem. 2013; 61: 3229.

(b)Duan, N.; Ding, X.; Wu, S.; Xia, Y.; Ma, X.; Wang, Z. and Chen, J. **In vitro selection of a DNA aptamer targeted against Shigella dysenteriae.** J Microbiol Methods. 2013; 94: 170.

(c)Duan, N.; Ding, X.; He, L.; Wu, S.; Wei, Y. and Wang, Z.. **Selection, identification and application of a DNA aptamer against Listeria monocytogenes.** Food Control. 2013; 33: 239.

(d)Duan, N.; Wu, S.; Yu, Y.; Ma, X.; Xia, Y.; Chen, X.; Huang, Y. and Wang, Z. **A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of Vibrio parahaemolyticus and Salmonella typhimurium using aptamer conjugated quantum dots as labels.** Anal Chim Acta 2013; 804: 151.



Duan, N.; Wu, S.; Ma, X.; Xia, Y. and Wang, Z. **A universal fluorescent aptasensor based on AccuBlue dye for the detection of pathogenic bacteria.** Anal. Biochem. 2014; 454: 1

Duan, N.; Wu, S.; Dai, S.; Miao, T.; Chen, J. and Wang, Z. **Simultaneous detection of pathogenic bacteria using an aptamer based biosensor and dual fluorescence resonance energy transfer from quantum dots to carbon nanoparticles.** Microchim Acta. 2015; 182: 917).

Dwivedi, H.P.; Smiley, R.D. and Jaykus, L.A. **Selection of DNA aptamers for capture and detection of Salmonella Typhimurium using a whole-cell SELEX approach in conjunction with cell sorting.** Appl Microbiol Biotechnol 2013; 97:3677.

Fang, Z.; Wu, W.; Lu, X. and Zeng, L. **Lateral flow biosensor for DNA extraction-free detection of salmonella based on aptamer mediated strand displacement amplification.** Biosens Bioelectron. 2014; 56: 192.

Guard-Petter, J. **The chicken, the egg and Salmonella enteritidis.** Appl Environ Microbiol. 2001; 3: 421.

Gong, W.; Duan, N.; Wu, S.; Huang, Y.; Chen, X. and Wang, Z. **Selection, identification and application of dual DNA aptamers against Shigella sonnei.** Anal. Methods. 2015; 7: 3625.

Hamula, C.L.; Zhang, H.; Guan, L.L.; Li, X.F, and Le, X.C. **Selection of aptamers against live bacterial cells.** Anal Chem. 2008; 20: 7812.

Hennekinne, J.A.; De Buyser, M-L. and Dragacci, S. **Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation.** FEMS Microbiol Rev. 2012; 36: 815.

Hernandez, R.; Valles, C.; Benito, A.M.; Maser, W.K.; Rius, F.X. and Riu, J.. **Graphene-based potentiometric biosensor or the immediate detection of living bacteria.** Biosens Bioelectron. 2014; 54: 553.

Holzinger, M.; Le Goff, A. and Cosnier, S. **Nanomaterials for biosensing applications: a review.** Front Chem. 2014; 2: 63.

Hyeon, J.Y.; Chon, J.W.; Choi, I.S.; Park, C.; Kim, D.E, and Seo, K.H. **Development of RNA aptamers for detection of Salmonella Enteritidis.** J Microbiol Methods. 2012; 89: 79.

Ikanovic, M.; Rudzinski, W.E.; Bruno, J.G. et al. **Fluorescence assay based on aptamer-quantum dot binding to bacillus thuringiensis spores.** J Fluoresc. 2007; 17: 193.

Jelinek, R, and Kolusheva, S. **Biomolecular sensing with colorimetric vesicles.**Top Curr Chem. 2007;277: 155.

Jia, F.; Duan, N.; Wu, S.; Ma, X.; Xia,Y.; Wang, Z. and Wei, X. **Impedimetric aptasensor for Staphylococcus aureus based on nanocomposite prepared from reduced graphene oxide and gold nanoparticles.** Microchim Acta. 2014; 181: 967.

Joshi, R.; Janagama, H.; Dwivedi, H.P.; Senthil Kumar, T.M.A.; Jaykus, L.A.; Schefers, J. and Sreevatsan, S. **Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of Salmonella enterica serovars.** Molecular and Cellular Probes, 2009; 23: 20–28.

Jyoti, A.; Vajpayee P.; Singh, G.; Bali Patel, C.; Chand Gupta, K. and Shanker, R. **Identification of Environmental Reservoirs of Nontyphoidal Salmonellosis: Aptamer-Assisted Bioconcentration and Subsequent Detection of Salmonella Typhimurium by Quantitative Polymerase Chain Reaction.** Environ. Sci. Technol. 2011; 45: 8996.

Khanna, R.; Waechter, L.; Sargeant, J.; Clark, W.F. and Garg, A.X. **Environmental prevention of human disease from verocytotoxin-producing Escherichia coli.** Nephrol Dial Transplant. 2008; 23: 1819.

Khelef, N.; Lecuit, M.; Buchrieser, C.; Cabanes, D.; Dussurget, O. and Cossart, P. **Listeria monocytogenes and the Genus Listeria.** Prokariotes. 2006; 4: 404.

Kim, Y.S.; Chung, J.; Song, M.Y., Jurng, J. and Kim, B.C. **Aptamer cocktails: enhancement of sensing signals compared to single use of aptamers for detection of bacteria.** Biosens Bioelectron. 2014; 54: 195.

Kim, Y.S.; Song, M.Y.; Jurng, J. and Kim, B.C., **Isolation and characterization of DNA aptamers against Escherichia coli using a bacterial cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment approach,** Anal. Biochem. 2013; 436: 22.

Klena, J.D.; Parker, C.T.; Knibb, K.; J. Ibbitt, C.; Devane, P.M.L.; Horn, S.T.; Miller, W.G. and Konkel, M.E. **Differentiation of Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Campylobacter lari, and Campylobacter upsaliensis by a Multiplex PCR Developed from the Nucleotide Sequence of the Lipid A Gene lpxA.** J. Clin. Microbiol..2004; 42: 5549.

Kolovskaya, O.S.; Savitskaya, A.G.; Zamay, T.N.; Reshetneva, I.T.; Zamay, G.S.; Erkaev, E.N.; Wang, X.; Wehbe, M.; Salmina, A.B.; Perianova, O.V.; Zubkova, O.A.; Spivak, E.A.; Mezko, V.S.; Glazyrin, Y.E.; Titova, N.M.; Berezovski, M.V, and Zamay, A.S. **Development of bacteriostatic DNA aptamers for salmonella.** J Med. 2013; 4: 1564.

Kondo, H.; Nagasato, K.; Yoshimura, T.; Nakamura, T.; Tsujihata, M. and Nagataki, S. **Acute Polyradiculoneuropathy Associated With Salmonella Gastroenteritis.** Acta medica Nagasakiensia. 1994; 39: 39.

Kothary, M.H. and Babu, U.S.. **Infective Dose of Foodborne Pathogen in Volunteers: A Review.** J. Food Saf. 2001; 21: 49.

(a)Labib, M.; Zamay, A.S.; Kolovskaya, O.S.; Reshetneva, I.T.; Zamay, G.S.; Kibbee, R.J.; Sattar, S.A.; Zamay, T.N and Berezovski, M.V. **Aptamer-Based Impedimetric Sensor for Bacterial Typing.** Anal. Chem. 2012; 84: 8114.

(b)Labib, M.; Zamay, A.S.; Kolovskaya, O.S.; Reshetneva, I.T.; Zamay, G.S.; Kibbee, R.J.; Sattar, S.A.; Zamay, T,N. and Berezovski, M.V. **Aptamer-Based Viability Impedimetric Sensor for Bacteria.** Anal. Chem. 2012; 84: 8966.

Lee, H.J.; Kim, B.C.; Kim, K.W.; Kim, Y.K.; Kim, J. and Oh, M.K. **A sensitive method to detect Escherichia coli based on immunomagnetic separation and real-time PCR amplification of aptamers.** Biosens Bioelectron. 2009; 24: 3550.

Leggett, H.C.; Cornwallis, C.K. and West, S.A. **Mechanisms of Pathogenesis, Infective Dose and Virulence in Human Parasites.** PLoS Pathog. 2012; 8: 1.

Lei, J.; Ding, J. and Qin, W. **A chronopotentiometric flow injection system for aptasensing of E. coli O157.** Anal. Methods. 2015; 7: 825.

Li, H.; Ding, X.; Peng, Z.; Deng, L.; Wang, D.; Chen, H. and He Q. **Aptamer selection for the detection of Escherichia coli K88.** Can. J. Microbiol. 2011; 57: 453.

Liu, G.; Yu, X.; Xue, F.; Chen, W.; Ye, Y.; Yang, X.; Lian, Y.; Yan, Y. and Zong, K. **Screening and preliminary application of a DNA aptamer for rapid detection of Salmonella O8.** Microchim Acta. 2012; 178: 237.

Luo, C.; Lei, Y.; Yan, L.; Yu, T.; Li, Q.; Zhang, D.; Ding, S.; Ju, H. **A Rapid and Sensitive Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Direct Detection of Escherichia Coli O111.** Electroanal. 2012; 24:1186.

Ma, X.; Jiang, Y.; Jia, F.; Yu, Y.; Chen, J. and Wang, Z. **An aptamer-based electrochemical biosensor for the detection of Salmonella.** J Microbiol Methods. 2014; 98: 94.

Maeng, J.S.; Kim, N.; Kim, C.T.; Han, S.R.; Lee, Y.J.; Lee, S.W.; Lee, M.H. and Cho, Y.J. **Rapid Detection of Food Pathogens Using RNA Aptamers-Immobilized Slide.** J. Nanosci. Nanotechnol. 2012; 12:5138.

Meseguer Lloret, S. **Métodos Quimioluminiscentes en Química Analítica..** 2004, Tesis doctoral. Universitat de Valencia.

Ning, Y.; Li, W.; Duan, Y.F.; Yang, M. and Deng, L. **High Specific DNzyme-Aptamer Sensor for Salmonella paratyphi A Using Single-Walled Nanotubes – Based Dual Fluorescence-Spectrophotometric Methods.** J. Biomol Screen. 2014; 19: 1099.

Ohk, S.H.; Koo, O.K.; Sen, T.; Yamamoto C.M. and Bhunia, A.K. **Antibody-aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of Listeria monocytogenes from food.** J Appl Microbiol. 2010; 109: 808.

Økstad, O.A. and Kolstø, A.B. **Genomic of Foodborne Bacterial Pathogen**. 2011, Chapter 2 (Genomics of Bacillus Species). Ed. Springer.

Ozalp, V.C.; Bayramoglu, G.; Erdem, Z. and Arica M.Y. **Pathogen detection in complex samples by quartz crystal microbalance sensor coupled to aptamer functionalized core-shell type magnetic separation**. Anal. Chim. Acta. 2015; 853: 533.

Paton, J.C, and Paton, A.W. **Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin--producing Escherichia coli infections**. Clin Microbiol Rev 1998;11:450.

Peng, Z.; Ling, M.; Ning, Y. and Deng, L. **Rapid fluorescent detection of Escherichia coli K88 based on DNA aptamer library as direct and specific reporter combined with immuno- magnetic separation**. J Fluoresc. 2014; 24: 1159.

Perrin, M.; Bemer, M. and Delamare, C. **Fatal Case of Listeria innocua Bacteremia**. J Clin Microbiol. 2003; 11: 5308.

Ruboglio, E.A. and Tesone, S. **Escherichia coli O157 H7: presencia en alimentos no cárnicos**. Arch Argent Pediatr. 2007; 105: 193.

Savory, N.; Takahashi, Y.; Tsukakoshi, K. et al. **Simultaneous improvement of specificity and affinity of aptamers against Streptococcus mutans by in silico maturation for biosensor development**. Biotechnol Bioeng, 2014; 111: 454.

Shi, X.; He, F; Lian, Y.; Yan, D. and Zhan, X. **A new aptamer/SWNTs IDE-SPQC sensor for rapid and specific detection of Group A Streptococcus**. Sens Actuators B. 2014; 198: 431.

Silva, J.; Leite, D.; Fernandes, M.; Mena, C.; Gibbs, P.A. and Teixeira, P. **Campylobacter spp. as a foodborne pathogen: a review.** Front Microbiol. 2011; 2: 1.

Singh, G.; Vajpayee, P.; Rani, N.; Jyoti, A.; Gupta, K.C. and Shanker, R. **Bio-capture of S. Typhimurium from surface water by aptamer for culture-free quantification.** Ecotoxicol. Environ. Saf. 2012; 78: 320.

Song, Y.; Wei, W. and Qu. X. **Colorimetric biosensing using smart materials.** Adv Mater. 2011; 23: 4215.

Suh, S.H. and Jaykus, L.A. **Nucleic acid aptamers for capture and detection of Listeria spp.** J. Biotechnol. 2013; 167: 454.

Sur, D.; Ramamurthy, T.; Deen, J. and Bhattacharya, S.K. **Shigellosis: challenges and management issues.** Indian J Med Res. 2004; 120: 454.

Vanegas, D.C.; Ronga, Y.; Schwal, N.; Hills, K.D.; Gomes, C. and McLamore, E.S. **Rapid Detection of Listeria spp. using an Internalin A Aptasensor Based on Carbon-metal Nanohybrid Structures.** Smart Biomedical and Physiological Sensor Technology XII. 2015; 9487: 1.

Wang, K.Y.; Zeng, Y.L.; Yang, X.Y.; Li, W.B, and Lan, X.P. **Utility of aptamer-fluorescence in situ hybridization for rapid detection of Pseudomonas aeruginosa.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 2: 273.

Wang, Q.; Zhang, C.; Shen, G.; Liu, H.; Fu, H. and Cui, D. **Fluorescent carbon dots as an efficient siRNA nanocarrier for its interference therapy in gastric cancer cells.** J Nanobiotechnology. 2014; 12: 1.

Wang, R.; Xu, Y.; Zhang, T. and Jiang, Y. **Rapid and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using aptamer conjugated carbon dots as fluorescence probe.** *Anal. Methods.* 2015; 7: 1701.

Wang, Y. and Hu, A. **Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications.** *J. Mater. Chem. C.* 2014; 2: 6921.

Wu, S.; Duan, N.; Shi, Z.; Fang, C. and Wang, Z. **Simultaneous Aptasensor for Multiplex Pathogenic Bacteria Detection Based on Multicolor Upconversion Nanoparticles Labels.** *Anal. Chem.* 2014; 86: 3100.

Wu, S.Y.; Hulme, J. and An, S.S.A. **Recent Trends in the Detection of Pathogenic *Escherichia coli* O157 : H7.** *BioChip J.* 2015; 9: 173.

(a)Wu, W.; Fang, Z.; Zhao, S.; Lu, X.; Yu, L.; Meia, T. and Zeng, L. **A simple aptamer biosensor for *Salmonellae enteritidis* based on fluorescence-switch signaling graphene oxide.** *RSC Adv.* 2014; 4: 22009.

(b)Wu, W.; Li, J.; Pan, D.; Li, J.; Song, S.; Rong, M.; Li, Z.; Gao, J. and Lu, J. **Gold nanoparticle-based Enzyme-linked Antibody-aptamer Sandwich Assay for Detection of *Salmonella Typhimurium*.** *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014;19: 16974.

Wu, W.; Zhang, J.; Zheng, M.; Zhong, Y.; Yang, J.; Zhao, Y.; Wu, W.; Ye, W.; Wen, J.; Wang, Q. and Lu, J. **An Aptamer-Based Biosensor for Colorimetric Detection of *Escherichia coli* O157:H7.** *PLoS ONE* 2012; 7: 1.

Wu, W.; Zhao, S.; Mao, Y.; Fang, Z.; Lu, X. and Zeng, L. **A sensitive lateral flow biosensor for *Escherichia coli* O157:H7 detection based on aptamer mediated strand displacement amplification.** *Anal. Chim. Acta.* 2015; 861: 62.



Wu, W.H.; Li, M.; Wang, Y.; Ouyang, H.X.; Wang, L.; Li, C.X.; Cao, Y.C.; Meng, Q.H. and Lu J.X. **Aptasensors for rapid detection of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium.** *Nanoscale Res Lett.* 2012; 7: 658.

Yang, M.; Peng, Z.; Ning, Y.; Chen, Y.; Zhou, Q. and Deng, L. **Highly Specific and Cost-Efficient Detection of Salmonella Paratyphi A Combining Aptamers with Single-Walled Carbon Nanotubes.** *Sensors.* 2013; 13: 6865.

Yoo, S.M.; Kim, D.K. and Lee, S.Y. **Aptamer- functionalized localized surface plasmon resonance sensor for the multiplexed detection of different bacterial species.** *Talanta.* 2015; 132: 112.

(a) Yuan, J.; Tao, Z.; Yu, Y.; Ma, X.; Xia, Y.; Wang, L. and Wang, Z. **A visual detection method for Salmonella Typhimurium based on aptamer recognition and nanogold labeling.** *Food Control.* 2014; 37: 188.

(b) Yuan, J.; Wu S.; Duan, N.; Ma, X.; Xia, Y.; Chen, J.; Ding, Z. and Wang, Z. **A sensitive gold nanoparticle-based colorimetric aptasensor for Staphylococcus aureus.** *Talanta.* 2014; 127: 163.

(c) Yuan, J.; Yu, Y.; Li, C.; Ma, X.; Xia, Y.; Chen, J. and Wang, Z. **Visual detection and microplate assay for Staphylococcus aureus based on aptamer recognition coupled to tyramine signal amplification.** *Microchim Acta.* 2014; 181: 321.

Zelada-Guillen, G.A.; Riu, J.; Duzgun, A. And Rius F.X. **Immediate Detection of Living Bacteria at Ultralow Concentrations Using a Carbon Nanotube Based Potentiometric Aptasensor.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009; 48: 7334.

Zelada-Guillen, G.A. ; Sebastian-Avila, J.L. ; Blondeau, P. ; Riu, J. and Rius, F.X. **Label-free detection of Staphylococcus aureus in skin using real-time potentiometric biosensors based on carbon nanotubes and aptamers.** Biosens Bioelectron 2012; 31: 226.

Zelada-Guillen, G.A.; Bhosale, S.V.; Riu, J. and Rius, F.X. **Real-Time Potentiometric Detection of Bacteria in Complex Samples.** Anal. Chem. 2010; 82: 9254.

Zuo, P.; Li, X.; Dominguez, D.C. and Ye, B.C. **A PDMS/paper/glass hybrid microfluidic biochip integrated with aptamer-functionalized graphene oxide nano-biosensors for one-step multiplexed pathogen detection.** Lab Chip. 2013; 13: 3921.

## APÉNDICE II.1

Tabla 2.1. Tabla de resumen del estado del arte de la detección de bacterias mediante el uso de aptámeros como elemento de reconocimiento.

A) Información relativa a los aptámeros, métodos de detección y estrategias utilizadas.

B) Información relativa al uso de nanomateriales, parámetros de detección y referencias.

A)

Género	Bacteria diana	Aptámero			Modificación	Método de detección	Estrategia de detección
		Tipo	Nº	K <sub>D</sub> (nM)			
<b>Salmonella</b>	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	0.128 - 0.377	Biotina	PCR	Indirecta. Captura bacteria y extracción ADN
	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	1730	Biotina	qPCR	Indirecta. Captura bacteria, extracción de ADN
	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	0.128	Biotina	PCR	Indirecta. Captura, hibridación baliza molecular con gen ttr
	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	0.128	Biotina	PCR	Indirecta. Captura, hibridación baliza molecular con gen invA
	<i>S. enteritidis</i>	ADN	2	-	Biotina Sin modificar	PCR	Indirecta. Captura con aptámero1 y amplificación de aptámero2
	<i>S. typhimurium</i>	ADN	2	-	Biotina Tiol	Colorimetría	Sandwich entre aptámeros biotinilado y tiolado
	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	19.59 ± 0.35	Amino	Colorimetría Quimioluminiscencia	Indirecta. Captura magnética con aptámero sandwich de anticuerpos
	<i>S. paratyphi</i>	ADN	1	27 ± 5	Fluoresceína	Fluorescencia Colorimetría	Directa. Sonda ADNzima/ Aptámero
	<i>Salmonella O8</i>	ADN	1	32.04	Fluoresceína	Fluorescencia	Directa. Aptámero sobre bacteria
	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	6.33 ± 0.58	Fluoresceína Biotina	Fluorescencia	Directa. Captura magnética fluorescencia
	<i>S. enteritidis</i>	ADN	1	15.4 ± 1.8	Carboxifluoresceína	Fluorescencia	Directa. Inactivación/Activación de fluorescencia por acople/desacople de aptámero
	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	-	Amino	Fluorescencia	Directa, CD-Aptámero sobre bacterias
	<i>S. paratyphi</i>	ADN	1	47 ± 3	Sin modificar	Quimioluminiscencia	Directa Sonda ADNzima/ Aptámero
	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	-	Amino	Piezoelectrico	Directa, bacteria sobre el aptámero
	<i>S. enteritidis</i>	ADN	1	7	Tiol	Electroquímica (EIS)	Directa de bacteria sobre aptámero
	<i>S. typhi</i>	ADN	1	8.56	Sin modificar	Electroquímica (Potenciometría)	Directa Desacople aptámero/SWCNT
<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	25	Tiol	Electroquímica (EIS)	Directa, bacteria sobre los aptámeros	
<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	-	Tiol	Electroquímica (EIS)	Directa, bacteria sobre el aptámero	
<b>Escherichia</b>	<i>E. coli</i> DH5α	ARN	1	-	Sin modificar	RT-PCR	Indirecta. Captura por MP-Ab e interacción con aptámero
	<i>E. coli</i> O157:H7	ADN	2	-	Biotina Sin modificar	Colorimetría x flujo lateral	Indirecta. Captura c/ aptámero1 Amplificac. aptámero2
	<i>E. coli</i> O157:H7	ADN	2	-	Amino	Colorimetría	Directa. Plegamiento de aptámeros induce cambios color en nanovecículas
	<i>E. coli</i> k88	ADN	4	15 ± 4 66 ± 7 52 ± 8 106 ± 12	isotiocianato de fluoresceína (FITC)	Fluorescencia	Directa. Captura por MP-Ab e interacción con aptámeros
	<i>E. coli</i> O157	ADN	1	-	Sin modificar	Cronopotenciometría	Indirecta. FIA con electrodo sensible a protamina
	<i>E. coli</i> CETC 675	ARN	1	-	Amino	Electroquímica (Potenciometría)	Directa de bacterias sobre aptámeros
	<i>E. coli</i> O111	ADN	1	-	Sin modificar	Electroquímica (DPV)	Indirecta. Desplazamiento del aptámero inducido por la bacteria
	<i>E. coli</i> KCTC 2571	ADN	3	12.4 - 25.2	Amino Amino Amino	Electroquímica (Voltametría cíclica)	Detección directa por coctel de aptámeros
<b>Shigella</b>	<i>S. sonnei</i>	ADN	2	5.980 ± 0.835 14.32 ± 2.19	Biotina Hexaclorofluoresceína	Fluorescencia	Sandwich de aptámeros
	<i>S. dysenteriae</i>	ADN	1	23.47 ± 2.48	Carboxifluoresceína (FAM)	Fluorescencia	Directa. Aptámero-FAM sobre bacteria

<b>Streptococcus</b>	<i>S. mutans</i>	ADN	1	-	Tiol	Colorimetría	Directa. Oro coloidal unido a la bacteria via aptámero
	<i>S. pyogenes</i>	ADN	1	-	Sin modificar	Piezoeléctrica (QCM)	Indirecto. Desacople de aptámero de SWCNT genera cambios en frecuencia
<b>Staphylococcus</b>	<i>S. aureus</i>	ADN	1	rango nanomolar	Biotina	Colorimetría	Sandwich de aptámero Amplificación señal por tiramina, Au+3
	<i>S. aureus</i>	ADN	1	rango nanomolar	Biotina	Colorimetría	Sandwich de aptámero Amplificación señal por tiramina, TMB
	<i>S. aureus</i>	ADN	2	129 35	Biotina Amino	Dispersión de luz óptica	Indirecta. Separación magnética Conjugado aptámero-GNPs
	<i>S. aureus</i>	ADN	2	-	Biotina Tiol	Electroquímica (Volametría de redisolución anódica)	Dierecta. Captura magnetica e incubación con Aptámero-AgNPs
	<i>S. aureus</i>	ADN	2	-	Amino Pireno	Electroquímica (Potenciometría)	Directa. Desacople de aptámero de SWCNT genera cambio en potencial
	<i>S. aureus</i>	ADN	2	-	Pireno Amino	Electroquímica (Potenciometría)	Directa de bacterias sobre aptámeros
	<i>S. aureus</i>	ADN	1	-	Tiol	Electroquímica (EIS)	Directa de bacterias sobre aptámeros
<b>Listeria</b>	<i>L. monocytogenes</i>	ADN	1	35.7 ± 8.02	Biotina	RT-PCR	Indirecta. Captura magnetica y extracción de ADN
	<i>L. monocytogenes</i>	ADN	1	48.74 ± 3.11	Biotina Carboxifluoresceína	Fluorescencia	Sandwich de aptámeros
	<i>L. monocytogenes</i>	ADN	1	-	Alexa Fluor 647	Fluorescencia	Sandwich anticuerpo-aptámero
	<i>L. monocytogenes</i>	ADN	1	-	Sin modificar	Electroquímica (potenciometría)	Indirecta. Interacción electrostática entre protamina y aptámero
	<i>L. innocua</i>	ADN	1	-	Tiol	Electroquímica CV y EIS	Directa de bacterias sobre aptámeros
<b>Bacillus</b>	<i>B. thuringiensis</i>	ADN	1	-	Tiol	Fluorescencia	Directa. Interacción de QD-Aptámero con bacteria
	<i>B. anthracis</i>	ADN	1	-	Fluoróforo TYE 665 Quencher Iowa Black	Fluorescencia	Directa, Interacción baliza molecular-bacteria
<b>Campylobacter</b>	<i>C. jejuni</i>	ADN	2	-	Amino	Fluorescencia	Sandwich de aptámeros
<b>Salmonella, Escherichia</b>	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	-	Sin modificar	Colorimetría	Aptámero-GNPs en presencia de bacteria y sal
	<i>E. coli</i> O157:H7	ADN	1	-	Sin modificar	Colorimetría	Aptámero-GNPs en presencia de bacteria y sal
<b>Escherichia</b>	<i>E. coli</i> O157:H7	ADN	2	-	Amino	Colorimetría	Sandwich de aptámeros
	<i>E. coli</i> 8739	ADN	2	-	Biotina y digoxigenina	Colorimetría	Sandwich de aptámeros
<b>Salmonella, Escherichia, Staphylococcus</b>	<i>S. typhimurium</i>	ARN	1	-	Sin modificar	Fluorescencia	Sandwich de aptámeros
	<i>E. coli</i> O157:H7	ARN	1	-	Sin modificar	Fluorescencia	Sandwich de aptámeros
	<i>S. aureus</i>	ARN	1	-	Sin modificar	Fluorescencia	Sandwich de aptámeros
<b>Salmonella, Staphylococcus</b>	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	-	Biotina	Fluorescencia	Directa. Captura con aptámero-NMPs Señal fluorescente con Aptámero-UCNP
	<i>S. aureus</i>	ADN	1	-	Biotina	Fluorescencia	Directa. Captura con aptámero-NMPs Señal fluorescente con Aptámero-UCNP
<b>Salmonella, Vibrio</b>	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	-	Amino	Fluorescencia	Directa. Interacción de QD-Aptámero con bacteria
	<i>V. parahaemolyticus</i>	ADN	1	-	Amino	Fluorescencia	Directa. Interacción de QD-Aptámero con bacteria
	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	-	Sin modificar	Fluorescencia	Indirecta. Hibridación aptámero-hebra complementaria, intercalación AccuBlue
	<i>V. parahaemolyticus</i>	ADN	1	-	Sin modificar	Fluorescencia	Indirecta. Hibridación aptámero-hebra complementaria, intercalación AccuBlue
<b>Salmonella, Staphylococcus, Lacobacillus</b>	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	-	Cy3	Fluorescencia	Directa. Inmovilización de aptámero en GO (quencher fluoróforo)
	<i>S. aureus</i>	ADN	1	35	Cy3	Fluorescencia	Directa. Inmovilización de aptámero en GO (quencher fluoróforo)
	<i>L. acidophilus</i>	ADN	1	13	Cy3	Fluorescencia	Directa. Inmovilización de aptámero en GO (quencher fluoróforo)
<b>Salmonella, Staphylococcus, Vibrio</b>	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	-	Amino	Luminiscencia	Indirecta. Señal luminiscente con Aptámero-UCNP
	<i>S. aureus</i>	ADN	1	-	Amino	Luminiscencia	Indirecta. Señal luminiscente con Aptámero-UCNP
	<i>V. parahemolyticus</i>	ADN	1	-	Amino	Luminiscencia	Indirecta. Señal luminiscente con Aptámero-UCNP
<b>Salmonella, Lacobacillus, Pseudomonas</b>	<i>S. typhimurium</i>	ADN	1	-	Tiol	LSPR	Directa de bacterias sobre aptámeros inmovilizados en oro
	<i>L. acidophilus</i>	ADN	1	13 ± 3	Tiol	LSPR	Directa de bacterias sobre aptámeros inmovilizados en oro
	<i>P. aeruginosa</i>	ADN	1	17.27 ± 5	Tiol	LSPR	Directa de bacterias sobre aptámeros inmovilizados en oro

B)

Género	Bacteria diana	Nanomaterial/ Uso	Parámetros de detección			Referencia
			LOD (CFU/mL)	Tiempo	Rango (CFU/mL)	
<b>Salmonella</b>	<i>S. typhimurium</i>	-	10 - 100	-	-	Joshi, R., 2009
	<i>S. typhimurium</i>	-	340 - 3400			Dwivedi, H.P., 2013
	<i>S. typhimurium</i>	-	100			Jyoti, A., 2011
	<i>S. typhimurium</i>	-	100			Singh, G., 2012
	<i>S. enteritidis</i>	GNP/amplificación señal	10	-	10 - 10 <sup>6</sup>	Fang, Z., 2014
	<i>S. typhimurium</i>	GNP/amplificación señal	7	3 hr	10 - 10 <sup>6</sup>	Yuan, J., 2014a
	<i>S. typhimurium</i>	GNP/amplificación señal	1000 - 10000		10 <sup>3</sup> - 10 <sup>8</sup>	Wu, W., 2014b
	<i>S. paratyphi</i>	SWCNT/interacción con sonda	100000 1000000	-	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>10</sup> 10 <sup>6</sup> - 10 <sup>10</sup>	Ning, Y., 2014
	<i>Salmonella</i> O8	-	Presencia/ ausencia	1.5 - 2 hr	-	Liu, G., 2012
	<i>S. typhimurium</i>	NMP/separación amplificación señal	25		50 - 10 <sup>6</sup>	Duan, N., 2013a
	<i>S. enteritidis</i>	GO/quencher	40	30 min.	-	Wu, W., 2014a
	<i>S. typhimurium</i>	Puntos de carbono/ señal fluorescente	50	2 hr	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	Wang, R., 2015
	<i>S. paratyphi</i>	SWCNT/interacción con sonda	1000	-	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	Yang, M., 2013
	<i>S. typhimurium</i>	-	100		10 <sup>2</sup> - 4 x 10 <sup>4</sup>	Ozalp, V.C., 2014
	<i>S. enteritidis</i>	GNP/amplificación señal	600	10 min.	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	Labib, M., 2012a
	<i>S. typhi</i>	SWCNT/ transductor	0.2	< 1 min	0.2 - 10 <sup>3</sup>	Zelada-Guillen, G.A., 2009
	<i>S. typhimurium</i>	GNP/amplificación señal	600	10 min.	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	Labib, M., 2012b
<i>S. typhimurium</i>	GNP/amplificación señal GO/transductor	3		2.4 - 2.4 x 10 <sup>3</sup>	Ma, X., 2014	
<b>Escherichia</b>	<i>E. coli</i> DH5α	-	10		10 - 10 <sup>7</sup>	Lee, H.J., 2009
	<i>E. coli</i> O157:H7	GNP/amplificación señal	10		10 - 10 <sup>6</sup>	Wu, W., 2015
	<i>E. coli</i> O157:H7	Nanovesículas/ cambio de color (señal)	10000	2 hr	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>8</sup>	Wu, W., 2012
	<i>E. coli</i> k88	-	1100			Peng, Z., 2014
	<i>E. coli</i> O157	-	10		10 - 10 <sup>4</sup>	Lei, J., 2015
	<i>E. coli</i> CETC 675	SWCNT/ transductor	6		4 - 10 <sup>4</sup>	Zelada-Guillen, G.A., 2010
	<i>E. coli</i> O111	-	112 - 305	3.5 h.		Luo, C., 2012
	<i>E. coli</i> KCTC 2571	-	370			Kim, Y.S., 2014
<b>Shigella</b>	<i>S. sonnei</i>	-	30		10 <sup>2</sup> - 10 <sup>7</sup>	Gong, W., 2015
	<i>S. dysenteriae</i>	-	50			Duan, N., 2013

<b>Streptococcus</b>	<i>S. mutans</i>	Oro coloidal/ color (señal)	100000		$10^5 - 10^8$	Savory, N., 2014
	<i>S. pyogenes</i>	SWCNT/ acople del aptámero	12	40 min.	$3 \times 10^2 - 3 \times 10^6$	Shi, X., 2014
<b>Staphylococcus</b>	<i>S. aureus</i>		9		$10 - 10^6$	Yuan, J., 2014b
	<i>S. aureus</i>	-	8		$10 - 10^7$	Yuan, J., 2014c
	<i>S. aureus</i>	GNP/ amplificación señal	1	1.5 hr.		Chang, Y.C., 2013
	<i>S. aureus</i>	AgNPs/ amplificación señal electroquímica	1		$10 - 10^6$	Abbaspou, B., 2014
	<i>S. aureus</i>	SWCNT/ acople del aptámero y transductor	800 10000000			Zelada-Guillen, G.A., 2012
	<i>S. aureus</i>	GO y RGO/acoplami- ento de aptámeros y transductor	1	1-2 min.		Hernandez, R., 2014
	<i>S. aureus</i>	GNP/amplificación GO/transductor	10		$10 - 10^6$	Jia, F., 2014
<b>Listeria</b>	<i>L. monocytogenes</i>	-	20-200			Suh, S.H.,2013
	<i>L. monocytogenes</i>	-	75		$10^2 - 10^7$	Duan, N., 2013c
	<i>L. monocytogenes</i>	-	1000			Ohk, S.H., 2010
	<i>L. monocytogenes</i>	-	10			Ding, J., 2014
	<i>L. innocua</i>	RGO y Nanoplatino/ mejoramiento de la transducción	100	3 hr		Vanegas, D.C., 2015
<b>Bacillus</b>	<i>B. thuringiensis</i>	Puntos cuanticos (QD)/ señal fluorescente	1000			Ikanovic, M., 2007
	<i>B. anthracis</i>	-	30000 (esporas/mL)			Bruno, J.G., 2012
<b>Campylobacter</b>	<i>C. jejuni</i>	QD/ señal fluorescente	2.5	15 - 20 min		Bruno, J.G., 2009
<b>Salmonella, Escherichia</b>	<i>S. typhimurium</i> <i>E. coli</i> O157:H7	GNPs/ señal colorimétrica	100000	20 min		Wu, W.H., 2012
<b>Escherichia</b>	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>E. coli</i> 8739	QD y Oro coloidal / señal colorimétrica	300 (Células/test)			Bruno, J.G., 2014
<b>Salmonella, Escherichia, Staphylococcus</b>	<i>S. typhimurium</i> <i>E. coli</i> O157:H7 <i>S. aureus</i>	-	ausencia/ presencia			Maeng, J.S., 2012
<b>Salmonella, Staphylococcus</b>	<i>S. typhimurium</i> <i>S. aureus</i>	NMPs/captura y concentración UCNP/ señal fluorescente	5 8		$10 - 10^5$	Duan, N., 2012
<b>Salmonella, Staphylococcus, Vibrio</b>	<i>S. typhimurium</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	QD/ señal fluorescente	5000 5000		$3.8 \times 10^4 - 3.8 \times 10^7$ $3.4 \times 10^4 - 3.4 \times 10^7$	Duan, N.,2013d
	<i>S. typhimurium</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	-	25 35	1.5 hr	$50 - 10^6$	Duan, N., 2014
	<i>S. typhimurium</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	QD/ amplificación y señal fluorescente CNP/inactivación de señal	25 35		$50 - 10^6$	Duan, N., 2015
<b>Salmonella, Staphylococcus Lacobacillus</b>	<i>S. typhimurium</i> <i>S. aureus</i> <i>L. acidophylus</i>	GO/ Inactivación de la fluorescencia	61 800 11	10 min	42.2 - 675 $10^4 - 10^6$ 9.4 - 150	Zuo, P., 2013
	<i>S. typhimurium</i> <i>S. aureus</i> <i>V. parahemolyticus</i>	MNPs/ concentración UCNP/ señal luminiscente	15 10 25		$50 - 10^6$	Wu, S., 2014
	<i>S. typhimurium</i> <i>L. acidophylus</i> <i>P. aeruginosa</i>	Nanopartículas de sílice/ incremento de superficie de inmovilización	30 (CFU/ensayo)			Yoo, S.M., 2015

***CAPÍTULO 3. Estudio y caracterización de la afinidad  
aptámero-bacteria***



## Capítulo 3. Estudio y caracterización de la afinidad aptámero-bacteria

### 3.1 Introducción

#### *Identificación de las bacterias y las proteínas diana*

El microorganismo elegido como objetivo a ser detectado por el ensayo colorimétrico y los diferentes biosensores electroquímicos desarrollados en este trabajo, fue *S. typhimurium*. Esta elección se fundamentó en la importancia de este microorganismo en las enfermedades transmitidas por los alimentos. Por otro lado, el tipo de receptor biológico elegido para “reconocer” esta bacteria fue un aptámero de ADN, debido a las ventajas que este tipo de bioreceptor ofrece respecto a otros elementos de reconocimiento. El aptámero utilizado fue previamente seleccionado contra proteínas de la membrana externa de *S. typhimurium*. Esta selección fue llevada a cabo por un grupo de investigadores (Joshi, R., 2009) mediante el procedimiento denominado SELEX. En este procedimiento las dianas utilizadas para seleccionar los oligonucleótidos fueron tres proteínas de la membrana externa de *S. enterica serovar typhimurium* PT10: el transportador ABC, la proteína OmpA y el precursor de la proteína OmpD.

Se utilizaron tres técnicas para caracterizar *S. typhimurium*. Primero se realizó un chequeo de la cepas con las cuales se realizarían los primeros experimentos de detección, utilizando procedimientos de microbiología tradicional en placas de agar. Así se verificó la pertenencia de las cepas de *S. typhimurium* (analito) y *E. coli* O157 Shiga (control) a los géneros *Salmonella* y *Escherichia* respectivamente. Segundo, se verificó mediante electroforesis en gel que las proteínas utilizadas como dianas efectivamente estaban presentes en las membranas de *S. typhimurium* cepa SV5015, utilizada como analito en nuestros ensayos. Tercero, se determinó por medio del potencial Zeta la carga eléctrica de la bacteria *S. typhimurium* en las condiciones físico-químicas de experimentación. Esta última caracterización se realizó con el objeto de inferir conclusiones respecto a la unión

del aptámero a la bacteria, dado que ambos (bacteria y aptámero) poseen cargas netas que podrían influir en su afinidad.

También se aplicaron protocolos de identificación para *E. coli* O157 Shiga y *S. typhimurium* SV5015. Para ello se llevó a cabo una primera aproximación con la prueba de tinción Gram, para chequear que ambas bacterias pertenecían al grupo de las Gram negativas. El procedimiento de tinción Gram, desarrollado por Hans Christian Gram en 1884, se basa en las propiedades diferenciadoras de tinción de la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Figura 3.1). La reacción está basada en la retención de un tinte (complejo cristal violeta con iodo) dentro de la pared celular de la bacteria. El tinte es retenido en microorganismos Gram positivos aún después de lavarlos con alcohol. Las bacterias Gram negativas, las cuales pierden el tinte al lavarlas con alcohol, pueden subsecuentemente ser contrateñidas con safranina de coloración rosa.

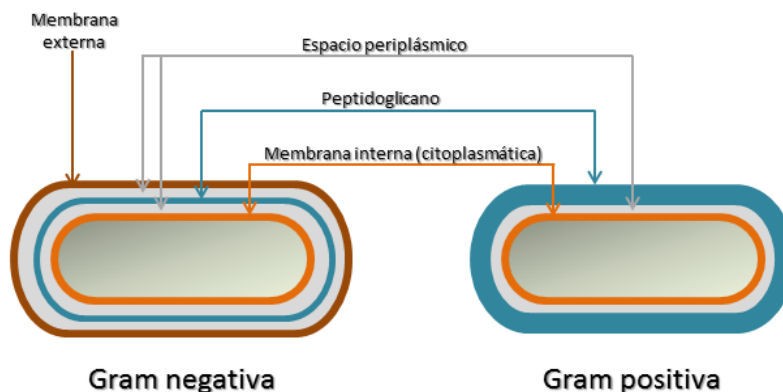


Figura 3.1. Diferencia entre bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Una vez comprobada esta característica básica, se efectuaron pruebas de identificación, basadas primero en el crecimiento en medios de cultivo para crecimiento general y luego en medios de cultivo selectivos.

Tal como se mencionó en el capítulo 1, las bacterias Gram negativas, como *S. typhimurium*, *E. coli* y *Shigella sonnei*, están rodeadas por dos membranas

concéntricas del tipo bicapa lipídica. Ambas membranas contienen proteínas que permiten que haya una transferencia de materia e información hacia y desde las células bacterianas. Las dos membranas difieren respecto a composición y función. Alrededor del 50 % de la masa de la membrana externa corresponde a proteínas, ya sea en forma de proteínas integrales o como lipoproteínas que están ancladas a la membrana. Más de una docena de lipoproteínas de la membrana externa han sido identificadas en *E. coli* (Blattner, F.R., 1997). Unas pocas proteínas integrales de membrana, tales como OmpA y porinas, se expresan en general a altos niveles. Además hay proteínas minoritarias cuya síntesis está fuertemente inducida cuando el metabolismo bacteriano las requiere, tales como algunas porinas específicas, receptores, componentes de varios sistemas de exportación de proteínas como autotransportadores y sistemas I a III (transportadores ABC, vías de secreción general), proteínas involucradas en la biogénesis de flagelo, pili y enzimas (Koebnik, R., 2000).

Las proteínas OmpA se encuentran en *E. coli* en una cantidad de alrededor de 100000 por cada célula, siendo una de las proteínas mayoritarias en la membrana externa de la bacteria. Estas proteínas, de configuración barril  $\beta$ , juegan un rol en la integridad de la superficie celular (Koebnik, R., 2000).

Los transportadores ABC (**A**TP **B**inding **C**assette) comprenden una de las más grandes de todas las familias de proteínas parálogas. Casi el 5% del genoma de *E. coli* codifica componentes de los transportadores ABC. Estos transportadores se encuentran en todos los procariontes, como también en plantas, hongos, levaduras y animales. Los transportadores ABC son bombas dependientes de ATP que pueden transportar moléculas hacia y desde las células; usan la energía liberada de la hidrólisis del ATP para transportar las moléculas a través de la membrana. En microorganismos, los transportadores ABC son fundamentales en la resistencia a antibióticos y antifúngicos (Vasiliou, V., 2009; Ralf Koebnik, R., 2000).

Los precursores OmpD son unas de las proteínas más abundantes en *S. typhimurium*, representando alrededor del 1 % del total de proteínas de la célula, y están reguladas por varios factores ambientales, incluyendo anaerobiosis, bajo pH y represión catabólica (Santiviago, C. A., 2003). Son porinas de especial interés porque son propias de *S. typhimurium*, mientras que no se encuentran en *E. coli* (Santiviago, C. A., 2001). Se cree que estas proteínas juegan un rol importante en la resistencia de *S. typhimurium* al antibiótico ceftriaxona (Hu, W.S., 2011).

Para extraer las proteínas de membrana se recurrió a un procedimiento básico que se puede resumir en las siguientes etapas: aislamiento de membranas, solubilización de las membranas, dilución en detergentes y concentración de la proteína en solución.

La detección de proteínas (transportadores ABC, OmpA y precursor OmpD) se efectuó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. La electroforesis se basa en la migración de especies iónicas a través de un gel poroso, causada por el efecto de un campo eléctrico. En particular, este campo eléctrico se aplica de manera tal que se polaricen los extremos del gel: uno con carga positiva y el otro con carga negativa. Las moléculas migran a través de los poros a una velocidad que es inversamente proporcional a su tamaño. El dodecilsulfato sódico (SDS) desnaturaliza por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos) (García Pérez, H.M., 2000). Esto permite que las proteínas migren hacia el extremo positivo del gel y de esta manera se pueden separar. Las especies migran hacia el ánodo, cargado positivamente, a mayor o menor velocidad dependiendo de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. La poliacrilamida se usa frecuentemente en electroforesis en gel dado que es químicamente inerte, de propiedades físicas uniformes, de preparación rápida y reproducible. Además, son geles

transparentes, con estabilidad mecánica, insolubles en agua y relativamente no iónicos. Estas características permiten una buena visualización de las bandas durante un tiempo prolongado (García Pérez, H.M, 2000). La electroforesis en gel es usada para separar mezclas de ADN, ARN o proteínas de acuerdo al tamaño molecular, la estructura tridimensional y la carga neta de la molécula.

La carga superficial de una bacteria juega un importante rol en la mantención de las funciones celulares. La carga neta de la superficie bacteriana se puede determinar aproximadamente midiendo el potencial Zeta, que es el potencial eléctrico de la región interfacial entre la superficie bacteriana y el ambiente acuoso (Wilson, W.W., 2001). El potencial Zeta ha sido reportado para un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas heterotróficas activas. Las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas poseen un punto isoeléctrico (PI) entre 1 y 4 (Hairden, V.P., 1952). Los componentes de la superficie de la bacteria están compuestos de macromoléculas que contienen grupos carboxilo, fosfato y amino, los cuales están ionizados según el pH ambiental, confiriéndole a la superficie celular una determinada carga electrostática. El potencial Zeta de las bacterias decrece sistemáticamente cuando aumenta el pH (Martinez, R.E., 2008). El potencial Zeta puede ser estimado midiendo la movilidad electroforética en un campo eléctrico. Las células bacterianas poseen una carga superficial electrostática neta negativa a pH fisiológico. Las moléculas que comprenden la envoltura celular exterior, que contribuyen a la electronegatividad neta de la superficie bacteriana, son estructuralmente desiguales y difieren según la Gram reactividad. El peptidoglicano de las bacterias Gram positivas influye en la electronegatividad de la superficie a causa de los grupos fosforilo, localizados en los residuos ácidos sustituyentes teicoico y teicurónico, como también en los grupos carboxilato insustituyentes. En contraste, el peptidoglicano de las bacterias Gram negativas está inserto dentro del espacio periplásmico y, por lo tanto, no está expuesto al medio externo. La carga electrostática negativa de estos microorganismos se la confieren los grupos fosforilo y 2-ceto-3-deoxioctonato carboxilato de los lipopolisacáridos (Beveridge, T.J., 1988 ).

### Estrategia para determinar la afinidad del aptámero por *S. typhimurium*

La estrategia utilizada para observar la unión aptámero-bacteria se basó en combinar la técnica de impresión por microcontacto ( $\mu$ CP) con la microscopía de fluorescencia. En primer lugar se “estampó” ácido 16-mercaptohexadecanoico (MHDA), con un patrón determinado, sobre una superficie de oro (Figura 3.2), formando una capa autoensamblada gracias a los grupos tiol del MHDA.

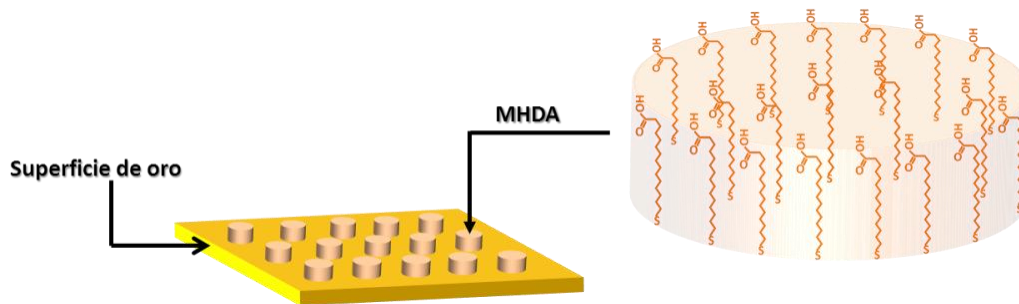


Figura 3.2. Patrón formado por impresión por microcontacto de una capa autoensamblada de MHDA sobre una superficie de oro.

En el segundo paso, la bacteria diana, *S. typhimurium*, se inmovilizó sobre el patrón de MHDA mediante enlaces amida entre los grupos carboxilo del MHDA y los grupos amino de las proteínas ubicadas en la membrana externa de las bacterias (Figura 3.3). Este paso fue caracterizado mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).

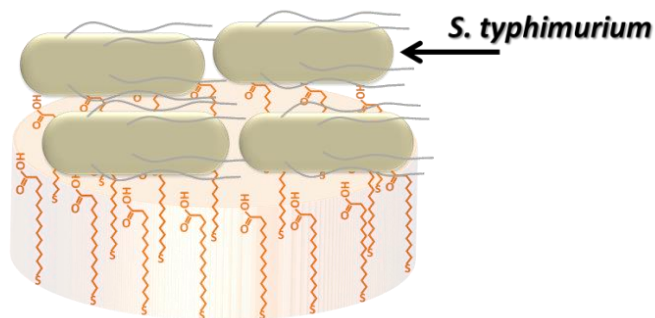


Figura 3.3. Inmovilización de *S. typhimurium* sobre una superficie de oro modificada con MHDA, mediante la formación de enlaces amida.

En el tercer paso, se incubó el aptámero biotinilado sobre la superficie modificada con bacteria en las condiciones óptimas para favorecer la interacción aptámero-bacteria (Figura 3.4).

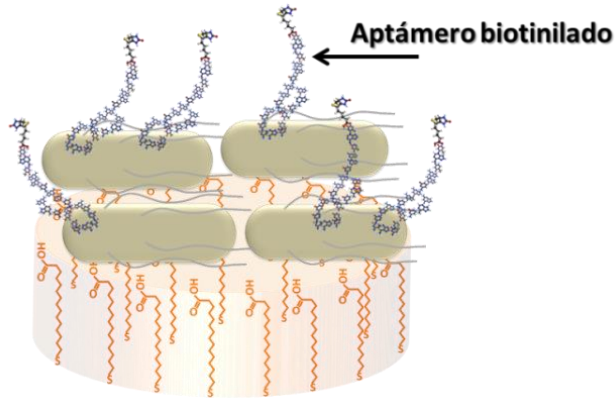


Figura 3.4. Interacción del aptámero biotinilado con las bacterias inmovilizadas.

En un cuarto paso, se incubó estreptavidina conjugada con el fluoróforo Texas Red para marcar la presencia del aptámero biotinilado sobre la superficie de las bacterias inmovilizadas (Figura 3.4).

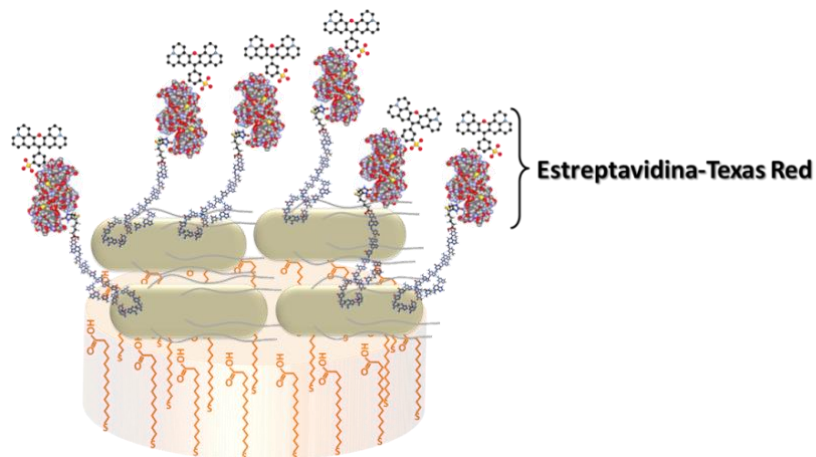


Figura 3.5. Marcaje de la unión de aptámero biotinilado-bacteria mediante estreptavidina-Texas Red.

Finalmente, mediante microscopía de fluorescencia se observó (indirectamente) la afinidad del aptámero por *S. typhimurium*.

#### *Impresión por microcontacto ( $\mu$ CP).*

La impresión por microcontacto ( $\mu$ CP) es una versión sofisticada de un proceso de estampado sencillo. Similar a la impresión convencional,  $\mu$ CP también incluye una tinta, un sustrato y un sello. A diferencia de las tintas usadas normalmente para las impresoras convencionales, las tintas o colorantes para  $\mu$ CP son soluciones impresas en capas monomoleculares con la finalidad de modificar la superficie (p. ej., para introducir grupos funcionales o moléculas de interés). En vez de papel, ropa u otro elemento, las superficies para  $\mu$ CP usualmente son sustratos de vidrio, metal o silicio. Y probablemente la diferencia más importante, es que en vez de un sello macroscópico, el sello para  $\mu$ CP tiene un patrón a nivel de microescala o aún nanoescala. En menos de dos décadas  $\mu$ CP ha emergido como método barato y sencillo para la preparación de superficies micro y nanoestructuradas.

El elemento clave en  $\mu$ CP es un sello polimérico, es decir una placa de polímero que soporta un patrón en relieve en uno de los lados. El sello se modifica con la solución a estampar antes de ponerse en contacto con la superficie del sustrato. Idealmente esa solución es transferida desde el sello al sustrato solo en el área de contacto (Kaufmann, T., 2010). La Figura 3.6 muestra el procedimiento básico para la preparación del sello y la impresión mediante  $\mu$ CP de moléculas sobre un sustrato específico, como puede ser una superficie de oro.



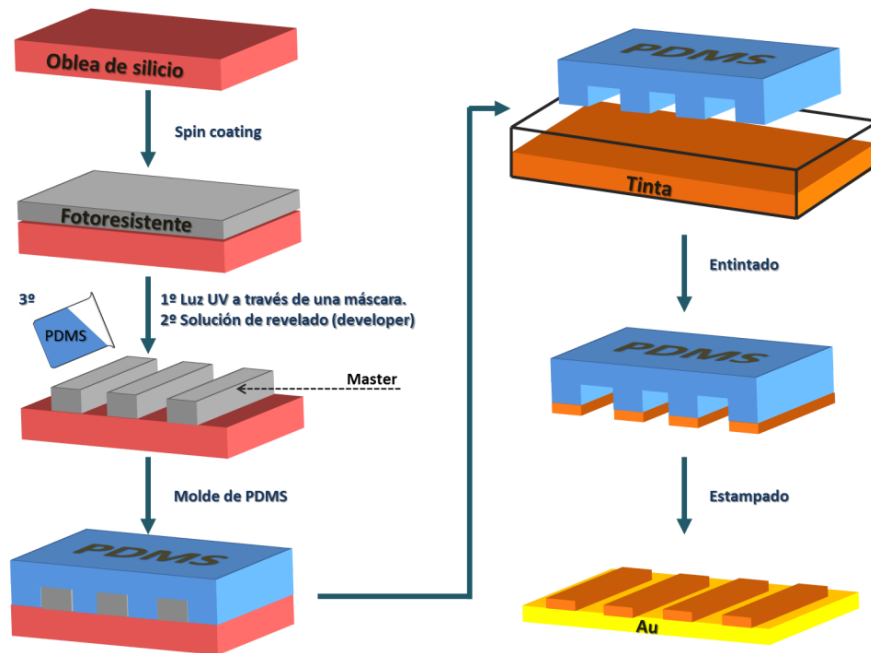


Figura 3.6. Fabricación del sello y procedimiento básico de un sistema de impresión por  $\mu$ CP. El polidimetilsiloxano (PDMS) es el material utilizado para fabricar el sello utilizado en el proceso de la impresión de una solución (tinta) sobre una superficie determinada (oro).

El polidimetilsiloxano (PDMS) es el material más ampliamente usado en la fabricación de sellos para  $\mu$ CP porque sus propiedades lo hacen muy adecuado para esta técnica de microimpresión. PDMS (Figura 3.7) es suficientemente flexible para favorecer un buen contacto, aún con superficies rugosas, y muestra suficiente rigidez mecánica para producir patrones en el rango micrométrico. El módulo de Young es una propiedad mecánica de los materiales sólidos elásticos lineales. Describe la capacidad de un material elástico para resistir a la deformación de una tensión aplicada (McKee C.T., 2011). El módulo de Young de un sello de PDMS es típicamente de unos 1.5 MPa (Kaufmann, T., 2010). Para tener una idea del significado de este valor, se puede mencionar que el módulo de Young de la piel del ser humano tiene un valor de 30 MPa (McKee C.T., 2011). Además el PDMS es transparente, lo cual es importante para aplicaciones ópticas y para controlar procesos directamente con la vista o con la ayuda de microscopios. El PDMS se prepara fácilmente, mediante un curado térmico del

prepolímero de unas pocas horas. Finalmente, el PDMS es un producto comercial de bajo coste (Kaufmann, T., 2010).

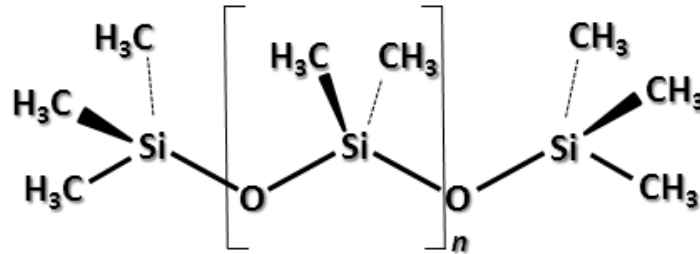


Figura 3.7. Estructura química del PDMS.

### *Microscopía de fuerza atómica (AFM)*

El microscopio de fuerza atómica (AFM, Atomic Force Microscope) pertenece a una familia extensa de instrumentos llamados microscopios de sonda de barrido (SPM, scanning probe microscope). El factor común de todos esos equipos es el uso de una sonda muy fina, con la cual se efectúa un barrido sobre una superficie de interés, con el fin de que las interacciones producidas entre la sonda y la superficie produzcan una imagen de muy alta resolución de la muestra, potencialmente a escala subnanométrica dependiendo de la técnica y de la sonda. En el caso de AFM la sonda es un estilete que interactúa directamente con la superficie, sondeando las fuerzas atractivas y repulsivas que existen entre la sonda y la superficie de la muestra para producir una imagen topográfica de alta resolución de la superficie tridimensional (Bowen, W.R., 2009).

En la Figura 3.8 se muestra la configuración básica del funcionamiento de un AFM. Los cantilevers o voladizos se asemejan a un trampolín, comúnmente en forma de “V” o rectangular. El cantilever tiene en su extremo libre una punta afilada, la cual actúa como sonda de interacción.

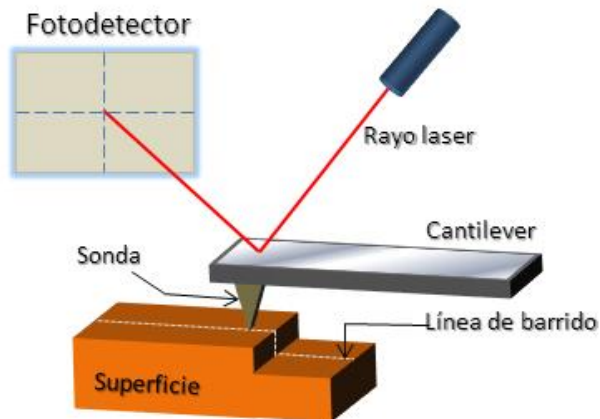


Figura 3.8. Funcionamiento teórico de la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Un rayo de luz láser se refleja en el lado reverso del cantilever sobre un fotodetector sensible a la posición. Cualquier deflexión del cantilever produce un cambio en la posición del punto láser sobre el fotodetector, permitiendo de esta manera monitorear los cambios en la deflexión.

### *Microscopía de fluorescencia*

La microscopía de fluorescencia está establecida como una herramienta de diagnóstico muy importante en casi todas las disciplinas científicas. Debido a su sensibilidad y especificidad molecular, esta técnica es empleada cada vez más para una amplia gama de aplicaciones. La microscopía de fluorescencia ha llegado a ser una técnica de microscopía ideal para la examinación de especímenes biológicos, fijos o vivos, debido a que permite la detección selectiva y específica de moléculas pequeñas con una buena relación señal-ruido. La fluorescencia es la emisión luminiscente que resulta de la absorción de fotones. Se distingue de la fosforescencia por la magnitud del tiempo de extinción. La emisión fluorescente cesa abruptamente cuando no hay aporte energético. El tiempo de extinción, o persistencia luminosa, de la emisión es del orden de  $10^{-8}$  segundos. En contraste, la extinción en fosforescencia tiene lugar en milisegundos o segundos (Studer, V., 2012). La Figura 3.9 muestra el principio básico de la

microscopía de fluorescencia y los componentes principales del microscopio de fluorescencia.

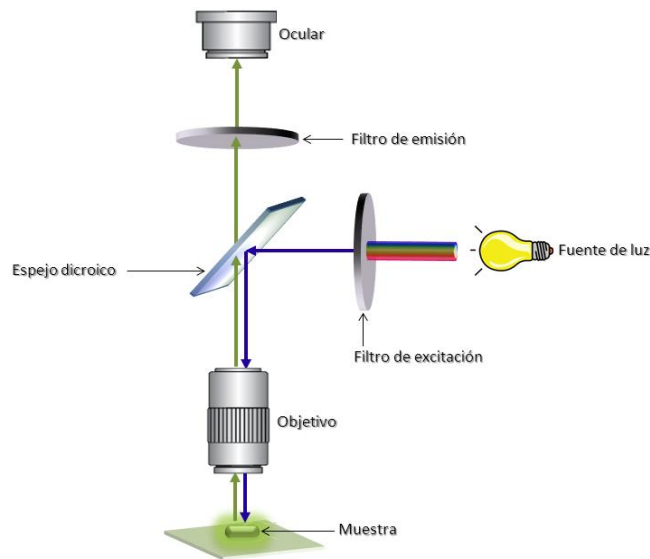


Figura 3.9. Funcionamiento teórico de la microscopía de fluorescencia para visualizar una muestra que ha sido marcada con un fluoróforo.

### 3.2 Materiales

Los siguientes medios de cultivo se adquirieron de Becton Dickinson: caldo lactosado (lactosa, 5 g/L; extracto de carne, 3 g/L; peptona, 5 g/L; pH  $6.9 \pm 0.2$ ), caldo nutriente (D(+)-glucose, 1 g/L; peptona, 15 g/L; NaCl, 6 g/L; extracto de levadura, 3 g/L; pH  $7.5 \pm 0.2$ ), Agar MacConkey (agar, 12 g/L; sales biliares, 5 g/L; lactosa, 10 g/L; rojo neutro 0.075 g/L; peptona, 20 g/L; pH  $7.1 \pm 0.2$ ), agar EMB (Eosina Azul de Metileno) (digerido enzimático de gelatina; lactosa, 5 g/L; sacarosa, 5 g/L; fosfato dipotásico, 2 g/L; agar, 13.5 g/L; eosina Y, 0.4 g/L; azul de metileno, 0.065 g/L; pH  $7.2 \pm 0.2$ ), caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (peptona de soja, 4.5 g/L; NaCl, 7.2 g/L; fosfato de potasio dihidrógeno, 1.26 g/L; fosfato dipotásico monohidrógeno, 0.18 g/L; cloruro de magnesio anhidro, 13.58 g/L; verde malaquita, 0.036 g/L; pH  $5.2 \pm 0.2$ ), agar XLT4 (Xylosa Lactosa Tergitol 4) (lactosa, 7.5 g/L; sacarosa, 7.5 g/L; tiosulfato de sodio, 6.8 g/L; L-lisina, 5 g/L;

NaCl, 5 g/L; xilosa, 3.75 g/L; extracto de levadura, 3 g/L; peptona de carne 1.6 g/L; citrato de amonio férrico, 0.8 g/L; rojo fenol, 0.08 g/L; tergitol 4, 4.6 ml; agar, 18 g/L) y caldo Tryptic Soy (TSB) (digerido enzimático de caseína, 17 g/L; digerido enzimático de harina de soja, 3 g/L; NaCl, 5 g/L; fosfato dipotásico, 2.5 g/L; dextrosa, 2.5 g/L; pH 7.3 ± 0.2). NaCl, etanol, 1-butanol y acetona se obtuvieron de Panreac. Las bacterias *S. typhimurium* cepa SV5015 y *E. coli* O157 Shiga fueron suministradas por el laboratorio Microbial biotechnology and host-pathogen interaction del Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC). La bacteria control positivo de *S. typhimurium* se compró en KPL. Las tabletas de tampón fosfato salino (PBS, 10 mM), HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfónico) 99.5 %, dodecil sulfato de sodio (SDS) 99 %, tubos de centrifuga 50 mL Nalgene, persulfato amónico (APS) 98 %, glicina, glicerol, β-mercaptoetanol, ácido clorhídrico (HCl), azul de bromofenol, ácido acético, metanol, ácido 16-mercaptohexadecanoico, N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), trietilenglicol mono-11-mercaptoundecil eter (PEG<sub>3</sub>-tiol), ácido sulfúrico, peróxido de hidrógeno, 2-(2-aminoetoxi)etanol y polidimetilsiloxano (PDMS) se adquirieron en Sigma Aldrich. El reactivo N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) se compró en Sharlab. El tris(hidroximetil)aminometano fue adquirido de Merck. El reactivo azul brillante Coomassie R250 fue adquirido de Thermo scientific. El conjugado de estreptavidina-Texas Red fue comprado en Life technology. El agente curante, Sylgard 184, fue adquirido de Dow Corning. El portaobjeto de vidrio utilizado para caracterizar la afinidad del aptámero-bacteria fue de marca NTB. Tanto el equipo de electroforesis como la solución de acrilamida/Bis 30% fueron adquiridos de BioRad. El aptámero biotinilado en 5' de secuencia: 5' Biotina-TEG-TT TGG TCC TTG TCT TAT GTC CAG AAT GCC CGC CTT TAC TAA ATT GAC GAA CAT AGG AAT CAA TGA AGC ATT TCT CCT ACT GGG ATA GGT GGA TTA T-3', fue comprado en DNA Technology. Los reactivos colorante básico cristal violeta, solución mordiente de lugol, solución decolorante alcohol-acetona y solución colorante de contraste safranina, fueron preparados en el laboratorio de microbiología aplicada medioambiental (Universidad Autónoma de Barcelona). La

centrífuga utilizada fue de marca Beckman Coulter, modelo Avanti J-30i. El baño térmico utilizado para el descongelamiento fue marca Julabo. Para esterilizar soluciones se utilizó el autoclave sterilab 25L. El termobloque utilizado fue de marca Eppendorf. Tanto las cubetas DTS1061 Z-Potential como el instrumento Zetasizer Nano ZS fueron adquiridos de Malvern. El microscopio de fluorescencia utilizado fue el modelo Eclipse E1000 upright (Nikon, Japan) y el microscopio binocular utilizado fue de marca Olympus.

### **3.3 Procedimientos**

#### *Identificación de bacterias*

Un inóculo de la bacteria a identificar se tomó desde un cultivo en placa de agar TSA (Tryptic Soy Agar) y se puso sobre un portaobjetos de vidrio, se agregaron unas gotas de agua destilada, y se esparció sobre el portaobjetos. Se fijó la muestra al portaobjetos; para ello se pasó varias veces rápidamente el portaobjetos con la muestra sobre la llama de un mechero Bunsen hasta que la muestra se secó. Se cubrió la muestra con una solución de cristal violeta durante 1 min. Se lavó con agua destilada para eliminar la solución de cristal violeta. Posteriormente se cubrió la muestra con una solución de lugol por 1 min. Se lavó la solución de lugol con agua destilada y se agregó una solución de alcohol-acetona por 5 s. Se lavó nuevamente con agua destilada y se agregó safranina por 1 min. Finalmente, se lavó con agua destilada, se secó y se examinó en el microscopio óptico a un aumento de 40x.

Para la identificación de *Salmonella* se realizó previamente un pre-enriquecimiento en un medio no selectivo como caldo lactosado; para ello se tomó un inóculo de un cultivo en placa de agar TSA, se puso en 200 mL de caldo nutriente y se incubó a 37 °C por 24 h. Posteriormente se realizó un enriquecimiento en un medio selectivo; para ello la muestra obtenida en el caldo lactosado se inculó en caldo RV y se incubó a 41.5 °C por 24 h. Finalmente, del cultivo obtenido en el medio

RV se tomó una muestra, se inoculó en el medio sólido selectivo y diferencial XLT4 y se incubó a 37 °C durante 18 - 24 h. Para la identificación de *E. coli* se tomó un inóculo de la bacteria a identificar y se hizo crecer en caldo nutriente a 37 °C por 24 h. Se tomó una muestra de este cultivo que se inoculó en los medios MacConkey y EMB por el método de placa en estrías y se incubaron las placas a 37 °C por 24 h.

#### *Recuperación de proteínas de membrana de S. typhimurium*

Se preparó 100 mL de medio de cultivo TSB en matraz erlenmeyer. Se esterilizó el medio de cultivo en autoclave. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, el medio de cultivo se inoculó con *S. typhimurium* y se dejó incubando por 16 h a 37 °C, con agitación. Se dispensó 1 mL del cultivo anterior en un tubo faldón con 35 mL de medio TSB y se dejó incubando por 3 h a 37 °C con agitación. Se traspasó el cultivo anterior a un tubo de centrifuga y luego se centrifugó a 1800 x g por 30 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante del centrifugado, se agregaron 35 mL de PBS, pH 7.4 (lavado 1) y se homogenizó en vortex por 1 min. Se centrifugó por segunda vez a 1800 x g por 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, se agregaron 35 mL de PBS, pH 7.4 (lavado 2) y se homogenizó en vortex. Por tercera vez se centrifugó a 1800 x g por 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, se agregaron 10 mL de tampón HEPES 10 mM con 2 % de SDS y se homogenizó en vortex. Se traspasó la solución anterior a un tubo faldón. Se puso el tubo con la solución en un recipiente con N<sub>2</sub> líquido hasta la congelación de la solución. Luego se puso el tubo con la solución congelada en agua a 50 °C hasta que la solución se descongeló. Este proceso de congelamiento-descongelamiento se repitió 5 veces. Se traspasó la solución con las células lisadas a un vaso de precipitado y se calentó hasta ebullición. Se dejó enfriar la solución, se traspasó a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 1800 x g por 10 min a 4 °C. Se traspasó el sobrenadante a otro tubo de centrifuga y se centrifugó a 100000 x g por 1 h a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, se añadieron en el mismo tubo 35 mL del tampón HEPES 10 mM con 1 % de SDS y se mantuvo por 1 h. Se

centrifugó la solución anterior a 100000 x g por 1 h a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron al mismo tubo 5 mL de HEPES 100 mM con 50 mM de NaCl. Se homogenizó la solución en el vortex y se guardaron alícuotas de 500 µL a -20 °C. Finalmente, se midió la concentración de proteínas de cuatro muestras de la solución final mediante el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

#### *Identificación de las proteínas de membrana de S. typhimurium*

Una solución Lower buffer stock se preparó con una concentración de 1.5 M de Tris, 1.4 mM de SDS y pH 8.8. La solución Upper buffer fue preparada con una concentración de 0.5 M de Tris, 14 mM de SDS y pH 6.8. En ambas soluciones se ajustó el pH con HCl concentrado. La solución de APS se preparó a una concentración de 0.44 M. Se preparó una solución de SDS 10 % (peso/volumen). Se limpiaron los componentes del equipo para electroforesis. Se prepararon dos soluciones en constante agitación. Solución 1: agua MilliQ (3.15 mL), buffer Lower gel (2.5 mL), acrilamida (4.2 mL), SDS 10% (0.1 mL), APS 10% (50 µL) y TEMED (5 µL). Solución 2: agua MilliQ (2 mL), buffer Upper gel (0.83 mL), acrilamida (0.45 mL) y SDS 10% (33.3 µL). Se agregó solución 1 entre los dos vidrios del equipo de electroforesis. Se agregó 1-butanol hasta solidificación del gel. Se eliminó el 1-butanol y se hicieron varios lavados con agua MilliQ al gel solidificado. A continuación se agregó a la solución 2, APS 10% (25 µL) y TEMED (2.5 µL). Finalmente se agregó esta última solución entre los dos vidrios. Se puso la peineta de pocillos entre los vidrios y se dejó solidificar.

Una solución Tank Buffer 5X se preparó con 15.5 g de Tris, 72.02 g de glicina y 1 L de agua MilliQ. El tampón de electroforesis Tank buffer 1X fue preparado con 80 mL de Tank buffer 5X, 4 mL de SDS 10% y se agregó agua MilliQ hasta completar un volumen de 400 mL. Para la solución Sample buffer 6X se agregaron 2 mL de glicerol, 1 mL β-mercaptoetanol, 0.46 g de SDS y Tris-HCl (0.375 M), pH 6.8. Se agregó agua MilliQ hasta los 10 mL y finalmente 0.2 mg de azul de bromofenol. La solución de Coomassie se preparó con 5 g de azul brillante Coomassie R250, 200



mL ácido acético, 900 mL de metanol y 900 mL de agua MilliQ. Finalmente la solución decolorante se preparó con 4.5 L de metanol, 5 L de agua MilliQ y 0.5 L de ácido acético.

Las muestras de proteínas obtenidas previamente a partir de las membranas de *S. typhimurium* se descongelaron y se agitaron en vortex. Se tomaron 20  $\mu$ L directamente de la muestra y se pusieron en un tubo eppendorf al cual se le agregaron 4  $\mu$ L de Sample buffer 6X. Se calentó por 3 min a 100 °C en termobloque. Se puso el gel con los vidrios en la cubeta de electroforesis. Se llenó la parte del medio de la cubeta con Tank buffer 1X. Se removió el peine de los pocillos y se llenó la cubeta con Tank buffer 1X. Se cargó el marcador con 2  $\mu$ L y la muestra de proteína con 22  $\mu$ L. Se tapó la cubeta y se hizo correr el gel a un amperaje constante de 40 mA. Una vez terminada la electroforesis se desmontaron los vidrios, se sacó el gel y se puso en una cubeta para teñirlo con la solución Coomassie durante 1 h con agitación a baja velocidad. Se hicieron lavados de 20 min y 10 min con la solución decolorante y un lavado con agua MilliQ hasta que quedó transparente. Sobre una tapa de porexpan se puso un trozo de papel Whatman mojado con agua MilliQ. Para deshidratar el gel, éste se puso sobre el papel y se cubrió con un film transparente. Se puso el gel en bandeja de vacío a 80 °C por 1.5 h.

#### *Determinación de la carga neta superficial de S. typhimurium*

Para estimar la carga superficial de las bacterias, se llevaron a cabo medidas de potencial Z con el instrumento Zetasizer Nano ZS, equilibrado a 25 °C. Se agregó 1 mL de solución de bacterias de concentración  $10^6$  CFU/mL en una cubeta DTS1061 Z-Potential y esta se insertó dentro de la cámara de medidas. El potencial Z se determinó midiendo la dirección y la velocidad de las bacterias dentro del campo eléctrico aplicado. Las medidas se realizaron en PBS 10 mM, pH 7.4, viscosidad 1.05 cp, índice de refracción 1.337, y asumiendo un índice de

refracción para *S. typhimurium* de 1.384, valor determinado para *E. coli* K-12 por Balaev (Balaev, A. E., 2002).

#### *Fabricación del sello de PDMS*

Se fabricó un sello de PDMS vertiendo una mezcla 10:1 de prepolímero y agente curante sobre un patrón de silicio (Centre Nacional de Microelectrònica – CNM) y se curó durante 2 h a 70 °C. Finalmente, el sello de PDMS fue retirado del patrón de silicio para su posterior uso. El diseño del sello de PDMS fue un arreglo regular de micropostes cilíndricos de 10 µm de diámetro y una separación entre ellos de 10 µm.

#### *Fabricación del chip de oro*

Para fabricar los substratos de oro (chips) se depositaron sobre un portaobjeto de vidrio los siguientes elementos: una capa de 3 nm de titanio, como promotor de adhesión, y sobre esta capa, 50 nm de oro. Posteriormente el portaobjeto fue cortado en piezas de 1 cm x 1 cm. El substrato de oro se sometió a ultrasonidos para su limpieza, primero en acetona y luego en etanol. A continuación se sumergió en una solución Piraña (3:7 v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) por 10 min; se lavó exhaustivamente con agua Milli-Q, etanol absoluto y finalmente se secó bajo un flujo de nitrógeno.

#### *Caracterización por AFM de la inmovilización de S. typhimurium sobre el chip de oro*

El sello de PDMS fue incubado con una solución etanólica 2 mM de MHDA por 15 min. Luego fue lavado con etanol absoluto y secado bajo un flujo de nitrógeno. Posteriormente el sello se puso en contacto con el substrato de oro por 2 min a temperatura ambiente para transferir el patrón de tiol a la superficie de oro mediante la formación de una capa de autoensamblaje. Las zonas que no entraron en contacto directo con el sello no formaron enlaces dativos con el MHDA y fueron

bloqueadas a continuación con una solución etanólica 5mM de PEG<sub>3</sub>-tiol durante 2 h. Posteriormente el chip se lavó con agua Milli-Q y se sumergió en una solución acuosa de 400 mM de EDC y 100 mM de NHS, agitando durante 30 min. Luego el chip se lavó con agua Milli-Q y se sumergió en una solución de concentración 10<sup>7</sup> CFU/mL de control positivo de *S. typhimurium* en PBS, pH 7.4, agitando durante 1 h. Finalmente, el chip se lavó con PBS y luego con agua Milli-Q. Las medidas de AFM se llevaron a cabo en modo intermitente (modo tapping), con una punta de silicio (MikroMasch, NSC15/AIBS con una constante de resorte de 40 N/m, frecuencia de resonancia de 325 kHz y un radio de punta nominal de 10 nm), en aire y a temperatura ambiente. Las imágenes de AFM fueron analizadas con el software WSxM (Nanotec Electronica S.L.).

#### *Caracterización mediante microscopía de fluorescencia de la afinidad del aptámero por S. typhimurium*

El chip con la bacteria inmovilizada se incubó en una solución 10 mM de 2-(2-aminoetoxietanol a pH 8.3, agitando por 30 min. El chip se lavó con agua Milli-Q y se incubó en una solución de aptámero biotinilado 4 nM en PBS, pH 7.4, con agitación durante 1 h. Luego se lavó el chip con PBS y se incubó en una solución de estreptavidina-Texas Red a una concentración de 0.04 mg/mL en PBS, pH 7.4, agitando por 1 h. Finalmente el chip se lavó con PBS, agua Milli-Q y se secó con N<sub>2</sub>. En cada uno de los pasos el chip se protegió de la luz con papel alúmina. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron utilizando el objetivo 40x Nikon air y el filtro G2A. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 596 y 615 respectivamente. Las imágenes se analizaron con el software de procesamiento de imágenes ImageJ, NIH, USA.

### 3.4 Resultados

#### 3.4.1. Identificación de bacterias

La observación al microscopio óptico de los portaobjetos de vidrio con las muestras de bacterias fijadas mostraron que en ambos casos la morfología de las bacterias fueron del tipo bacilar y la coloración de una tonalidad rosa para ambas muestras.

El medio de cultivo agar MacConkey, con lactosa entre sus componentes, permite diferenciar las bacterias que pueden fermentar la lactosa de las que no lo hacen. La aparición de colonias rosas/rojas en la placa indica la presencia de *E. coli* que sí tiene la capacidad para fermentar lactosa. Para el caso de bacterias no fermentadoras de lactosa, como *Salmonella*, las colonias se aprecian de color blanco o transparente. Por su parte, el medio agar Eosina Azul de Metileno (EMB) es selectivo para bacterias Gram negativas: provee un método rápido y exacto para distinguir *E. coli* de otras bacterias Gram negativas. Se distingue un color verde metálico brillante, como muestra la placa de la izquierda en la Figura 3.10A.

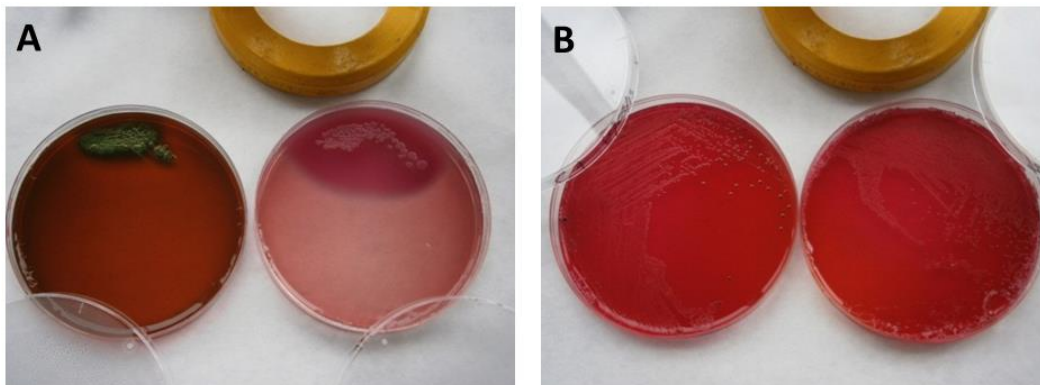


Figura 3.10. Resultados de la identificación de las bacterias *E. coli* y *Salmonella*. (A) Identificación de *E. coli*. (B) Identificación de *Salmonella*.

Las colonias no fermentadoras de lactosa, como por ejemplo *Salmonella*, aparecen translúcidas o rosas como muestra la placa de la derecha en la Figura 3.10A. Por otro lado con el medio RV, que es un caldo de enriquecimiento, se pudo aislar selectivamente *Salmonella*. Luego tomando un inóculo del cultivo anterior y cultivándolo en el medio sólido selectivo y diferencial XLT4 fue posible observar (Figura 3.10B) las típicas colonias de *Salmonella* (H<sub>2</sub>S-positivo) que aparecen totalmente negras o negras en el centro con un halo de color amarillo. La placa de la izquierda en la Figura 3.10B muestra el control positivo y la placa de la derecha muestra el resultado de la muestra con *S. typhimurium* SV5015.

### 3.4.2. Recuperación e identificación de proteínas de membrana y carga eléctrica neta superficial de *S. typhimurium*

La concentración media de proteínas en mg/mL para las cuatro muestras analizadas fue: 1.38 mg/mL  $\pm$  0.21. La Figura 3.11 muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida.

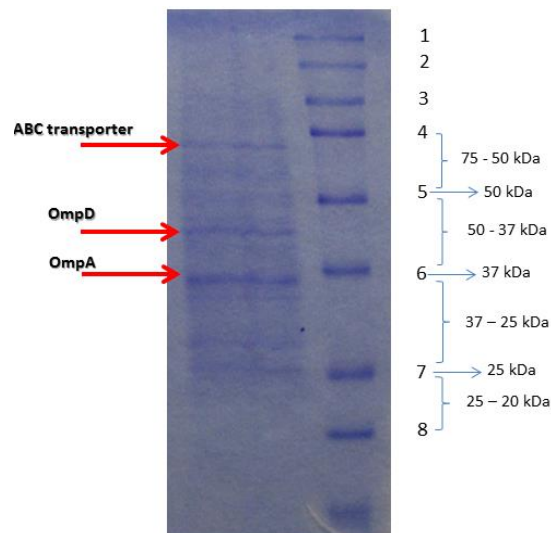


Figura 3.11. Resultado de SDS-PAGE que muestra las bandas correspondientes a las proteínas ABC transporter, OmpD y OmpA.

De acuerdo a la base de datos UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) los pesos moleculares de las proteínas a detectar por la electroforesis son aproximadamente 69 kDa, 40 kDa y 33 kDa para transportador ABC, precursor OmpD y OmpA respectivamente para la cepa *S. typhimurium* LT2. Con este resultado se confirma la presencia de estas proteínas, que corresponden a las dianas a las cuales se une el aptámero seleccionado.

Finalmente el valor del potencial Zeta, utilizando  $10^6$  CFU/mL, fue de  $-8.7 \text{ mV} \pm 0.9$ .

### 3.4.3. Fabricación del sello de PDMS

La Figura 3.12 A muestra el equipo de  $\mu$ CP al cual se le incorporó, después de la etapa de microimpresión, una lente de 40x, como muestra la Figura 3.12 B, para observar el patrón del sello de PDMS de 1 cm x 1 cm (Figura 3.12 C).

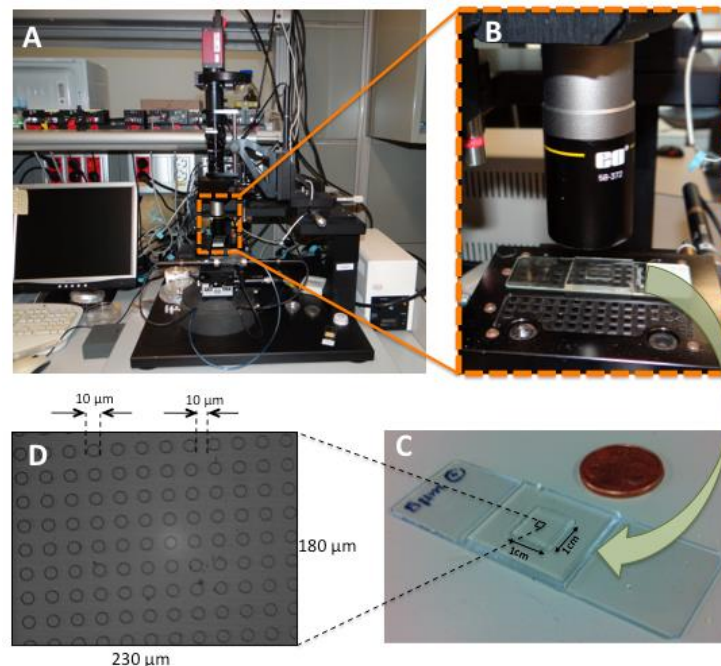


Figura 3.12. Equipo de  $\mu$ CP y sello de PDMS. A) Equipo de  $\mu$ CP, B) lente 40x, C) sello de PDMS de 1 cm x 1 cm, D) ampliación del sello de PDMS, en el cual se observan los micropostes cilíndricos de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y 10  $\mu\text{m}$  de separación.

En la Figura 3.12 D se muestra una ampliación del sello en la cual se pueden observar los micropostes cilíndricos de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y 5  $\mu\text{m}$  de altura, con una separación entre ellos de 10  $\mu\text{m}$ .

#### 3.4.4. Caracterización por AFM de la inmovilización de *S. typhimurium* sobre el chip de oro

La inmovilización de las bacterias sobre el chip de oro se realizó mediante enlaces amida. Este enlace se efectuó entre los grupos amino de las proteínas localizadas en la membrana externa de las bacterias y los grupos carboxilo de las moléculas MHDA estampadas en el chip. Esta inmovilización fue caracterizada por AFM. Los resultados de la Figura 3.13 A muestran la superficie del chip antes de la inmovilización de las bacterias.

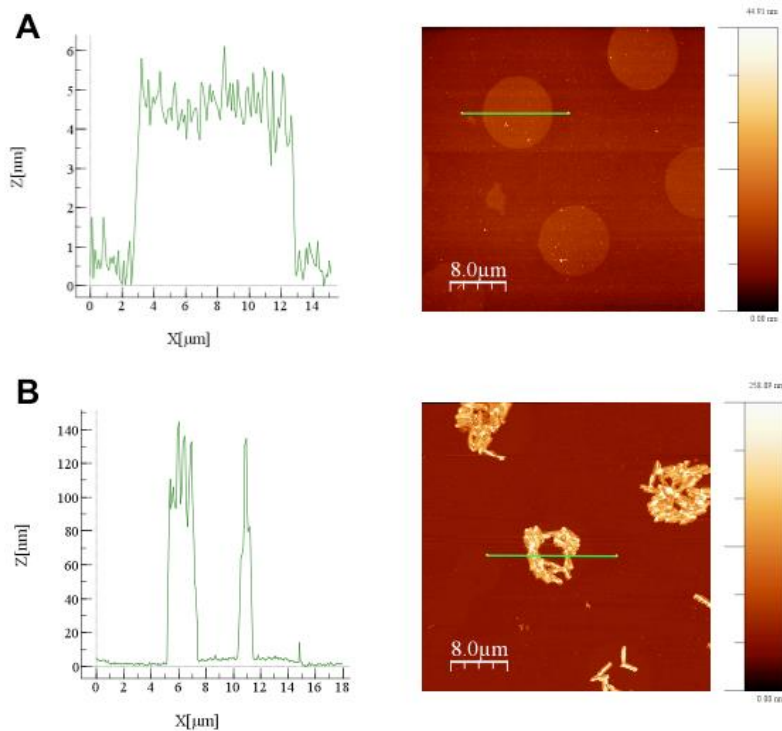


Figura 3.13. Caracterización por AFM. A) Antes de inmovilizar *S. typhimurium*. B) Después de inmovilizar *S. typhimurium*.

El resultado del perfilómetro en la misma Figura 3.13 A muestra que el diámetro de las zonas de inmovilización es 10  $\mu\text{m}$  y su separación es también de 10  $\mu\text{m}$ . Además se observa que la zona estampada tiene una altura de 4 - 5 nm.

La Figura 3.13 B muestra a las bacterias *S. typhimurium* inmovilizadas sobre el chip. El perfil muestra una altura de aproximadamente 140 nm, correspondiente al grosor o diámetro de la bacteria.

#### 3.4.5. Caracterización mediante microscopía de fluorescencia de la afinidad del aptámero por *S. typhimurium*

El estudio de la unión del aptámero a la bacteria *S. typhimurium* se realizó con cuatro chips como muestra la Figura 3.14.

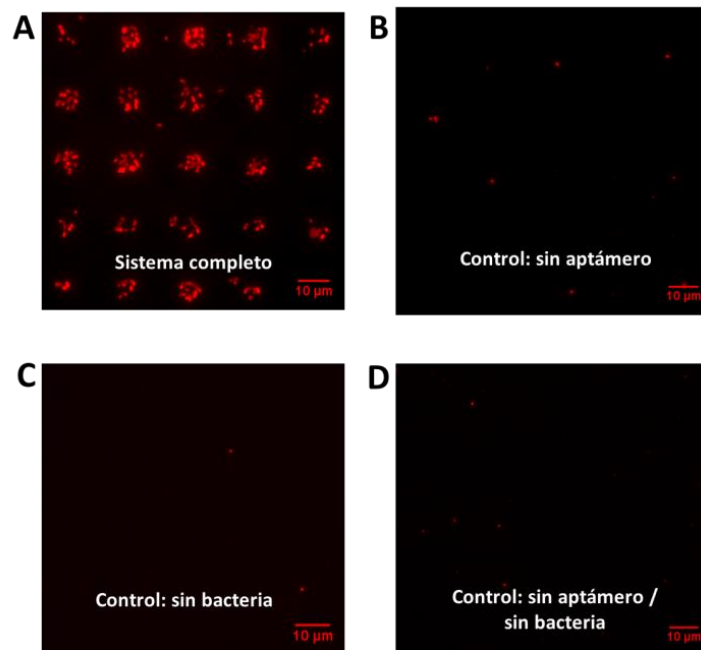


Figura 3.14. Caracterización por microscopía de fluorescencia. (A) Sistema completo: MHDA + bacteria + aptámero biotinilado + estreptavidina Texas Red, (B) control sin aptámero, (C) control sin bacteria, (D) control sin aptámero ni bacteria.



En uno de ellos (Figura 3.14 A) se construyó el sistema completo, es decir, sobre el chip de oro modificado con *S. typhimurium* mediante enlace covalente con el MHDA, se incubó el aptámero biotinilado y a continuación el conjugado estreptavidina-Texas Red. Los siguientes tres chips fueron utilizados a manera de control para verificar la ausencia o la baja adsorción inespecífica, tanto por parte del aptámero biotinilado como de la estreptavidina-Texas Red. Las Figuras 3.14 B, C y D muestran los resultados de los controles sin el aptámero biotinilado, sin bacteria y, finalmente, sin aptámero biotinilado ni bacteria, respectivamente.

### **3.5. Discusión y conclusiones**

#### **3.5.1. Identificación de bacterias**

De la observación al microscopio se concluyó que ambas muestras de bacteria pertenecen al grupo de las bacterias Gram negativas, grupo al que pertenecen *Salmonella spp* y *E. coli*.

De los resultados obtenidos, tanto de la observación de la tinción Gram como de las placas de agar selectivo, se concluyó que muestras rotuladas como “*E. coli* O157 Shiga” y “*S. typhimurium*”, pertenecen efectivamente a los géneros *Escherichia* y *Salmonella* respectivamente.

#### **3.5.2. Recuperación e identificación de proteínas de membrana de *S. typhimurium***

La concentración de proteínas obtenida (1.38 mg/mL) fue suficiente para detectar la presencia de las proteínas diana (transportador ABC, OmpA y precursor OmpD) mediante electroforesis en gel. El único valor encontrado como referencia fue el publicado por Marti y colaboradores (Marti, A., 1980), en cuyo trabajo alcanzaron una concentración final de proteínas totales de *S. typhimurium* LT2 de entre 3 y 5 mg/mL. En nuestro caso, el valor obtenido en la concentración total de proteínas

para *S. typhimurium* SV5015 se puede considerar como un valor aceptable, de acuerdo a la referencia encontrada. Dado que la concentración total de proteínas depende de la concentración de bacterias alcanzada, lo más probable es que hayamos obtenido una concentración de proteínas inferior ya que al iniciar el proceso de separación de proteínas, nuestra concentración de bacterias final fue levemente inferior.

### 3.5.3. Carga eléctrica neta superficial de *S. typhimurium*

El valor de potencial Z obtenido concuerda, tanto en magnitud como en signo (negativo), con valores reportados en condiciones similares para diferentes tipos de bacterias: -10.0 mV para *S. aureus* ATCC 12600; -8.0 mV para *S. epidermidis* HBH<sub>2</sub>102; -16.0 mV para *E. coli* O2K2 y -7.0 mV para *P. aeruginosa* AK1 (Gottenbos, B., 2001). La unión del aptámero y su diana, dada por la estructura tridimensional del aptámero, debería ser suficientemente fuerte para sobreponerse a la fuerza de repulsión electrostática producida entre ellos, además de que la conformación del aptámero puede ocultar parte de su carga negativa.

### 3.5.4. Caracterización por AFM de la inmovilización de *S. typhimurium* sobre el chip de oro

En cuanto a la preparación del chip de oro, se observó una perfecta regularidad de las zonas circulares, que corresponden al patrón formado por la capa autoensamblada de MHDA, via enlace S-Au. Este resultado también demostró que tanto la fabricación del sello de PDMS, como el procedimiento de estampado de las moléculas de MHDA, fueron realizados en forma correcta.

El proceso de inmovilización de *S. typhimurium* se llevó a cabo por medio de enlaces amida entre las bacterias y la capa autoensamblada de MHDA. Esto se demostró puesto que las bacterias se observaron en imágenes de AFM

mayoritariamente en las zonas circulares “estampadas” con MHDA mediante la técnica de  $\mu$ CP.

Los perfiles obtenidos por AFM mostraron que el diámetro de las zonas estampadas coincide exactamente con el diámetro del sello de PDMS, lo que quiere decir que la regularidad geométrica del sello fue de muy buena calidad.

Una monocapa de MHDA tiene un grosor de aproximadamente 20 Å (2 nm) (Evans, S.D., 1991). La altura de 4-5 nm mostrada por el perfil correspondiente a la superficie sin bacteria (Figura 3.9 A), en principio, daría cuenta que la inmovilización de MHDA no dió como resultado una monocapa. De acuerdo a Evans (Evans, S.D., 1991), el grosor de dos capas de MHDA es de aproximadamente 40 Å (4 nm). Una explicación a esta, aparentemente doble capa de MHDA, podría estar en el trabajo de Aleksey N. Vasiliev. Ellos notaron que al utilizar un exceso de ácido mercaptopropiónico para funcionalizar una superficie de plata se formaron multicapas debido a enlaces de hidrógeno intermoleculares muy fuertes (Vasiliev, A.N., 2009).

La altura de 140 nm, mostrada por el perfil correspondiente a la superficie después de la inmovilización de la bacteria (Figura 3.9 B), no coincide con el diámetro de la bacteria que es de aproximadamente 0.5  $\mu$ m. Son varios los factores, incluyendo variables ambientales como el modo de operación del AFM, que podrían interferir significativamente en la morfología de la bacteria (Bolshakova, A.V., 2004). Chao y colaboradores optimizaron los métodos de fijación de bacterias para observar su morfología por AFM (Chao Y., 2011). Los autores de este trabajo determinaron que las condiciones de barrido fueron críticas para determinar la morfología bacteriana. En aire la morfología de la bacteria fue más plana que en líquido debido a la deshidratación de la célula (Chao Y., 2011). Por lo tanto la explicación a nuestro resultado es que como las medidas se hicieron en aire, la deshidratación modificó la morfología de la bacteria, alterándose la altura medida por el AFM. La

imagen de AFM muestra claramente que las bacterias están inmovilizadas sobre la superficie de oro.

### 3.5.5. Caracterización por microscopía de fluorescencia de la afinidad del aptámero por *S. typhimurium*.

En la imagen de la Figura 3.11 A, se observó fluorescencia sólo en las zonas del patrón que fue estampado con MHDA para la posterior inmovilización de la bacteria diana. En los tres controles: sin aptámero biotinilado (B), sin bacteria (C) y sin aptámero biotinilado ni bacteria (D), no se observó emisión de fluorescencia significativa. Tanto el aptámero biotinilado como el conjugado estreptavidina-Texas Red, no mostraron una adsorción inespecífica significativa en ningún caso.

Este resultado nos indicó que efectivamente existe afinidad del aptámero por la bacteria *S. typhimurium*, lo que confirmó la posibilidad de desarrollar futuros sistemas de detección del patógeno *S. typhimurium* basados en el uso de este aptámero como elemento de reconocimiento. Es por ello que los siguientes capítulos abordan el diseño y desarrollo de diferentes biosensores para la detección inicial de *S. typhimurium*, basados en el uso de este aptámero como elemento de reconocimiento.

### 3.6. Referencias

Balaev, A.E.; Dvoretzki, K.N. and Doubrovski, V.A. **Refractive index of Escherichia coli cells**. Proc. SPIE. 2002; 4707: 253.

Beveridge, T.J. **Wall Ultrastructure: How little we know**. Amer. Soc. Microbiol. 1988: 3.

Blattner, F.R., Plunkett, G.; Bloch, C.A.; Perna, N.T., Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J.D.; Rode, C.K.; Mayhew, G.F., Gregor, J.; Davis, N.W.; Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A.; Rose, D.J.; Mau, B. and Shao, Y. **The complete genome sequence of Escherichia coli K-12**. Science 1997; 277: 1453.

Bolshakova, A.V.; Kiselyova, O.I; Filonova, A.S.; Frolova O.Y.; Lyubchenko, Y.L. and Yaminsky, I.V. **Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes**. Ultramicroscopy 2001; 86: 121.

Bowen, W.R. and Hilal, N. **Atomic Force Microscopy in Process Engineering**. 2009, Elsevier.

Chao, Y. and Zhang, T. **Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy**. Appl Microbiol Biotechnol 2011; 92: 381.

Evans, S. D.; Ulman, A.; Goppert-Berarducci, K. E. and Gerenser, L. J. **Self Assembled Multilayers of  $\omega$ -Mercaptoalkanoic Acids: Selective Ionic Interactions**. J Am Chem Soc 1991; 113: 5866.

García Pérez, H.M. **Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia**. Laboratorios Beterá, Univ Diag. 2000; 1: 31.

Gottenbos, B.; Grijpma, D.W.; van der Mei, H.C.; Feijen, J. and Bussche, H.J. **Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria.** J Antimicrob Chemoth. 2001; 48: 7.

Hairden, V.P. and Harris, J.O. J. **The Isoelectric Point of Bacterial Cells.** J. Bacteriol. 1952; 65: 198.

Hu, W.S.; Chen, H.-W.; Zhang, R.-Y.; Huang, C.-Yi and Shen, C-F. **The Expression Levels of Outer Membrane Proteins STM1530 and OmpD, Which Are Influenced by the CpxAR and BaeSR Two-Component Systems, Play Important Roles in the Ceftriaxone Resistance of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium.** Antimicrob Agents Ch. 2011; 55: 3829.

Joshi, R. ; Janagama, H. ; Dwivedi, H. P. ; Senthil Kumar, T.M.A. ; Jaykus, L. A.; Schefers, J. and Sreevatsan, S. **Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica* serovars.** Mol Cell Probe. 2009; 23: 20.

Kaufmann, T. and Ravoo B.J. **Stamps, inks and substrates: polymers in microcontact printing.** Polym. Chem. 2010; 1: 371.

Koebnik, R.; Locher, K.P. and Van Gelde, P. **Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell.** Mol Microbiol. 2000; 37: 239.

Marti, A.; Herrero, E.; Esteve, M.I.M. and Guerrero R. **Surface Density of Major Outer Membrane Proteins in *Salmonella typhimurium* in Different Growth Conditions.** J Gen Microbiol. 1980; 120: 355.

Martinez, R.E.; Pokrovsky, O.S.; Schott, J. and Oelkers, E.H. **Surface charge and zeta-potential of metabolically active and dead cyanobacteria.** J Colloid Interf Sci. 2008; 323: 317.

McKee, C.T.; Last, J.A.; Russell, P. and Murphy, C.J. **Indentation Versus Tensile Measurements of Young's Modulus for Soft Biological Tissues.** Tissue Eng. 2011; 17: 155.

Santiviago, C.A.; Toro, C.S.; Bucarey, S.A. and Mora G.C. **A chromosomal region surrounding the ompD porin gene marks a genetic difference between Salmonella typhi and the majority of Salmonella serovars.** Microbiology. 2001; 147: 1897.

Santiviago, C.A.; Toro, C.S.; Hildago, A.A.; Youderian, P. and Mora G.C. **Global regulation of the Salmonella enterica serovar Typhimurium major porin, OmpD.** J. Bacteriol. 2003; 185: 5901.

Studer, V.; Bobin, J.; Chahid, M.; Mousavi, H. S.; Candes, E. and Dahan, M. **Compressive fluorescence microscopy for biological and hyperspectral imaging.** PNAS 2012; 109: 1679.

Vasiliev, A.N.; Gulliver, E.A.; Khinast, J.G. and Riman, R.E. **Highly dispersible polymer-coated silver nanoparticles.** Surf Coat Tech. 2009; 203: 2841.

Vasiliou, V.; Vasiliou, K. and Nebert, D.W. **Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family.** Hum Genomics. 2009; 3: 81.

Wilson, W.W.; Wade, M.M.; Holman, S.C. and Champlin, F.R. **Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements.** J Microbiol Meth. 2001; 43: 153.

***CAPÍTULO 4. Estrategia de detección N°1: Detección de bacterias enteropatógenas mediante ensayo competitivo basado en el uso de partículas magnéticas***



## **Capítulo 4. Estrategia de detección N°1: Detección de bacterias enteropatógenas mediante ensayo competitivo basado en el uso de partículas magnéticas**

### **4.1. Introducción**

En el presente capítulo se desarrolla una primera estrategia de detección de bacterias enteropatógenas basada en un ensayo competitivo indirecto combinado con captura magnética. La idea de esta nueva forma de detección es, inicialmente, llevar a cabo la interacción aptámero-bacteria en solución. Luego mediante el uso de partículas magnéticas se busca la separación del sistema de detección que se construirá sobre las mismas partículas. En este capítulo se utilizan dos métodos de detección, colorimétrica y electroquímica, y finalmente se comparan los parámetros de comportamiento entre una y otra.

*Modificación de partículas magnéticas con S. typhimurium control positivo (STc+) y su utilización en un ensayo competitivo indirecto*

La separación magnética ofrece propiedades particularmente únicas que permiten el control del elemento diana de interés. Dado el comportamiento no magnético de la mayoría de las muestras biológicas, la diana puede ser separada de una forma muy selectiva, bajo condiciones muy suaves (bajas fuerzas de corte). De hecho, es posible llevar a cabo mediante separación magnética la purificación de células intactas, también organelos y compartimentos celulares y grandes complejos de proteínas (Borlido, L., 2013).

Varios tipos de partículas magnéticas están comercialmente disponibles, y la amplia mayoría está en el rango de los 10 nm a unos pocos  $\mu\text{m}$  de diámetro. En una partícula magnética, el material magnético está cubierto por una capa protectora que también es usada para funcionalizar la superficie de la partícula

(con grupos funcionales como grupos carboxilo, amino, etc) y así permitir la inmovilización de moléculas específicas. Se han modificado partículas magnéticas con estreptavidina, biotina, histidina, proteína A, proteína G, etc, para acciones de reconocimiento específico (Tekin, H.C., 2013). En concreto, las partículas magnéticas utilizadas en este trabajo son partículas uniformes de 2.8  $\mu\text{m}$  de diámetro, compuestas de un poliestireno con alta capacidad de entrecruzamiento, con material magnético precipitado en poros uniformemente distribuidos a través de las partículas. Las partículas, además, están recubiertas con una capa hidrofílica de glicidil éter que permite sellar el óxido de hierro al interior de las partículas. La superficie de las partículas está activada con grupos amino primarios mediante un enlazador hidrofílico corto. Estas partículas magnéticas comerciales, funcionalizadas con grupos amino primarios, fueron conjugadas con bacterias *S. typhimurium* control positivo (STc+) (Figura 4.1) de manera de construir un soporte móvil que fue utilizado en un ensayo competitivo indirecto para detectar patógenos bacterianos vivos.

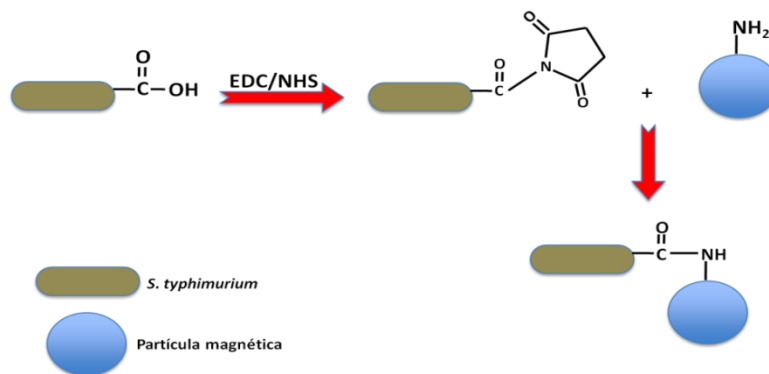


Figura 4.1. Modificación de partículas magnéticas con *S. typhimurium* control positivo (STc+).

### *Ensayo competitivo indirecto*

Modificadas las partículas magnéticas con STc+, estas se utilizaron en un ensayo competitivo indirecto para detectar colorimétrica y electroquímicamente bacterias

enteropatógenas. Este ensayo se realizó en tres pasos como se muestra en la Figura 4.2: pre-incubación, competición y detección.

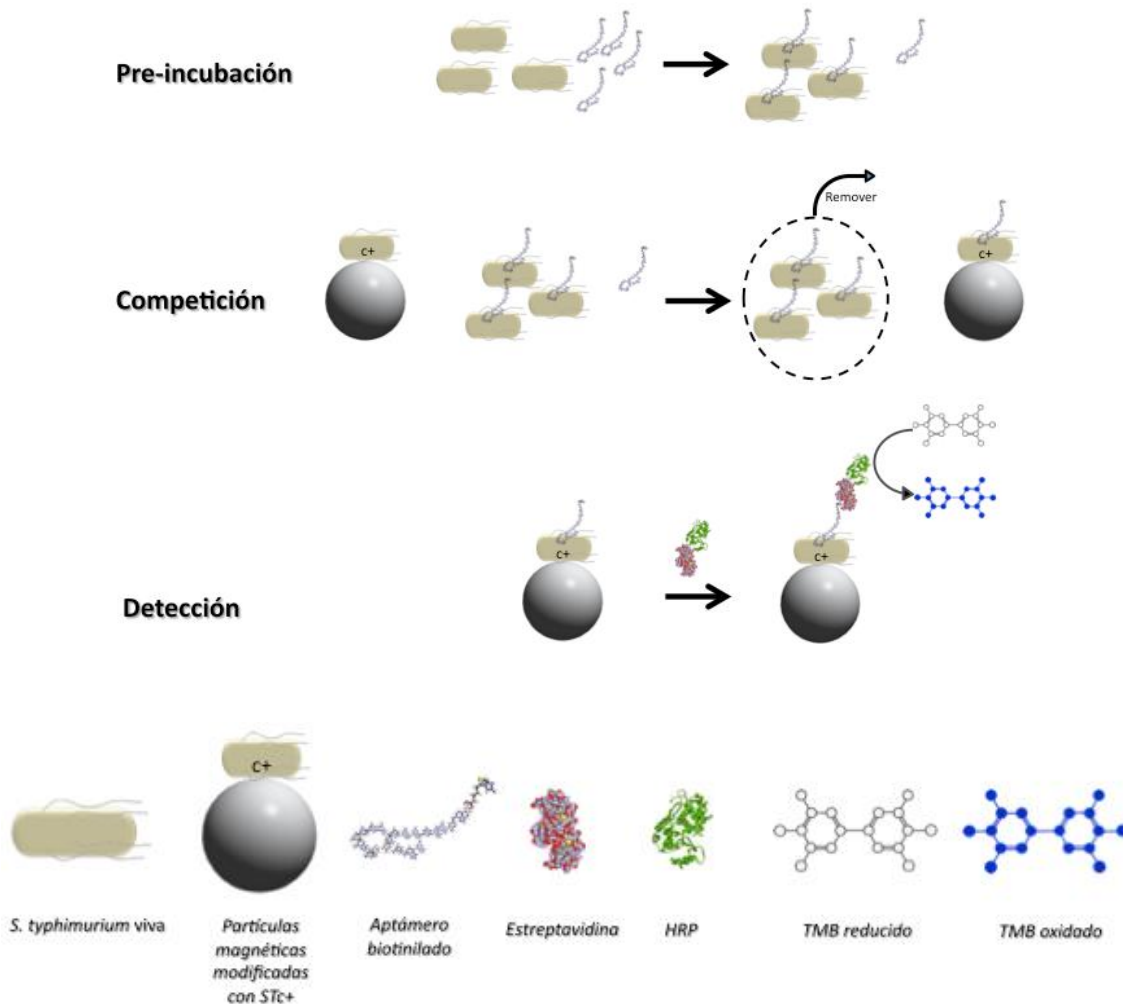


Figura 4.2. Ensayo competitivo indirecto. Los tres pasos principales del ensayo: pre-incubación, competición y detección. En el paso de detección colorimétrica la enzima HRP transforma el sustrato TMB reducido (incolore) en el producto TMB oxidado (azul). Para la detección electroquímica la enzima AP transforma el sustrato  $\alpha$ -NP en el producto electroquímicamente activo  $\alpha$ -naftol ( $\alpha$ -NOH).

En la pre-incubación se pone en contacto el elemento diana (*S. typhimurium*, viva) con el elemento de reconocimiento (aptámero biotinilado). En este paso, parte de los aptámeros se unen a las bacterias, específicamente a las proteínas transportador ABC, OmpA y precursor OmpD, quedando los aptámeros

remanentes libres en solución. En el segundo paso del ensayo, la competencia, las partículas magnéticas modificadas con STc+ se mezclan con la solución resultante del paso anterior. Mediante el uso de un magneto se separan las partículas magnéticas que llevan enlazados sobre las bacterias los aptámeros remanentes. En el paso de detección colorimétrica o electroquímica, los conjugados estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (estreptavidina-HRP) o neutravidina-fosfatasa alcalina (neutravidina-AP), respectivamente, se unieron al aptámero biotinilado.

En el caso de la detección colorimétrica el sustrato tetrametilbenzidina (TMB) reducido, incoloro, se transforma por medio de la enzima HRP en TMB oxidado de coloración azul y en el caso de la detección electroquímica, la enzima AP genera la molécula electroactiva  $\alpha$ -naftol ( $\alpha$ -NOH) a partir del sustrato  $\alpha$ -naftilfosfato ( $\alpha$ -NP).

#### *Microscopía electrónica de barrido (SEM) para la caracterización de las partículas magnéticas modificadas*

El microscopio electrónico de barrido usa electrones para formar una imagen. El haz de electrones se produce en la parte superior del microscopio, mediante una pistola de electrones, siguiendo el camino vertical a través de la columna del microscopio (Figura 4.3).

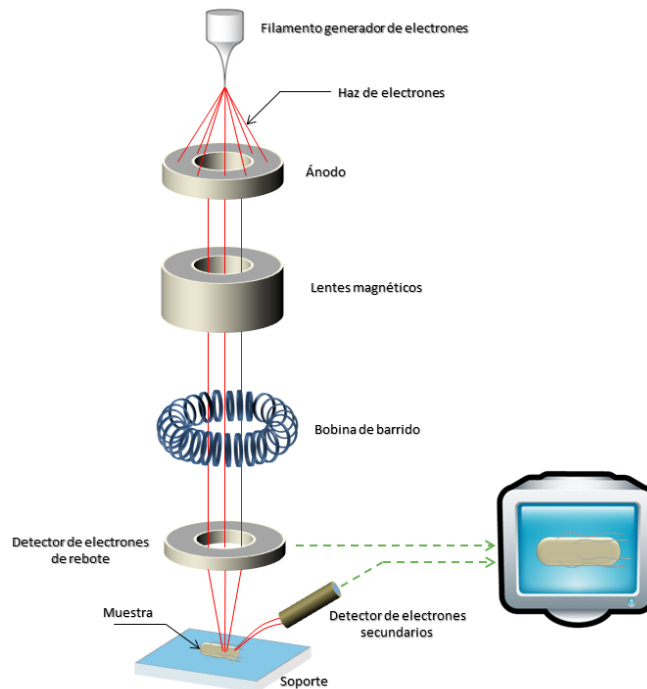


Figura 4.3. Principio de funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido (SEM).

Este haz se desplaza a través de lentes electromagnéticas, las cuales enfocan y direccionan el haz hacia la muestra. El haz continúa a través de un par de bobinas de barrido o un par de placas deflectoras, normalmente en la lente final, la cual desvía el rayo en los ejes X e Y de manera que se escanea sobre un área rectangular de la superficie de la muestra. El haz enfocado de electrones de alta energía genera una variedad de señales en la superficie de la muestra sólida. Las señales que derivan de la interacción electrón-muestra revelan información acerca de la muestra, incluyendo la morfología externa o la topografía de la superficie, y otras propiedades tales como la conductividad eléctrica. Diferentes detectores recogen las señales y las convierten en otras señales que son enviadas a una pantalla, desplegando una imagen. Esta imagen se captura digitalmente y se muestra en el monitor del computador. El aumento en un SEM puede ser controlado en un rango de 10 a 50000 veces. Dependiendo del instrumento, el rango de resolución está entre 1 y 20 nm (Cortadellas, N., 2012).

### *Optimización de las condiciones del ensayo competitivo*

La optimización de las condiciones del ensayo implica el estudio del efecto en la variación de los valores de los parámetros físico-químicos que permiten a la molécula de reconocimiento, el aptámero, tomar una conformación tridimensional específica que favorece la unión a su diana (*S. typhimurium*). Cuatro parámetros fueron optimizados: (1) composición de la solución tampón y su pH; (2) temperatura de pre-tratamiento del aptámero; (3) tiempo de pre-incubación entre el aptámero y el analito *S. typhimurium*; (4) concentración de aptámero.

### *Detección colorimétrica y electroquímica*

Para evaluar el comportamiento del ensayo en la detección colorimétrica de *S. typhimurium* se construyó una curva de calibración tras la optimización de las condiciones de trabajo, con la cual se determinaron tres parámetros fundamentales en la evaluación de un sistema de detección o biosensor: el LOD, la sensibilidad y el rango lineal. Otros parámetros de importancia fueron la selectividad y el tiempo de análisis. Para la selectividad se llevó a cabo el ensayo en presencia de otras seis bacterias y el tiempo total de análisis se determinó en base a la suma de los tiempos de incubación de los diferentes elementos del sistema de detección.

El objetivo de utilizar técnicas electroquímicas para la detección de un analito es mejorar los parámetros de comportamiento de un biosensor respecto a otras técnicas como las ópticas. Como se explicó en el capítulo 1, las técnicas electroquímicas permiten, entre otras mejoras, aumentar la sensibilidad del biosensor y, por tanto, reducir el LOD. Para realizar las medidas electroquímicas se utilizaron electrodos serigrafados y como técnica de detección electroquímica se utilizó la Voltametría de Pulso Diferencial (DPV).

La técnica DPV es muy usada para determinación analítica. La medida diferencial discrimina la corriente faradaica de la corriente capacitiva, lo que implica que la corriente que se está midiendo es principalmente debida a la oxidación y reducción de las especies en solución. Estas especies están directamente relacionadas a la concentración de analito en la muestra. En DPV, los pulsos de magnitud fija, superimpuestos sobre una pendiente de potencial lineal son aplicados al electrodo de trabajo a un tiempo justo antes y después de la caída del potencial (Figura 4.4 A). La corriente es muestreada dos veces, justo antes de la aplicación del pulso (punto 1 de Figura 4.4 A) y luego justo antes del final del pulso (después de ~40 ms, en el punto 2 de Figura 4.4 B, cuando la corriente de carga ha decaído). La primera corriente es sustraída de la segunda, y esta diferencia de corriente ( $\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$ ) es graficada contra el potencial aplicado. En el voltamograma resultante (Figura 4.4 B), consistente de un pico de corriente, la altura del pico es directamente proporcional a la concentración ( $C$ ) del analito, de acuerdo a la siguiente ecuación 4.1:

$$i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi t_m}} * \frac{1-\sigma}{1+\sigma} \quad \text{E.C. 4.1}$$

donde  $n$  es el número de electrones transferidos;  $F$ , es la constante de Faraday;  $A$  es el área del electrodo;  $D$  es el coeficiente de difusión;  $t_m$ , es el tiempo después de la aplicación del pulso donde la corriente es muestreada. Además  $\sigma$  tiene la siguiente expresión:

$$\sigma = \exp[(nF/RT)(\Delta E/2)], \quad \text{E.C. 4.2}$$

donde  $\Delta E$  es la amplitud del pulso,  $T$  es la temperatura absoluta, y  $R$  es la constante de los gases (Wang, J., 2006).

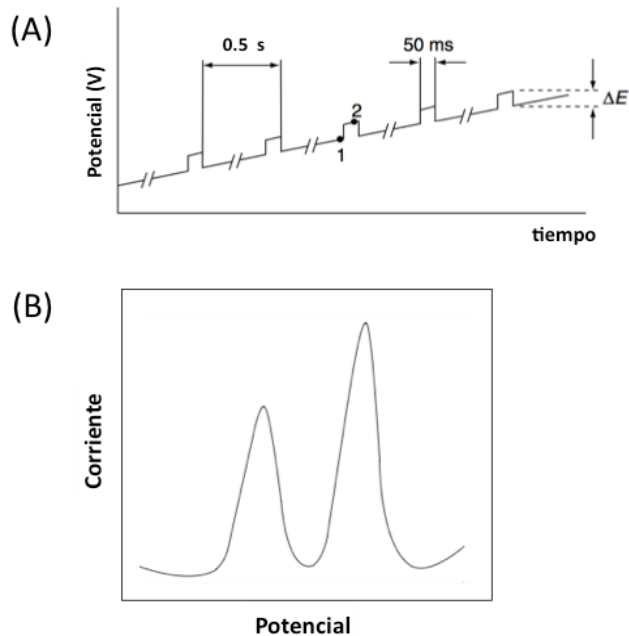


Figura 4.4. Técnica electroquímica DPV. (A) Señal de excitación para DPV. (B) Señal de salida para DPV (Wang, J., 2006).

La diferencia en el protocolo de trabajo para la detección electroquímica respecto a la detección colorimétrica está en el paso de detección (Figura 4.2), en el cual una vez que los aptámeros remanentes han interactuado con la bacteria inmovilizada sobre las partículas magnéticas, el siguiente paso es la incorporación del complejo neutravidina-AP en lugar de estreptavidina-HRP. Este cambio en el complejo de detección final está basado en que en el primer caso (neutravidina-AP) se determina la actividad enzimática a través de la medida del producto electroactivo generado ( $\alpha$ -NOH) y en el segundo caso (estreptavidina-HRP) se explota el cambio de color del TMB utilizado como sustrato enzimático.

Las medidas electroquímicas se efectuaron tras retener las partículas magnéticas en la zona del electrodo de trabajo (WE) con la ayuda de un magneto, como se observa en la Figura 4.5.



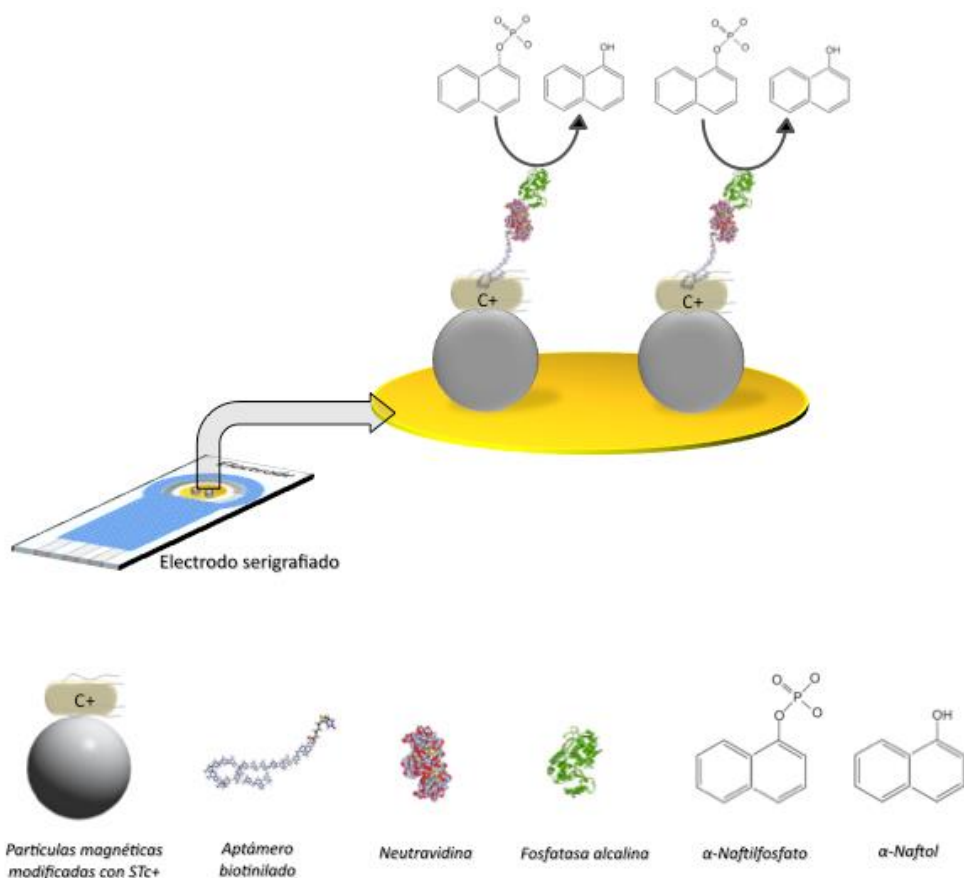


Figura 4.5. Detección electroquímica por DPV, mediante ensayo competitivo indirecto y partículas magnéticas modificadas con STc+.

## 4.2. Materiales

Las partículas magnéticas (MPs) recubiertas con grupos amino primarios (Dynabeads M-270 Amine) fueron compradas en Invitrogen. Los reactivos N-hidroxisuccinimida 97% (NHS), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), tampón fosfato salino (PBS) en tabletas, clorhidrato de hidroxilamina 99%, polioxietilen(20)sorbitanmonolaurato (Tween-20), glutaraldehido, ácido 2-N-morfolino etano sulfónico (MES), etanol, KCl, MgCl<sub>2</sub>, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), dietanolamina (DEA) y  $\alpha$ -naftilfosfato fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El aptámero biotinilado (5'-Biotin-TEG-TTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGCTATGGCGGCGTCACCCGACGGGGAC

TTGACATTATGACAGATTTCTCCTACTGGGATAGGTGGATTAT-3'), correspondiente al aptámero para *S. typhimurium* PT10 reportado por Joshi (Joshi, R., 2009) fue comprado en DNA Technology. El control positivo para *S. typhimurium* fue comprado a KPL. Las bacterias *S. typhimurium* cepa SV5015, *E. coli* O157 Shiga y *E. coli* k5 fueron proporcionadas por el laboratorio Microbial biotechnology and host-pathogen interaction (IBEC, Institut de Bioenginyeria de Catalunya). Las bacterias *S. sonnei*, *P. mirabilis*, *B. cereus* y *K. lutea* fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología aplicada y medio ambiental (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona). Se utilizaron placas de 96 pocillos Nunc compradas en Thermo Scientific. Para la caracterización por SEM se utilizó un portaobjeto de vidrio circular 12 mm de Knittel Glass. Las medidas colorimétricas fueron realizadas con un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Rad Laboratories Inc.). El microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope) utilizado fue Nova NanoSEM 230 (FEI company). Los electrodos serigrafados 250 AT, compuestos por un electrodo de trabajo de oro, el auxiliar de platino y el de referencia de plata fueron comprados en Dropsens. Para las medidas electroquímicas se utilizó un potencióstato Bio-Logic 150 SP.

### **4.3. Procedimientos**

#### *Modificación de partículas magnéticas*

Las partículas magnéticas funcionalizadas con grupos amino primarios fueron conjugadas con diferentes concentraciones de bacterias STc+ para establecer la concentración óptima de bacterias a inmovilizar. Siguiendo el protocolo (con algunas variaciones) de la compañía proveedora de las partículas, primero se procedió al lavado de las partículas magnéticas. Para ello, 40  $\mu$ L de una suspensión de partículas magnéticas (de stock) con concentración de  $2 \times 10^9$  partículas/mL, fueron lavadas con 200  $\mu$ L de una solución tampón MES 0.1 M y pH

4.5 bajo agitación con vórtex durante 1 min. Luego las partículas magnéticas se colocaron en un magneto durante 4 min. Se eliminó el sobrenadante y las partículas fueron resuspendidas en 200  $\mu$ L de tampón MES. Este paso fue repetido tres veces. Finalmente, las partículas magnéticas fueron resuspendidas en 80  $\mu$ L de tampón MES. Se agregaron 120  $\mu$ L de NHS/EDC (100 mM/400 nM) y STc+ a una concentración de  $10^7$  CFU/mL. La solución se incubó durante 2 h a temperatura ambiente bajo agitación por rotación moderada. Posteriormente se agregó clorhidrato de hidroxilamina y se incubó durante 15 min. Las partículas magnéticas modificadas con STc+ (MMP) se lavaron cuatro veces con 200  $\mu$ L de PBS-Tween (0.1 % Tween 20). Finalmente se resuspendieron en 80  $\mu$ L del mismo tampón y se almacenaron a 4°C. Este protocolo se repitió con las bacterias vivas y estériles. Para establecer la relación óptima bacterias/partículas magnéticas, se llevó a cabo el protocolo previo conjugando las partículas magnéticas con STc+ a concentraciones de  $10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$  y  $8 \times 10^7$  CFU/mL.

#### *Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de las MMPs*

8 $\mu$ L de MMP y partículas magnéticas sin modificar se depositaron en portaobjetos de vidrio y se secaron a temperatura ambiente. La fijación de las muestras se realizó sumergiendo los portaobjetos en una solución de glutaraldehído (2.5 % en PB 0.1 M) durante 1.5 h. Las muestras se lavaron en PB 0.1 M cuatro veces durante 10 min. Posteriormente se procedió a la deshidratación de las muestras en cuatro pasos: etanol 50 %, una vez durante 10 min; etanol 70 %, dos veces durante 10 min; etanol 90 %, tres veces durante 10 min; etanol 100 %, tres veces durante 10 min. Todos los pasos de deshidratación se realizaron a temperatura ambiente, con agitación suave. Finalmente se tomaron imágenes usando un voltaje (HV) de 3.00 kV y una corriente de 40 pA.

### *Optimización de las condiciones del ensayo*

Se estudió el efecto sobre la interacción bacteria-aptámero de tres soluciones tampón (diferentes fuerzas iónicas y pH), incubando *S. typhimurium* ( $10^7$  CFU/mL) con el aptámero biotinilado (10 nM) en una solución de PBS (10 mM con 2.7 mM NaCl y 137 mM KCl; 100 mM con 5 mM KCl; o 100 mM con 5 mM KCl y 20 mM  $MgCl_2$ ; a pH 6.0, 7.4 o 8.5).

El efecto de la aplicación de un pre-tratamiento térmico del aptámero se estudió calentando a 95 °C por 5 min una solución de aptámero biotinilado 10 nM en PBS (10 mM con 2.7 mM NaCl y 137 mM KCl ), pH 7.4. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 30 min. Una muestra de aptámero sin precalentar se utilizó a modo de comparación. Una muestra del aptámero biotinilado 10 nM, con y sin pre-tratamiento térmico, se incubó con *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL. Se evaluaron tres tiempos de pre-incubación (15, 30 y 60 min) entre *S. typhimurium* ( $10^7$  CFU/mL) y el aptámero biotinilado 10 nM en una solución de PBS 10 mM, pH 7.4. Finalmente se experimentaron cuatro concentraciones de aptámero biotinilado (1, 3, 5 y 10 nM) en la pre-incubación con *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL, en PBS 10 mM, pH 7.4. Luego de la pre-incubación del aptámero con *S. typhimurium* se realizó el ensayo competitivo. Para ello se llevó a cabo una incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* previamente formado y MMPs a una concentración de  $4 \times 10^7$  MMPs/mL, durante 30 min. Luego de lavar las MMPs cuatro veces con PBS-Tween, se incubaron en una una solución 1 nM de estreptavidina-HRP o neutravidina-AP en PBS durante 1 h, para la detección colorimétrica o electroquímica, respectivamente, como se muestra en la Figura 4.6.

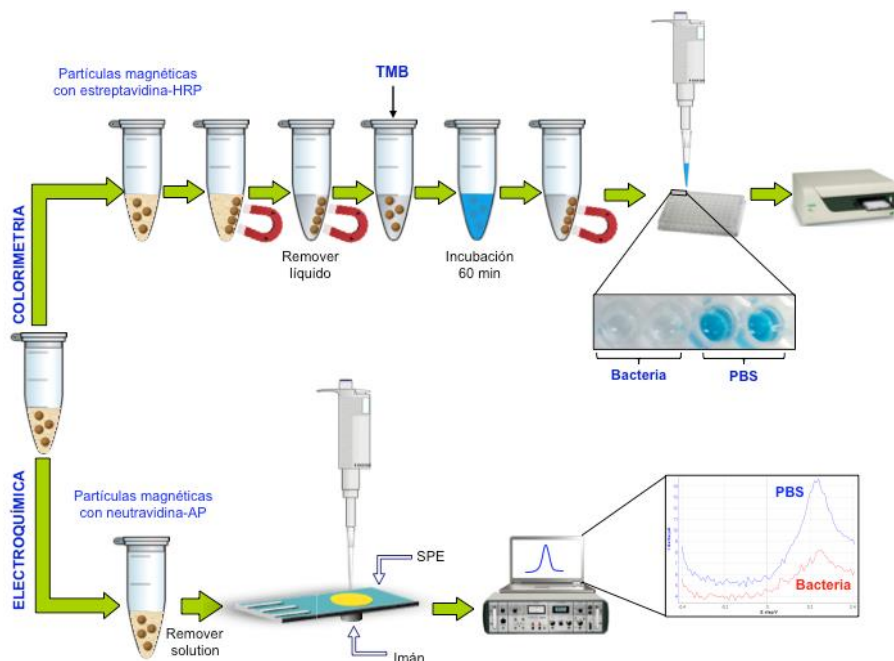


Figura 4.6. Diagrama que muestra la detección colorimétrica y electroquímica después de haber incubado las partículas magnéticas con estreptavidina-HRP o neutravidina-AP respectivamente.

Tanto para la detección colorimétrica como electroquímica se continuó con los protocolos de los apartados “*Detección colorimétrica*” y “*Detección electroquímica*”.

#### *Detección colorimétrica*

Luego de incubar las MMPs en estreptavidina-HRP, se realizó una incubación en 100  $\mu\text{L}$  de TMB durante 1 h. Se realizaron medidas de absorbancia a 620 nm. Se construyó una curva de calibración de absorbancia versus concentración de *S. typhimurium* en un rango de  $10^1$  a  $10^8$  CFU/mL. La selectividad del ensayo colorimétrico fue estudiada exponiendo la solución de aptámero biotinilado optimizada a diferentes bacterias (*S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga, *Shigella sonnei*, *E. coli* k5, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus* y *Kocuria lutea*) a una concentración de  $10^7$  CFU/mL.

## *Detección electroquímica*

Después de incubar las MMPs en neutravidina-AP, se depositaron 50  $\mu\text{L}$  sobre el electrodo de trabajo (oro) y fueron retenidas por la atracción de un imán externo. Se retiró la solución de PBS, dejando sólo las partículas magnéticas y posteriormente se agregaron 60  $\mu\text{L}$  del sustrato enzimático  $\alpha\text{-NP}$  a una concentración de 4 mg/mL en tampón DEA 0.1 M, pH 9.5. Se llevaron a cabo medidas de DPV a una velocidad de barrido de 0.2 V/s, entre los potenciales -0.4 a 0.4 V (potencial del pulso: 0.04 V; tiempo del pulso: 0.2 s) y la corriente de oxidación se midió a 0.25 V.

Se construyeron curvas de calibración de intensidad de corriente versus concentración de *S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *Shigella sonnei*, en el rango  $10^1$  a  $10^8$  CFU/mL. La selectividad del biosensor electroquímico fue ensayada con las bacterias *S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga, *Shigella sonnei*, *E. coli* k5, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus* y *Kocuria lutea* a una concentración de  $10^7$  CFU/mL.

### **4.4. Resultados**

#### 4.4.1. Modificación y uso de partículas magnéticas en ensayo competitivo indirecto

Se modificaron las partículas magnéticas con tres diferentes estados de *S. typhimurium* (STc+, vivas y estériles) a una concentración de  $10^7$  CFU/mL, siguiendo el protocolo de conjugación descrito previamente. Esta concentración resultó de tomar en cuenta el valor recomendado por la compañía para la conjugación de las partículas magnéticas: 3  $\mu\text{g}$  de ligando (bacteria) por  $10^7$  partículas magnéticas y considerando una masa por bacteria de  $10^{-12}$  g (Dulbecco, D., 1973). Con las MMPs se llevó a cabo el ensayo competitivo indirecto, preincubando *S. typhimurium* (vivas) ( $10^7$  CFU/mL) con el aptámero biotinilado (10 nM) en una solución de PBS 10 mM, pH 7.4.

En la Figura 4.7 se muestran las respuestas obtenidas después de la incubación de la mezcla *S. typhimurium*/aptámero biotinilado con las partículas magnéticas modificadas con la bacteria *S. typhimurium* en diferentes estados (STc+, vivas y estériles).

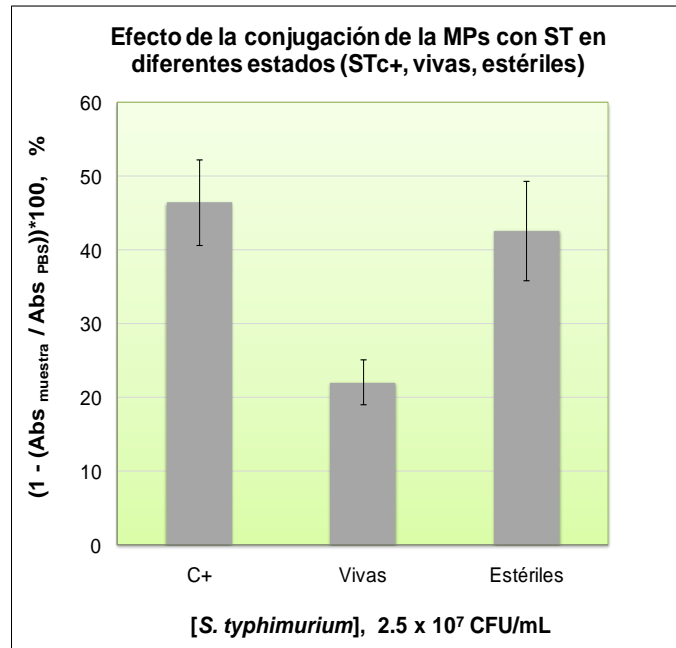


Figura 4.7. Efecto de inmovilizar *S. typhimurium* (ST) en tres estados diferentes (STc+, vivas, estériles) a una concentración de  $10^7$  CFU/mL, usando una concentración de aptámero biotinilado de 10 nM, solución tampón PBS 10 mM (NaCl 2.7 mM y KCl 137 mM) a pH 7.4, con un tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria de 1 h, y un tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs de 30 min. Abs<sub>muestra</sub>: Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub>: Absorbancia del control (PBS).

De la ecuación  $(1 - (Abs_{muestra} / Abs_{PBS})) * 100$ , donde Abs<sub>muestra</sub> y Abs<sub>PBS</sub> corresponden al valor de la señal de absorbancia de la muestra ( $10^7$  CFU/mL) y del control (PBS) respectivamente, se calcularon las respuestas (%) para las diferentes alternativas de conjugación.

Los mejores resultados se lograron con las MPs conjugadas con *S. typhimurium* c+ (46.4 %) y estériles (42.7 %). La conjugación con las bacterias vivas generó una respuesta del 22.0 % en la detección de *S. typhimurium*.

Se determinó, por lo tanto, que la mejor opción para conjugar las partículas magnéticas fue *S. typhimurium* c+. El siguiente paso fue determinar la relación bacterias/partículas magnéticas óptima (Figura 4.8).

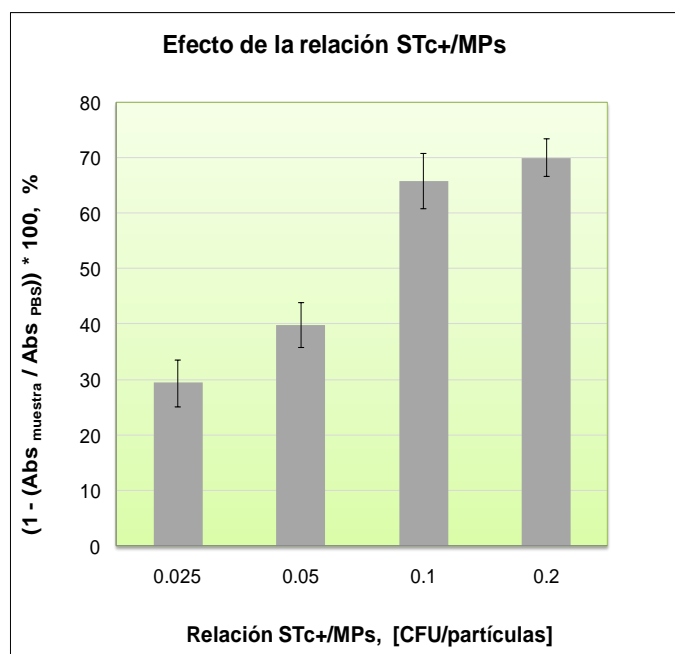


Figura 4.8. Efecto de inmovilizar diferentes concentraciones de STc+ sobre las partículas magnéticas en la detección de *S. typhimurium* vivas ( $10^7$  CFU/mL), con una concentración de aptámero de 10 nM, en una solución de PBS 10 mM, pH 7.4. El tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria fue de 1 h, y el tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs de 30 min. MPs: partículas magnéticas; Abs<sub>muestra</sub>: Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub>: Absorbancia del control (PBS).

Para ello las partículas magnéticas se conjugaron con STc+ a concentraciones de  $10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$  y  $8 \times 10^7$  CFU/mL con el protocolo de conjugación ya descrito. Con estas partículas magnéticas modificadas se realizó el ensayo competitivo indirecto, tras la pre-incubación de *S. typhimurium* ( $10^7$  CFU/mL) con el aptámero



biotinilado (10 nM) en una solución de PBS 10 mM, pH 7.4. Como muestra la Figura 4.8, las mejores respuestas, calculadas como en el caso anterior, se lograron con una relación bacterias/partículas magnéticas (STc+/MPs) de 0.1 y 0.2 [CFU/partículas]. A partir de este resultado los siguientes experimentos se realizaron con la relación STc+/MPs de 0.1.

#### 4.4.2. Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de las partículas magnéticas modificadas

La microscopía SEM fue utilizada para chequear la presencia de STc+ sobre las partículas magnéticas después de la conjugación. Las imágenes de las partículas magnéticas no modificadas (4.9 A) y modificadas (4.9 B) confirman la presencia de *S. typhimurium* después de la conjugación.

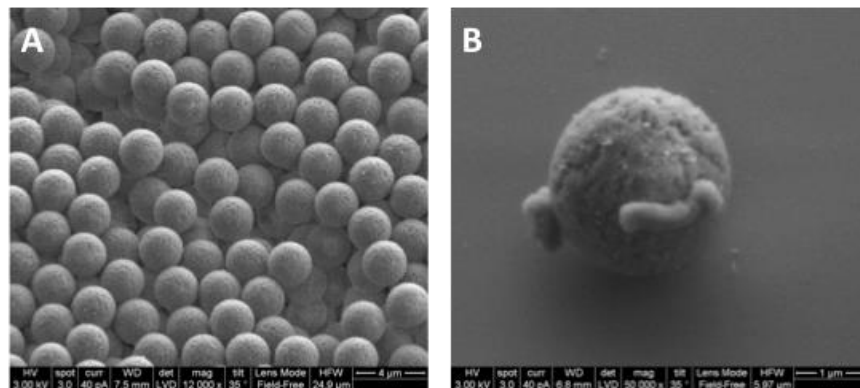


Figura 4.9. Imágenes de SEM de A) partículas magnéticas no modificadas, 12000x y B) partículas magnéticas modificadas, 50000x.

#### 4.4.3. Optimización de las condiciones del ensayo

El estudio sobre el efecto de tres soluciones tampón con diferentes cationes (monovalentes y divalentes) en la señal de detección de *S. typhimurium*  $10^7$

CFU/mL, con una concentración de aptámero 10 nM, y un tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria de 1 h, se muestra en la Figura 4.10.

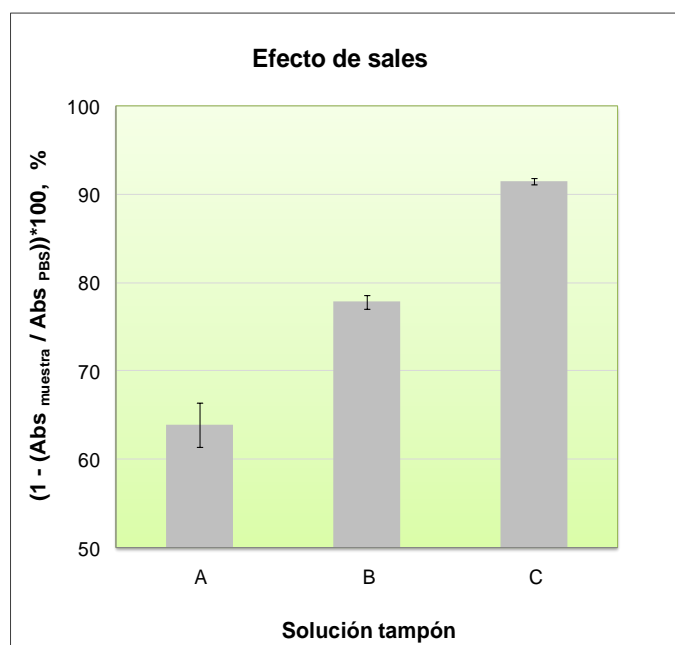


Figura 4.10. Efecto de sales del tampón de unión. Tampón A: 0.1 M PB + KCl; Tampón B: 0.1 M PB + KCl + MgCl<sub>2</sub>; Tampón C: 0.01 M PB + NaCl + KCl. Concentración de *S. typhimurium*: 10<sup>7</sup> CFU/mL; concentración de aptámero: 10 nM; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 h; tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs: 30 min. Abs<sub>muestra</sub>: Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub>: Absorbancia del control (PBS).

Se observa la señal más alta (93%) con el tampón PB 10 mM, pH 7.4, con concentraciones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> de 2.7 y 137 mM respectivamente, mientras que con el tampón al cual solo se le incorporó el K<sup>+</sup>, la señal obtenida fue de 77%. Finalmente la señal más baja (63%) se obtuvo con el tampón con los cationes K<sup>+</sup> y Mg<sup>+2</sup>.

Para estudiar el efecto de la [H<sup>+</sup>] en la unión del aptámero a la bacteria, se probaron tres valores de pH (6.0, 7.4, 8.5) de la solución tampón PBS 10 mM como muestra la Figura 4.11. La mejor señal se logró con un pH de 7.4 (72 %), seguido de la solución con pH 6 (50 %) y la solución con pH 8.5 (38%).

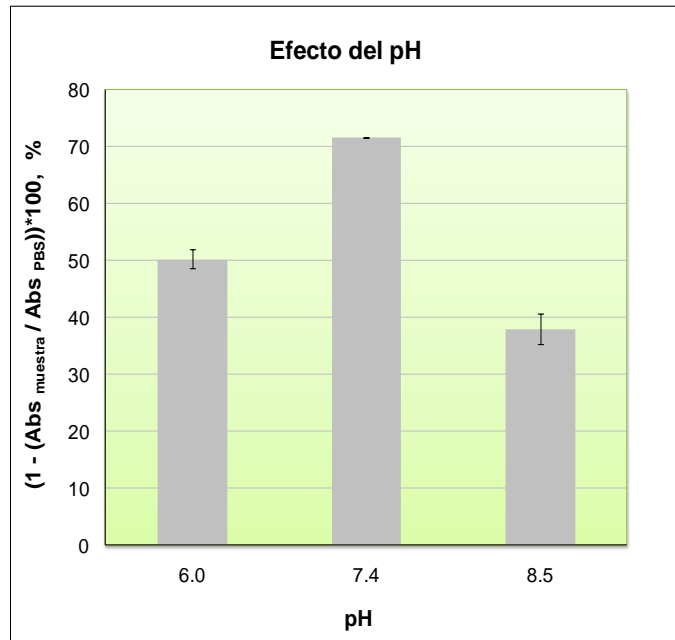


Figura 4.11. Efecto del pH del tampón de unión. Concentración de *S. typhimurium*:  $10^7$  CFU/mL; concentración de aptámero: 10 nM; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 h; tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs: 30 min. Solución tampón PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM). Abs<sub>muestra</sub>: Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub>: Absorbancia del control (PBS).

Para asegurar la presencia del aptámero como hebra simple de ADN con la conformación tridimensional adecuada, evitando la hibridación parcial entre hebras de ADN o las interacciones intramoleculares, se llevó a cabo un pre-tratamiento térmico. Como se observa en la Figura 4.12, el calentamiento de la solución de aptámero a 95 °C por 5 min, previo a la pre-incubación con *S. typhimurium*, resultó en una señal muy por debajo (7 %) a la obtenida con el aptámero no precalentado (35 %).

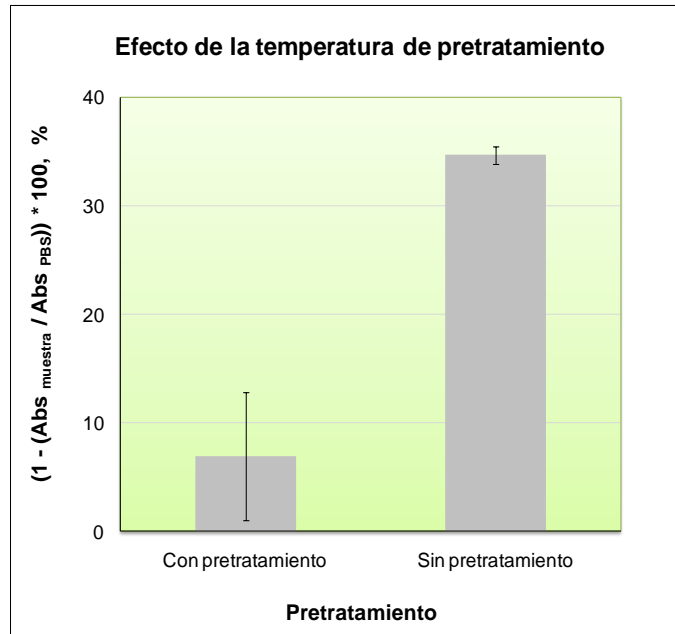


Figura 4.12. Efecto del pre-tratamiento térmico del aptámero. Con pre-tratamiento: calentamiento previo de la solución de aptámero a 95 °C por 5 min. Sin pre-tratamiento: la solución de aptámero no se somete a un calentamiento previo. Concentración de *S. typhimurium*: 10<sup>7</sup> CFU/mL; concentración de aptámero: 10 mM; solución tampón: PBS 10 mM (NaCl: 2.7mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 h; tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs: 30 min. Abs<sub>muestra</sub>: Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub>: Absorbancia del control (PBS).

Los resultados de experimentar diferentes tiempos de pre-incubación (15, 30 y 60 min) entre aptámero y bacteria mostraron que la respuesta aumentó con el aumento del tiempo de pre-incubación, como se observa en la Figura 4.13.

La señal más alta (38 %) se alcanzó con un tiempo de pre-incubación de 60 min. Señales bastante menores de 7% y 4% se obtuvieron con tiempos de pre-incubación de 30 y 15 min respectivamente.

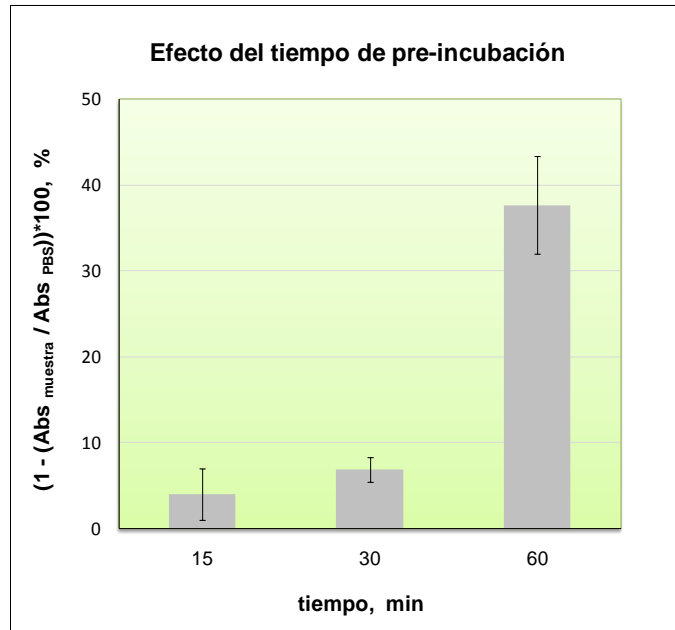


Figura 4.13. Efecto del tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria. Concentración de *S. typhimurium*:  $10^7$  CFU/mL; concentración de aptámero: 10 nM; solución tampón: PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs: 30 min. Abs<sub>muestra</sub>: Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub>: Absorbancia del control (PBS).

Las diferentes concentraciones de aptámero (1, 3, 5 y 10 nM) utilizadas para conocer la óptima a utilizar en el paso de pre-incubación para detección de *S. typhimurium*, mostraron que al aumentar la concentración se producía un aumento de la señal (Figura 4.14).

En este ensayo se alcanzó un valor de respuesta aproximadamente constante entre 3 y 5 nM, y por lo tanto los ensayos siguientes se realizaron con una concentración de aptámero de 4 nM.

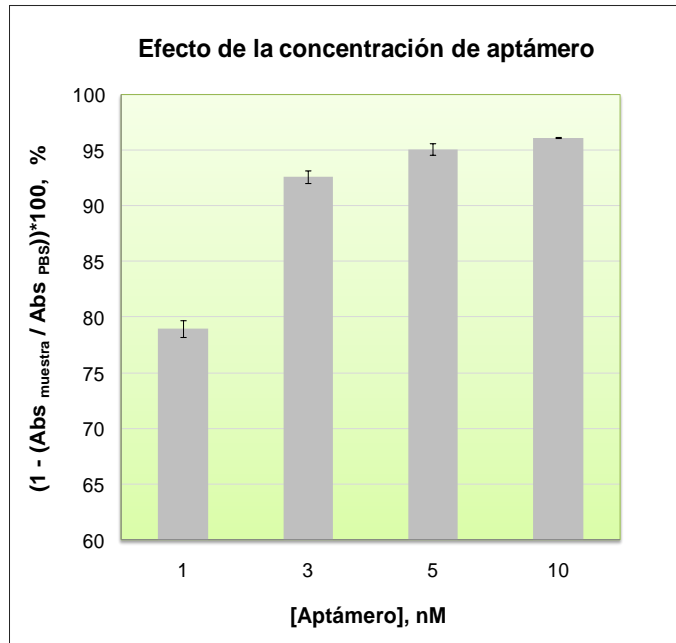


Figura 4.14. Efecto de la concentración de aptámero biotinilado en el paso de pre-incubación con *S. typhimurium*,  $10^7$  CFU/mL. Solución tampón PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 h; tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs: 30 min. Abs<sub>muestra</sub>: Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub>: Absorbancia del control (PBS).

#### 4.4.4. Detección colorimétrica

En la Figura 4.15 se muestra la detección colorimétrica de *S. typhimurium* ( $10^7$  CFU/mL) en tampón PBS (10 mM, 2.7 mM Na<sup>+</sup> y 137 mM K<sup>+</sup>), pH 7.4, con una concentración de aptámero biotinilado de 4 nM y un tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria de 1 h a temperatura ambiente. El valor medio de absorbancia para la muestra con analito fue de 0.186 ( $\pm$  0.004), mientras que para el control (PBS) fue de 1.414 ( $\pm$  0.059). Los tubos A y B muestran la intensidad del color para la muestra con bacterias y la muestra control respectivamente, con sus correspondientes réplicas.

El resultado de la curva de calibración se muestra en la Figura 4.16.

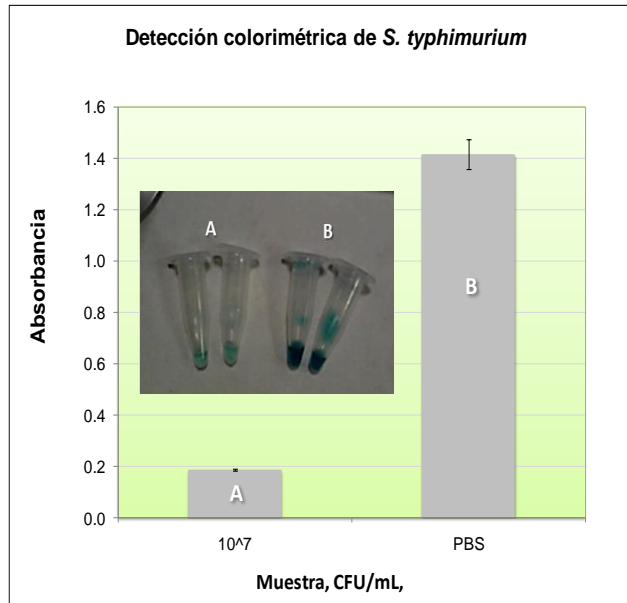


Figura 4.15. Detección colorimétrica de *S. typhimurium* a 10<sup>7</sup> CFU/mL. Concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón: PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 h; tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs: 30 min. (A) Réplicas de la muestra con 10<sup>7</sup> CFU/mL de bacterias y (B) réplicas del control, en ausencia de bacterias.

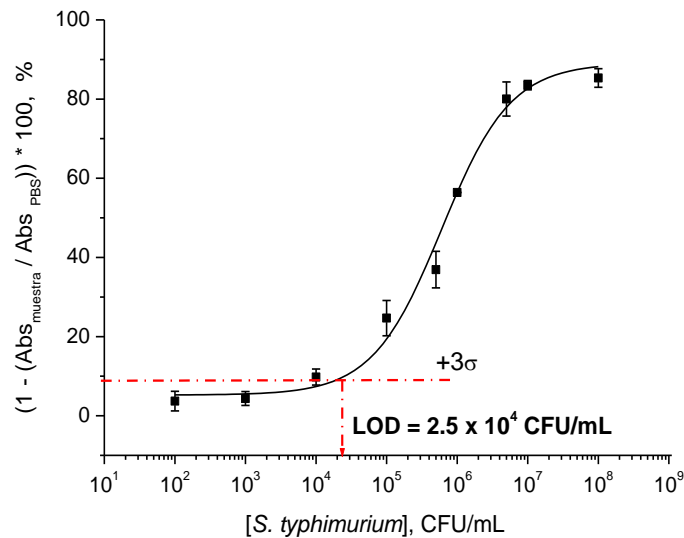


Figura 4.16. Curva de calibración para la detección colorimétrica de *S. typhimurium*. Concentración de aptámero: 4 nM; Solución tampón: PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 h; tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs: 30 min. Respuesta (%) =  $(1 - (Abs_{muestra} / Abs_{PBS})) * 100$ . Abs<sub>muestra</sub>: Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub>: Absorbancia del control (PBS).

Se muestra que la curva se ajusta a una sigmoide logística de cuatro parámetros, de ecuación  $y = (5.2 - 89.1)/(1 + (x/ 6 \cdot 10^5)^{0.89}) + 89.1$ , (ajustada mediante el software Origin 7.0), con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.996$ .

A partir de esta curva sigmoideal obtenida como curva de calibración se obtuvo un LOD de  $2.5 \times 10^4$  CFU/mL, una sensibilidad de 42 [%/(CFU/mL)] y un rango lineal de  $10^5$  a  $3 \times 10^6$  CFU/mL. El LOD se calculó como  $y_b + 3\sigma_b$ , donde  $y_b$  es el valor medio y  $\sigma_b$  es la desviación estándar de los valores de señal ( $n = 2$ ) correspondientes a la muestra en PBS, sin bacteria (Palma, A., 2006). La sensibilidad del ensayo se obtuvo calculando la pendiente de la parte lineal de la curva y el rango lineal se obtuvo intersectando en el eje x los puntos correspondiente a los límites de la linealidad que se fijaron en 79% y 26%, valores que se determinaron al hacer coincidir una línea recta sobre la parte lineal de la curva y determinando los puntos de divergencia de ambas curvas.

La selectividad del ensayo colorimétrico se muestra en la Figura 4.17. Se llevó a efecto ejecutando el protocolo de detección para 7 bacterias distintas: *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga, *Shigella sonnei*, *E. coli* k5, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis* y *Kocuria lutea*, a una concentración de  $10^7$  CFU/mL para cada bacteria.

Los resultados muestran como el aptámero también presenta un cierto grado de afinidad por las bacterias *E. coli* O157 Shiga y *Shigella sonnei*.

Finalmente, la detección colorimétrica de *S. typhimurium* a una concentración de  $10^7$  CFU/mL en una matriz real, como el agua de montaña, se puede observar en la Figura 4.18. Las respuestas (%) tanto para la detección en la matriz real como en PBS fueron 87 % ( $\pm 0.85$ ) y 92 % ( $\pm 1.45$ ), respectivamente.



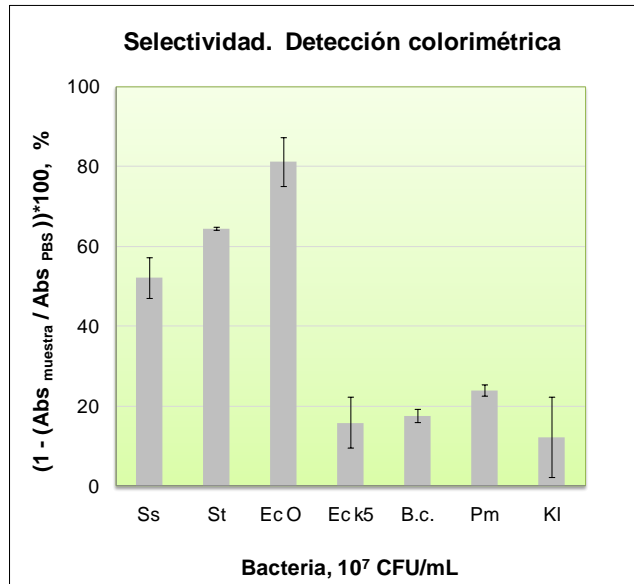


Figura 4.17. Selectividad. Concentración de bacterias: 10<sup>7</sup> CFU/mL; concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón: PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 M), pH 7.4; tiempo. de análisis: 1 h; tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs: 30 min. Ss: *Shigella sonnei*; St: *Salmonella typhimurium*; Ec O: *E. coli* O157 Shiga; Ec k5: *E. coli* k5; Bc: *Bacillus cereus*; Pm: *Proteus mirabilis*; Kl: *Kocuria lutea*. Abs<sub>muestra</sub>: Absorbancia de la muestra; Abs<sub>PBS</sub>: Absorbancia del control (PBS).

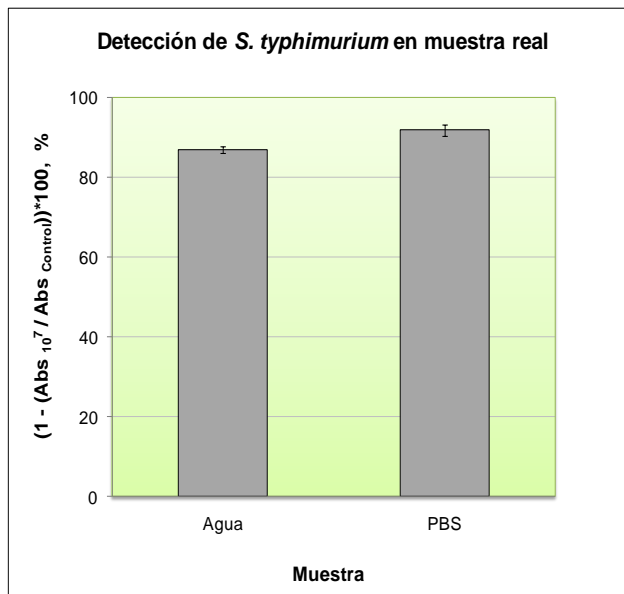


Figura 4.18. Detección colorimétrica de *S. typhimurium* en una matriz real. Concentración de *S. typhimurium*: 10<sup>7</sup> CFU/mL; concentración de aptámero: 4 nM; Abs<sub>10<sup>7</sup></sub>: Absorbancia de la muestra con 10<sup>7</sup> CFU/mL; Abs<sub>control</sub>: Absorbancia del control (agua o PBS) en ausencia del analito.

#### 4.4.5. Detección electroquímica

Para la detección electroquímica de una muestra con *S. typhimurium* ( $10^7$  CFU/mL) el ensayo se realizó con una concentración de aptámero biotinilado de 4 nM y un tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria de 1 h. Las medidas de DPV (Figura 4.19), llevadas a cabo en una solución tampón DEA 0.1 M, pH 9.5, se efectuaron a una velocidad de barrido de 0.2 V/s entre los potenciales -0.4 a 0.4 V (potencial del pulso: 0.04 V; tiempo del pulso: 0.2 s) y la corriente de oxidación se midió a 0.25 V. El valor medio de la intensidad de corriente para la muestra con bacteria fue de  $6.7 (\pm 2.4) \mu\text{A}$  y para el control fue de  $32.7 (\pm 3.0) \mu\text{A}$ . Las curvas azules y rojas muestran la respuesta en ausencia y en presencia de *S. typhimurium* respectivamente

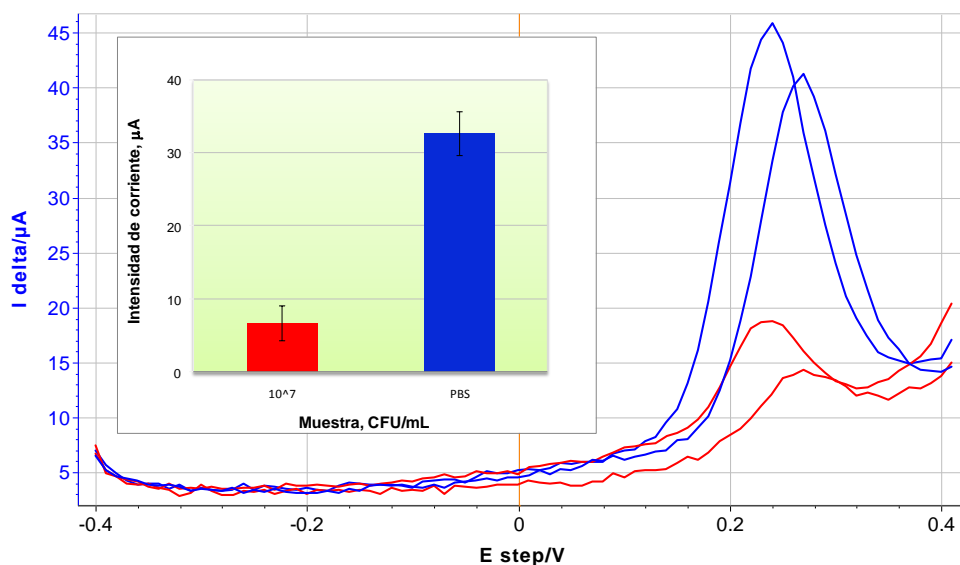


Figura 4.19. Detección electroquímica de *S. typhimurium* a  $10^7$  CFU/mL. Concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón (unión aptámero-bacteria): PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 h; tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs: 30 min. Solución tampón (medidas DPV): DEA 0.1 M, pH 9.5; velocidad de barrido: 0.2 V/s; intervalo de potencial: -0.4 a 0.4 V (potencial del pulso: 0.04 V; tiempo del pulso: 0.2 s); medición corriente de oxidación: 0.25 V.

El resultado de la curva de calibración (Figura 4.20) para la detección electroquímica de *S. typhimurium* muestra que la curva que se ajusta a este comportamiento corresponde a una sigmoide logística de cuatro parámetros, de ecuación  $y = (6.3 - 75.8)/(1 + (x/15528)^{0.2}) + 75.8$ . (ajustada mediante el software Origin 7.0), con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.998$ .

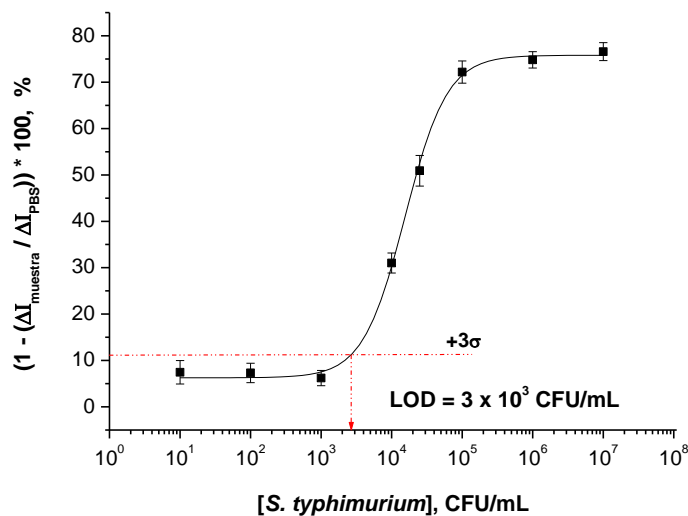


Figura 4.20. Curva de calibración para la detección electroquímica de *S. typhimurium*. Concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón (unión aptámero-bacteria): PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 h; tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs: 30 min. Solución tampón (medidas DPV): DEA 0.1 M, pH 9.5; velocidad de barrido: 0.2 V/s; intervalo de potencial: -0.4 a 0.4 V (potencial del pulso: 0.04 V; tiempo del pulso: 0.2 s); medición corriente de oxidación: 0.25 V. ΔI<sub>muestra</sub>: Intensidad de corriente de una muestra; ΔI<sub>PBS</sub>: Intensidad de corriente para el control (PBS).

De esta curva sigmoide se obtuvo un LOD de  $3 \times 10^3$  CFU/mL, una sensibilidad de 58 [%/(CFU/mL)] y un rango lineal de  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  CFU/mL.

Dada la reactividad cruzada de *S. typhimurium* con *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei* se construyeron curvas de calibración para *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei* de manera de compararlas con la correspondiente a *S. typhimurium*. Así se tiene una

visión global de los parámetros de comportamiento de este biosensor respecto a las tres bacterias.

Los resultados de la detección electroquímica aplicados a los enteropatógenos *E. coli* O157 Shiga y *Shigella sonnei* se muestran en las Figura 4.21 y Figura 4.22 respectivamente. En el caso de *E. coli* O157 Shiga la curva ajustada, con un coeficiente  $R^2$  de 0.987, fue una sigmoide logística de cuatro parámetros de ecuación  $y = (7.2 - 67.2)/(1 + (x/1.19 \cdot 10^6)^{1.17}) + 67.2$ . En el caso de *Shigella sonnei* el ajuste se realizó con la misma curva entregando un  $R^2$  de 0.998, con la siguiente ecuación  $y = (73.6 - 48.5)/(1 + (x/6.66 \cdot 10^5)^{1.057}) + 48.5$ .

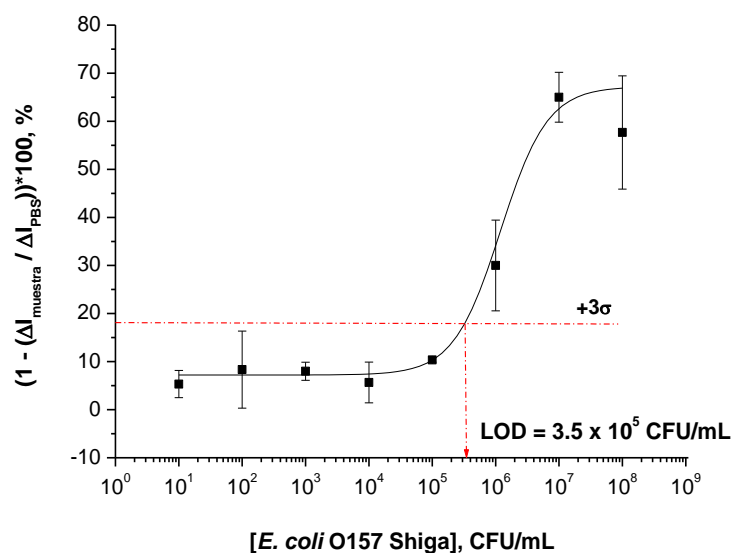


Figura 4.21. Curva de calibración para la detección electroquímica de *E. coli* O157 Shiga. Concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón (unión aptámero-bacteria): PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 h; tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs: 30 min. Solución tampón (medidas DPV): DEA 0.1 M, pH 9.5; velocidad de barrido: 0.2 V/s; intervalo de potencial: -0.4 a 0.4 V (potencial del pulso: 0.04 V; tiempo del pulso: 0.2 s); medición corriente de oxidación: 0.25 V.  $\Delta I_{\text{muestra}}$ : Intensidad de corriente de una muestra;  $\Delta I_{\text{PBS}}$ : Intensidad de corriente para la muestra control (PBS).

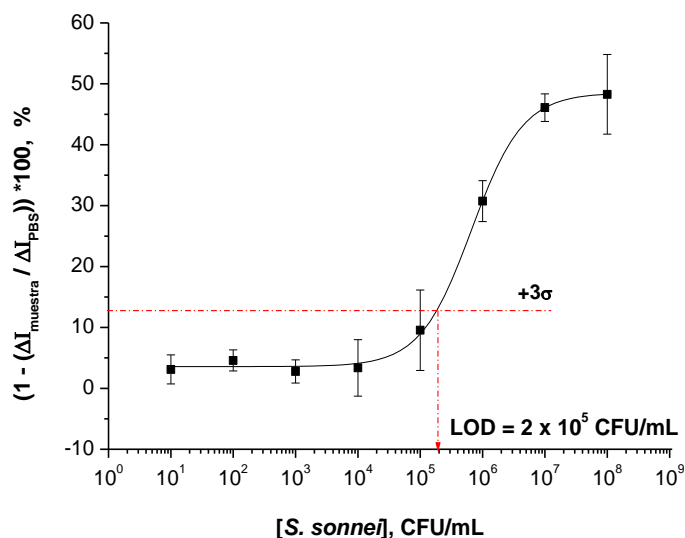


Figura 4.22. Curva de calibración para la detección electroquímica de *Shigella sonnei*. Concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón (unión aptámero-bacteria): PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 h; tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs: 30 min. Solución tampón (medidas DPV): DEA 0.1 M, pH 9.5; velocidad de barrido: 0.2 V/s; intervalo de potencial: -0.4 a 0.4 V (potencial del pulso: 0.04 V; tiempo del pulso: 0.2 s); medición corriente de oxidación: 0.25 V.  $\Delta I_{\text{muestra}}$ : Intensidad de corriente de una muestra;  $\Delta I_{\text{PBS}}$ : Intensidad de corriente para el control (PBS).

De estas curvas sigmoidales se determinaron los parámetros LOD, sensibilidad y rango lineal. Para *E. coli* O157 Shiga el LOD fue de  $3.5 \times 10^5$  CFU/mL, la sensibilidad de 38.9 [%/(CFU/mL)] y el rango lineal de  $3.8 \times 10^5 - 4.2 \times 10^6$  CFU/mL. En el caso de *Shigella sonnei* el LOD fue de  $2 \times 10^5$  CFU/mL, la sensibilidad de 26.1 [%/(CFU/mL)] y el rango lineal entre  $2 \times 10^5$  y  $2.5 \times 10^6$  CFU/mL.

Al igual que en el caso de la detección colorimétrica, la selectividad del ensayo electroquímico se realizó para las 7 bacterias ya analizadas, a una concentración de  $10^7$  CFU/mL (Figura 4.23).

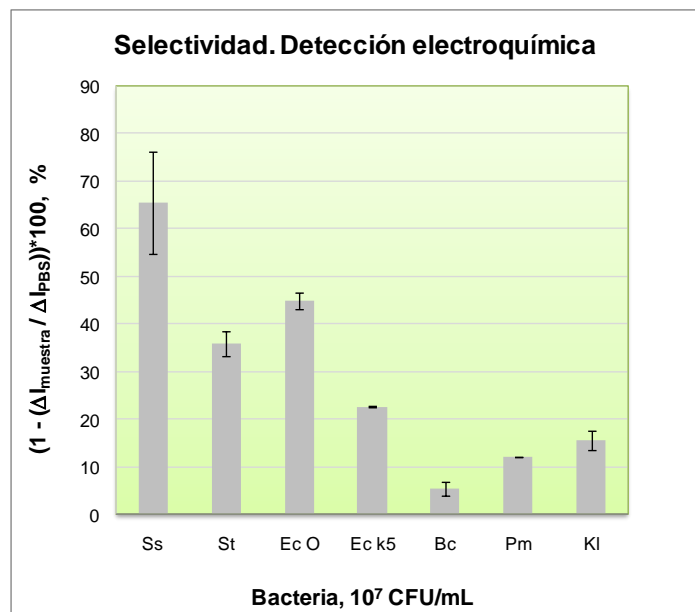


Figura 4.23. Selectividad del ensayo electroquímico. Concentración de aptámero: 4 nM; solución tampón (unión aptámero-bacteria): PBS 10 mM (NaCl: 2.7 mM y KCl: 137 mM), pH 7.4; tiempo de pre-incubación aptámero-bacteria: 1 h; tiempo de incubación entre el complejo aptámero-*S. typhimurium* y MMPs: 30 min. Solución tampón (medidas DPV): DEA 0.1 M, pH 9.5; velocidad de barrido: 0.2 V/s; intervalo de potencial: -0.4 a 0.4 V (potencial del pulso: 0.04 V; tiempo del pulso: 0.2 s); medición corriente de oxidación: 0.25 V. Ss: *Shigella sonnei*; St: *Salmonella typhimurium*; Ec O: *E. coli* O157 Shiga; Ec k5: *E. coli* k5; Bc: *Bacillus cereus*; Pm: *Proteus mirabilis*; Kl: *Kocuria lutea*.  $\Delta I_{\text{muestra}}$ : Intensidad de corriente de una muestra;  $\Delta I_{\text{PBS}}$ : Intensidad de corriente para el control (PBS).

## 4.5. Discusión y conclusiones

### 4.5.1. Modificación de partículas magnéticas con *S. typhimurium* control positivo (STc+) y su utilización en un ensayo competitivo indirecto

El objetivo de estos ensayos fue optimizar la plataforma móvil que sirvió como sistema de detección colorimétrica y electroquímica. La optimización de las condiciones experimentales se realizó utilizando el sistema con detección

colorimétrica. Los resultados mostraron que las partículas magnéticas modificadas con STc+ y con ST estériles permitieron obtener mejores señales de absorbancia con respecto a las que se modificaron con bacterias vivas. Probablemente las primeras partículas magnéticas tenían una mayor superficie cubierta con bacterias, y las que se modificaron con las vivas quedaron pobremente cubiertas. La causa de la menor capacidad de inmovilización de las bacterias vivas sobre las partículas magnéticas podría estar en que las bacterias vivas están metabólicamente activas y es posible que durante el tiempo de reacción (2 h) las células produjeran algún metabolito o generaran las condiciones para que los enlaces amida se inhibieran o se rompieran. Está reportada la existencia de una enzima extracelular en *S. typhimurium* cuya función es hidrolizar enlaces amida (Adeola, S.A., 2012).

En la modificación de las partículas magnéticas con STc+ a diferentes relaciones bacterias/partículas magnéticas, se observó que a medida que aumenta esta proporción, la señal aumenta. La relación bacterias/partículas óptima, de acuerdo al protocolo recomendado por la compañía, es de 0.025. Se incrementó esta relación para analizar la señal obtenida en el sistema de detección hasta llegar a una relación de 0.2. El valor de la señal a una relación bacterias/partículas de 0.2 fue levemente superior a la señal con una relación de 0.1 (70 % vs 66 %), con lo cual se concluye que la relación de 0.1 es óptima para preparar la plataforma móvil de detección.

#### 4.5.2. Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de las partículas magnéticas modificadas

Las imágenes de SEM muestran las bacterias STc+ inmovilizadas sobre las partículas magnéticas después del protocolo de unión vía enlace amida. De estos resultados se concluye que el procedimiento para la modificación de las partículas magnéticas con STc+ resultó efectivo.

#### 4.5.3. Optimización de las condiciones del ensayo

La estructura terciaria de un aptámero es fundamental para su unión a un analito diana. Esta estructura depende fuertemente de la fuerza iónica de la solución en la cual está inmerso el aptámero (Hianik, T., 2007). La presencia de cationes ayuda en la estabilización de los aptámeros, apantallando sus cargas negativas y evitando así el desplegamiento de la molécula (Shamsi, M.H., 2012; Bertran, J., 2006).

Los aptámeros que contienen uno o varios segmentos ricos en guanina son conocidos por formar estructuras helicoidales de cuatro hebras llamadas G-cuadruplex. Para predecir si nuestro aptámero contiene G-cuadruplex hemos utilizado el programa QGRS Mapper (Kikin, O., 2006), el cual nos entregó como resultado la formación de un G-cuadruplex. Específicamente, el programa entrega como resultado que en la posición 31 (desde el extremo 5') se encuentra un fragmento con largo de 20 nucleótidos (**GGCGGCGTCACCCGACGGGG**) en el cual se encuentra la secuencia rica en G y que forma la estructura G-cuadruplex. La formación y la estabilidad de estas estructuras dependen fuertemente de la presencia de cationes monovalentes, con una selectividad extraordinaria por el  $K^+$  (Radi, A.E., 2006). En un estudio del aptámero para trombina se determinó la capacidad de los cationes de formar G-cuadruplex y de regular el plegamiento y desplegamiento de estas estructuras (Shim, J.W., 2009). El resultado obtenido de este estudio fue que el  $K^+$ , el  $Ba^{+2}$  y el  $NH_4^+$  son los cationes favoritos sobre los cationes  $Cs^+$ ,  $Na^+$  y  $Li^+$  para formar G-cuadruplex, mientras que el  $Mg^{+2}$  y el  $Ca^{+2}$  no indujeron la formación de estas estructuras.

Probablemente dentro de la configuración tridimensional que adopta nuestro aptámero para unirse a su diana está la conformación de la estructura G-cuadruplex. Las soluciones tampón estudiadas en la optimización del sistema de detección (Figura 4.10) contienen diferentes cationes (solución A: 5 mM  $K^+$ ; solución B: 5 mM  $K^+$  + 20 mM  $Mg^{+2}$ ; solución C: 137 mM  $K^+$  + 2.7 mM  $Na^+$ ). Las



tres soluciones contienen el catión  $K^+$ , con una mayor concentración en la solución C. Además el  $Na^+$ , que también influye favorablemente en la formación de G-cuadruplex, aunque en menor grado que el  $K^+$ , también forma parte de la composición de la solución C, lo que probablemente generó un efecto sinérgico en la formación de la estructura G-cuadruplex que resultó en esta solución como la óptima entre las tres estudiadas. Por otro lado de acuerdo a Hardin (Hardin, C.C., 1992), los cationes estabilizan la estructura G-cuadruplex en el siguiente orden:  $K^+ > Ca^{+2} > Na^+ > Mg^{+2} > Li^+$ . Esto nos indica que el  $Mg^{+2}$  tiene un grado (menor) de influencia en la formación de la estructura, con lo cual nos lleva a suponer que también hubo un cierto nivel de sinergia entre el  $K^+$  y el  $Mg^{+2}$  en la solución B, que en definitiva permitió tener un resultado mejor que utilizando la solución A (solamente con  $K^+$ ). Concluimos, por lo tanto, que nuestros resultados respecto a la composición de los cationes en el tampón de unión están en concordancia con los resultados obtenidos por estudios anteriores en relación a la influencia de los cationes sobre la formación de G-cuadruplex.

La estructura terciaria del aptámero lleva asociada fuerzas de unión tales como enlaces de hidrógeno (Doessing, H., 2011). Por lo tanto, el control del pH es necesario para asegurar la conformación óptima del aptámero (Cooper, G.M., 1997). Teniendo en cuenta este factor, el ensayo de detección se llevó a cabo variando el pH del tampón de unión. La señal más alta se alcanzó a pH 7.4. Este resultado está en concordancia con las condiciones utilizadas en la selección del aptámero.

Para asegurar la presencia del aptámero como ADN de hebra simple, evitando la hibridación parcial entre aptámeros o la interacción intramolecular en una hebra, se aplicó un tratamiento térmico a 95 °C por 5 min (Wang, X., 2014) previo a la pre-incubación con el analito diana. Los resultados no mostraron mejoramiento comparado con el aptámero sin tratamiento térmico, con lo cual el aptámero se utilizó sin precalentamiento en el proceso de pre-incubación con la bacteria.

Se llevaron a cabo estudios de tiempos de pre-incubación entre el aptámero y la muestra con bacterias. Un incremento significativo de la señal medida se observó después de 1 h de pre-incubación. Este tiempo de pre-incubación comúnmente se encuentra reportado en el desarrollo de biosensores (Jeong, S., 2012; Wang, Y, 2012; Luo, C., 2012). Tiempos de pre-incubación mayores no fueron ensayados de modo de no incrementar el tiempo total de análisis.

Se estudió el incremento en la concentración de aptámero, observando un efecto positivo sobre la señal medida (de 79 a 96 %). Sin embargo, después de un incremento inicial pronunciado, la señal tiende a estabilizarse a concentraciones mayores a 3 nM. Se eligió como concentración óptima el valor de 4 nM.

#### 4.5.4. Detección colorimétrica

La Figura 4.15 muestra el ensayo colorimétrico desarrollado para la detección de *S. typhimurium*. La diferencia de absorbancia medida a 620 nm se debió a la diferencia en la concentración del producto TMB oxidado, de coloración azul, generado por la acción de la HRP. Este es el resultado esperado para un ensayo competitivo indirecto: parte de los aptámeros que se incubaron con la muestra de bacterias ( $10^7$  CFU/mL), quedaron enlazados a estos microorganismos, mientras que los aptámeros remanentes se unieron a las partículas magnéticas modificadas con STc+, siendo detectados finalmente gracias a la HRP utilizada como marcaje de la estreptavidina enlazada al aptámero biotinilado.

Los parámetros obtenidos de la curva de calibración nos dan una idea de la calidad del funcionamiento del ensayo de detección. El LOD alcanzado ( $2.5 \times 10^4$  CFU/mL) es más elevado que los obtenidos en muchos otros trabajos utilizando diferentes estrategias y técnicas para detectar *S. typhimurium* (Jyoti, A., 2011; Afonso, A., 2012; Li, Q., 2012; Singh, G., 2012; Labib, M., 2012; Duan, Y.F., 2014; Yuan, J., 2014; Freitas M., 2014). De igual forma el rango de linealidad resultó ser

estrecho comparado con los rangos reportados por los mismos autores mencionados previamente. Estos dos parámetros hacen que este ensayo de detección desarrollado no sea competitivo con los diseños reportados. Respecto a la sensibilidad (42 [%/CFU/mL]) del ensayo servirá a modo de comparación con los valores de sensibilidad de otras estrategias de detección que se presentan en las próximas secciones y capítulos.

Otro parámetro importante que se analizó fue la selectividad del ensayo. El resultado (Figura 4.17) muestra que el ensayo colorimétrico fue capaz de diferenciar un grupo de tres bacterias enteropatógenas, como son *S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei* del resto de las bacterias (*E. coli* k5, *B. cereus*, *P. mirabilis* y *K. lutea*). Un análisis estadístico de las medias de estos resultados utilizando el test t-Student (APÉNDICE IV.1), confirmó que hubo diferencias significativas de cada una de las respuestas medias pertenecientes a las bacterias enteropatógenas (*S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei*) respecto de las respuestas medias pertenecientes al resto de las bacterias. A pesar que el aptámero utilizado en este trabajo fue seleccionado para *S. typhimurium* (Joshi, R., 2009), nuestros resultados demostraron que existe reactividad cruzada entre las bacterias enteropatógenas ensayadas, es decir que este aptámero no sólo tiene afinidad por las proteínas dianas de *S. typhimurium*, sino también por las proteínas análogas u otras de las cepas de *E. coli* O157 Shiga y *S. soneii*. Probablemente la causa de esta detección “triple” se debió a que las proteínas diana de este aptámero en las tres bacterias en cuestión tengan una similitud en cuanto a secuencia y conformación.

Una manera de acercarnos a corroborar la hipótesis anterior es comprobar en primer lugar la existencia de las proteínas diana (transportador ABC, OmpA y OmpD) de *S. typhimurium* en las otras bacterias. En segundo lugar realizar el alineamiento de secuencias aminoacídicas correspondientes a las proteínas equivalentes de las bacterias involucradas en el ensayo de selectividad. Para comprobar la existencia de las proteínas equivalentes a las de *S. typhimurium* se

recurrió a la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>) y para efectuar el alineamiento de las proteínas encontradas se utilizó el programa informático BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Antes de mostrar los resultados respecto a la búsqueda de las proteínas equivalentes, es necesario comentar que las proteínas diana (transportador ABC, OmpA y OmpD) son en general familias o superfamilias de proteínas. En el trabajo de Joshi (Joshi, R., 2009) en el cual se seleccionaron los aptámeros para la bacteria *S. typhimurium*, no se hace referencia a la actividad específica de las proteínas. Esto es particularmente importante en el caso de la superfamilia transportador ABC, que contiene muchísimas proteínas con actividades diferentes para distintos sustratos. Por lo tanto a la hora de realizar la búsqueda de las proteínas equivalentes fue necesario elegir, especialmente para el transportador ABC, una actividad de la enzima y un sustrato. Nuestra elección fue la proteína “transportador ABC para el transporte del aminoácido glutamato”, porque fue la primera proteína encontrada que se repetía en todas las bacterias. Por otro lado, en esta base de datos (UniProt) no está presente la cepa k5 de *E. coli*, como tampoco se encontró la presencia de las proteínas OmpA y OmpD de las bacterias *B. cereus* y *M. luteus*.

La siguiente Tabla (Tabla 4.1) muestra cada una de las proteínas encontradas, registradas con el nombre del gen que da origen a estas proteínas. Se muestra, como resultado del alineamiento de las proteínas, el porcentaje de identidad entre las proteínas correspondientes a *S. typhimurium* y su equivalente en las otras bacterias. Así vemos que el porcentaje de identidad para la proteína OmpA de *S. typhimurium* y las correspondientes a *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei*, es de 93 % en ambos casos. Esto quiere decir que son proteínas bastante similares. Al hacer el análisis con la proteína correspondiente a *P. mirabilis* se observa que el porcentaje de identidad es menor (68%). Para el caso de la proteína OmpD vemos que los porcentajes de identidad fueron menores, sin embargo la similitud de las proteínas OmpD de *S. typhimurium* con *E. coli* O157:H7 (72%) y con *S. sonnei* (80%) fue muy superior a la correspondiente para la proteína de *P. mirabilis* (35%). Respecto al transportador ABC los mayores porcentajes de identidad se encuentran

nuevamente con las proteínas contenidas en *E. coli* O157:H7 (94%) y con *S. sonnei* (95%). El extremo opuesto en cuanto a identidad lo tenemos con las proteínas contenidas en *B. cereus* (28%) y *M. luteus* (30%). En el caso de *P. mirabilis*, la proteína tiene una identidad bastante elevada (80%), pero que no llega a los niveles de *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei*.

Esta información nos ayuda en parte a entender nuestros resultados respecto a la reactividad cruzada entre las bacterias *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei*. Aunque es una información valiosa que apoya nuestros resultados, los factores que influyen en la unión del aptámero a las proteínas diana, desde el punto de vista del sitio de unión, van más allá de una secuencia de aminoácidos determinada. La estructura tridimensional que alcanza la proteína en la membrana celular, las moléculas y la variedad de estructuras que están presentes en la membrana, son factores que probablemente afectan al sitio de unión con el cual interacciona el aptámero. Sin embargo estos factores son difíciles de controlar.

Tabla 4.1. Alineamiento de secuencias de proteínas.

Proteína	Bacteria	Nombre del gen	Alineamiento de secuencias de proteínas Salmonella - Bacteria (% identidad)
OmpA	Salmonella typhimurium	ERS157243_02034	
	Escherichia coli O157:H7	ECs1041	93
	Shigella sonnei	ERS428554_02179	93
	Proteus mirabilis	HMPREF0693_2152	68
	Bacillus cereus	No	
	Micrococcus luteus	No	
	E. coli k5	No	
OmpD	S. typhimurium	STM1572	
	Escherichia coli O157	EC34880_1950	72
	Shigella sonnei	SSMOSELEY_3111	80
	Proteus mirabilis	HMPREF0693_0588	35
	Bacillus cereus	No	
	Micrococcus luteus	No	
	E. coli k5	No	
transportador ABC (glutamato)	S. typhimurium	DD95_08925	
	Escherichia coli O157:H7	ECs0693	94
	Shigella sonnei	SSON_0608	95
	Proteus mirabilis	PMI0436	80
	Bacillus cereus	BG03_1054	28
	Micrococcus luteus	Mlut_18710	30
	E. coli k5	No	

Se realizó la detección de *S. typhimurium* en una matriz real (agua de montaña). Se eligió esta matriz de manera de ver la respuesta del ensayo de detección en un medio real distinto al medio generado artificialmente en el laboratorio. El agua de montaña es una matriz real relativamente simple en comparación con otras, como aguas de desechos industriales o bien muestras biológicas como sangre. La detección de contaminantes químicos, físicos y biológicos en muestras de agua es de gran importancia, debido a que es un recurso vital para el ser humano y los animales en general, desde el punto de vista de consumo directo como agua de bebida, e indirecto como el riego de hortalizas. La respuesta obtenida en la matriz real ( $87 \pm 0.85 \%$ ) frente a la obtenida en la matriz de PBS ( $92 \pm 1.45 \%$ ) muestran, de acuerdo al test estadístico t-Student, diferencias significativas entre las medias de las respuestas. Si se analiza la composición de aguas de montaña tanto de zonas cercanas a la zona de nuestra muestra (Santolaria, Z., 2015) como de zonas más alejadas dentro de España (Toro, M., 2006), se puede observar que contienen los mismos iones ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ;  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) en concentraciones diferentes dependiendo de la zona, y pHs con una media de 7.8 (Santolaria, Z., 2015) y 6.6 (Toro, M., 2006). La presencia de iones, diferentes del  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$ , provocarían que el plegamiento del aptámero no fuera el óptimo para unirse a la bacteria diana, causando las diferencias observadas en la respuesta en PBS y en agua de montaña. Normalmente para trabajar con muestras reales se preparan diluciones de la muestra con la solución tampón optimizada.

#### 4.5.5. Detección electroquímica

En este caso, la diferencia en las intensidades de corriente obtenidas para el ensayo competitivo indirecto se debe a la diferencia en la concentración de la molécula electroactiva  $\alpha$ -naftol en la solución. Esta molécula depende de la actividad enzimática de la enzima AP enlazada a las partículas magnéticas a través de la interacción de la neutravidina-AP con el aptámero biotinilado. El aptámero remanente de la pre-incubación con la muestra con bacterias es el que finalmente determina la cantidad de enzima AP enlazada.

Del resultado de la curva de calibración para la detección electroquímica de *S. typhimurium*, se obtuvo un LOD de  $3 \times 10^3$  CFU/mL, menor al logrado por la detección colorimétrica ( $2.5 \times 10^4$  CFU/mL). La sensibilidad del sistema de detección obtenida fue 58 [%/(CFU/mL)], lo que implica que aumentó en aproximadamente un 40% respecto al ensayo colorimétrico. Otro parámetro de importancia a la hora de evaluar un sistema de detección o biosensor es el tiempo total de detección. En este caso hubo una reducción de 1 h; es decir, se pasó de un tiempo total de detección de 3.5 h (en el ensayo colorimétrico) a un tiempo de 2.5 h en la detección electroquímica. Esto se debió exclusivamente a que en la detección colorimétrica el tiempo de incubación del sustrato TMB fue de 1 h, tiempo que se ahorra en el caso de la detección electroquímica puesto que la medida se registra después de aproximadamente 4 min luego de agregar el sustrato  $\alpha$ -naftilfosfato. El rango lineal en la detección electroquímica se redujo levemente respecto al del ensayo colorimétrico: varió desde  $10^5 - 3 \times 10^6$  CFU/mL en el ensayo colorimétrico a  $5 \times 10^3 - 5 \times 10^4$  CFU/mL en el ensayo electroquímico.

La reactividad cruzada generada entre el aptámero y las tres bacterias enteropatógenas (*S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei*) se constata en la prueba de selectividad (Figura 4.23) llevada a cabo para la detección electroquímica. Se efectuó un análisis estadístico similar al ensayo colorimétrico para corroborar la separación de los dos grupos de bacterias (APÉNDICE IV.2). Para obtener mayor información del comportamiento del ensayo electroquímico respecto a la detección de las tres bacterias enteropatógenas, se construyeron curvas de calibración para *E. coli* y *S. sonnei*. La Tabla 4.2 muestra los parámetros de comportamiento del ensayo electroquímico en la detección de las bacterias enteropatógenas: *S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei*.

Tabla 4.2. Comparación de los parámetros del biosensor electroquímico en la detección de los enteropatógenos *S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *Shigella sonnei*.

Bacteria	LOD, CFU/mL	Sensibilidad, %/CFU/mL	Rango lineal, CFU/mL
<i>S. typhimurium</i>	$3.0 \times 10^3$	58	$5.0 \times 10^3 - 5.0 \times 10^4$
<i>E. coli</i> O157 Shiga	$3.5 \times 10^5$	39	$3.8 \times 10^5 - 4.2 \times 10^6$
<i>Shigella sonnei</i>	$2.0 \times 10^5$	26	$2.0 \times 10^5 - 2.5 \times 10^6$

Al comparar las tres curvas de calibrado (Figuras 4.20, 4.21 y 4.22), se observa que el sistema de detección comienza a responder a concentraciones diferentes según la bacteria que se esté detectando. El sistema de detección comienza a responder con más prontitud en presencia de *S. typhimurium*, que en presencia de *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei*. La consecuencia de esto es que los LODs del sistema varían dependiendo de la bacteria a detectar. Vemos que el mejor LOD se logra con *S. typhimurium* ( $2 \times 10^3$  CFU/mL). Aunque este parámetro mejoró utilizando la detección electroquímica respecto a la colorimétrica, sigue siendo un valor elevado como se puede comprobar en las estrategias de detección para la misma bacteria (*S. typhimurium*) en el capítulo 2. Los rangos lineales de detección resultaron estrechos para las tres curvas de calibración, siendo el rango perteneciente a *S. typhimurium* el de menos amplitud.

El ensayo de selectividad entregó como resultado que el sistema de detección pudo diferenciar el grupo de las bacterias enteropatógenas (*S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei*) de las que no lo son (*E. coli* k5, *B. cereus*, *P. mirabilis* y *K. lutea*). También un análisis estadístico por medio del test t-Student corroboró que hubo diferencias significativas de las respuestas medias de las bacterias enteropatógenas en relación a las no enteropatógenas, confirmando nuevamente



que la afinidad del aptámero no es exclusiva hacia *S. typhimurium*, sino que también hay un grado de afinidad importante del aptámero por *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei*.

Se concluye por tanto que el biosensor electroquímico superó, como sistema de detección, al ensayo colorimétrico en la detección de *S. typhimurium*. Con el biosensor electroquímico se redujo el LOD de  $4.2 \times 10^4$  a  $2 \times 10^3$  CFU/mL, y la sensibilidad aumentó a casi el doble, de 37 a 65 [%/(CFU/mL)]. Por otro lado con ambas alternativas de detección se pudo discriminar las bacterias enteropatógenas de las no enteropatógenas. Esto significa que la selectividad, uno de los parámetros más importantes, si no el más importante en el comportamiento de un biosensor, funcionó de manera excelente para el uso de ambos sistemas en la detección selectiva de bacterias enteropatógenas.

#### 4.6. Referencias

Adeola, S.A.; Folorunso, O.S. and Amisu, K.O. **Antimicrobial Activity of Ocimum basilicum and its Inhibition on the Characterized and Partially Purified Extracellular Protease of Salmonella typhimurium.** RJB. 2012; 2: 138.

Afonso, A.S.; Pérez-López, B.; Faria, R.C.; Mattoso, L.H.C.; Hernández-Herrero, M.; Roig-Sagués, A.X.; Maltez-da Costa, M. and Merkoçi, A. **Electrochemical detection of Salmonella using gold nanoparticles.** Biosens. Bioelectron. 2013; 40: 121.

Bertran, J.; Blancafort, L.; Noguera, M. and Sodupe, M. **Proton transfer in DNA base pairs.** Computational studies of RNA and DNA, 2006; 2: 411.

Borlido, L.; Azevedo, A.M.; Roque, A.C.A.; Aires-Barros, M.R. **Magnetic separations in biotechnology.** Biotechnol. Adv. 2013; 31: 1374.

Cooper, G.M. **The Cell: A Molecular Approach.** 1997. ASM Press, Washington, D.C. / Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

Cortadellas, N.; Fernández, E. and Garcia, A. **Biomedical and Biological Applications of Scanning Electron Microscopy** 2012. Handbook of instrumental techniques from CCiTUB. Unitat de Microscòpia Electrònica (Casanova), CCiT-UB, Universitat de Barcelona.

Doessing, H. and Vester, B. **Locked and Unlocked Nucleosides in Functional Nucleic Acids.** Molecules 2011; 16: 4511.

Duan, Y.F.; Ning, Y. & Song, Y. and Deng, L. **Fluorescent aptasensor for the determination of Salmonella typhimurium based on a graphene oxide platform.** Microchim. Acta 2014; 181: 647.

Dulbecco, D. and Ginsberg, E. **Bacterial Physiology: Microbiology**. Second Edition, Maryland: Harper and Row, 1973: 96-97.

Freitas, M.; Viswanathan, S.; Nouws, H.P.A.; Oliveira, M.B.P.P. and Delerue-Matos, C.. **Iron oxide/gold core/shell nanomagnetic probes and CdS biolabels for amplified electrochemical immunosensing of *Salmonella typhimurium***. Biosens Bioelectron. 2014; 51: 195.

Hardin, C.C.; Watson, T.; Matthew, C. and Bailey, C. **Cation-Dependent Transition between the Quadruplex and Watson-Crick Hairpin Forms of d(CGCG3GCG)**. Biochemistry 1992, 31, 833.

Hianik, T.; Ostatna, V.; Sonlajtnerova, M. and Grman, I. **Influence of ionic strength, pH and aptamer configuration for binding affinity to thrombin**. Bioelectrochemistry. 2007; 70: 127.

Jeong, S. and Paeng, I.R. **Sensitivity and Selectivity on Aptamer-Based Assay: The Determination of Tetracycline Residue in Bovine Milk**. ScientificWorldJournal. 2012; 2012: 159456.

Joshi, R.; Janagama, H.; Dwivedi, H.P.; Senthil Kumar, T.M.A.; Jaykus, L.A.; Schefers, J. and Sreevatsan, S. **Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica* serovars**. Mol Cell Probe 2009; 23: 20.

Jyoti, A.; Vajpayee, P.; Singh, G.; Bali, P.C.; Chand, G.K. and Shanker, R. **Identification of Environmental Reservoirs of Nontyphoidal Salmonellosis: Aptamer-Assisted Bioconcentration and Subsequent Detection of *Salmonella Typhimurium* by Quantitative Polymerase Chain Reaction**. Environ. Sci. Technol. 2011; 45: 8996.

Kikin, O.; D'Antonio, L. and Bagga, P.S. *Nucleic Acids Research* 2006 July; 34 (Web Server issue): W676-W682.

Labib, M.; Zamay, A.S.; Kolovskaya, O.S.; Reshetneva, I.T.; Zamay, G.S.; Kibbee, R.J.; Sattar, S.A.; Zamay, T.N. and Berezovsk, M.V. **Aptamer-Based Impedimetric Sensor for Bacterial Typing**. *Anal Chem.* 2012; 84: 8114.

Li, Q.; Cheng, W.; Zhang, D.; Yu, T.; Yin, Y.; Ju H. and Ding, S. **Rapid and Sensitive Strategy for Salmonella Detection Using an InvA Gene-Based Electrochemical DNA Sensor**. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2012; 7: 844.

Luo, C.; Lei, Y.; Yan, L ; Yu, T.; Li, Q.; Zhang, D ; Ding, S.; Ju, H. **A Rapid and Sensitive Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Direct Detection of Escherichia Coli O111**. *Electroanal.* 2012; 24:1186.

Miller, J.N. and Miller, J.C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6th ed. 2010.

Palma, A., Lapresta-Fernández, A., Ortigosa-Moreno, J.M., Fernández-Ramos, M.D., Carvajal, M.A., Capitán-Vallvey, L.F. **A simplified measurement procedure and portable electronic photometer for disposable sensors based on ionophore-chromoionophore chemistry for potassium determination**. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006; 386: 1215.

Radi, A.E. and O'Sullivan, C.K. **Aptamer conformational switch as sensitive electrochemical biosensor for potassium ion recognition**. *Chem. Commun.* 2006; 32: 3432.

Santolaria, Z.; Arruebo, T.; Urieta, J.S.; Lanaja, F.J.; Pardo, A.; Matesanz, J. and Rodriguez-Casals, C. **Hydrochemistry dynamics in remote mountain lakes and its relation to catchment and atmospheric features: the case study of Sabocos Tarn, Pyrenees.** Environ. Sci. Pollut. Res. 2015; 22: 231.

Shamsi, M.H.; Kraatz, H.B. **Interactions of Metal Ions with DNA and Some Applications.** J Inorg Organomet Polym. 2013; 23: 4,

Shim, J.W.; Tan, Q. and Gu, L.Q. **Single-molecule detection of folding and unfolding of the G-quadruplex aptamer in a nanopore nanocavity.** Nucleic Acids Res 2009; 37: 972

Singh, G.; Vajpayee, P.; Rani, N.; Jyoti, A.; Gupta; K.C. and Shanker, R. **Bio-capture of S. Typhimurium from surface water by aptamer for culture-free quantification.** Ecotox Environ Safe. 2012; 78; 320.

Tekin, H.C. and Gijs, M.A.M. **Ultrasensitive protein detection: a case for microfluidic magnetic bead-based assays.** Lab Chip. 2013; 13: 4711.

Toro, M.; Granados, I.; Robles, S. and Montes, C. **High mountain lakes of the Central Range (Iberian Peninsula): Regional limnology & environmental changes.** Limnetica 2006; 25: 217.

Wang, J. **Analytical electrochemistry.** 2006, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 3rd ed.

Wang, X.; Lim, H.J. and Son, A. **Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization.** Environ Health Toxicol. 2014; 29: 1.

Wang, Y.; Li, Z.; Li, H.; Vuki, M.; Xu, D. and Chen H.Y. **A novel aptasensor based on silver nanoparticle enhanced fluorescence.** Biosens Bioelectron.. 2012; 32: 76.

Yuan, J.; Tao, Z.; Yu, Y.; Ma X.; Xia, Y.; Wang, L. and Wang, Z. **A visual detection method for *Salmonella Typhimurium* based on aptamer recognition and nanogold labeling.** Food Control. 2014; 37: 188.

## APÉNDICE IV.1.

Los dos grupos de bacterias, dianas y controles, fueron estadísticamente diferenciados usando el test  $t$  de student (Miller, J.N., 2010). Para ello, la media (de la señal) correspondiente a cada una de las bacterias diana fue comparada con la media de cada bacteria control para decidir si las diferencias entre las medias eran significativas.

Para probar la hipótesis de que las medias de ambas poblaciones son iguales ( $H_0: \mu_i = \mu_j$ ) se calculó el estadístico  $t_{ij}$  usando la Ecuación IV.1 y la Ecuación IV.2, con tamaño de muestra ( $n_i$ ) del grupo de bacterias  $i$  igual a 2. Cada medida se realizó por triplicado, pero se eliminó el valor que más dispersión estadística producía.  $S_i$  es la desviación estándar del grupo  $i$  y  $\bar{x}_i$  el valor medio (de la señal) del grupo  $i$ .

$$t_{ij} = \frac{\bar{x}_i - \bar{x}_j}{s_{ij} \sqrt{\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j}}} \quad \text{E.C. IV.1}$$

$$s_{ij}^2 = \frac{(n_i - 1)s_i^2 + (n_j - 1)s_j^2}{(n_i + n_j - 2)} \quad \text{E.C. IV.2}$$

Tabla IV.1. Medias y desviaciones estándar de las respuestas (%) en ensayo colorimétrico.

( i )	Bacteria	$\bar{x}_i$	$S_i$
1	<i>Shigella sonnei</i>	52,16	5,14
2	<i>Salmonella typhimurium</i>	64,45	0,29
3	<i>E.coli</i> O157 Shiga	81,13	6,13
4	<i>E. coli</i> k5	15,90	6,38
5	<i>Proteus mirabilis</i>	23,91	1,39
6	<i>Kocuria lutea</i>	12,22	10,13
7	<i>Bacillus cereus</i>	17,55	1,58

$\chi_i = (1 - (\text{Abs}_{\text{muestra}}/\text{Abs}_{\text{PBS}})) \cdot 100$ .  $\bar{x}_i$ : valor medio de la señal (%) del grupo de bacterias i;  
 $\text{Abs}_{\text{muestra}}$ : Absorbancia en presencia de muestra;  $\text{Abs}_{\text{PBS}}$ : Absorbancia en presencia del control (PBS);  $s_i$ : desviación estándar del grupo de bacterias i.

Tabla IV.2. Valores de  $s_{ij}$  del análisis estadístico t-Student en la prueba de selectividad en ensayo competitivo indirecto con detección colorimétrica.

$S_{12}$	3.64		
$S_{13}$	5.66	$S_{23}$	4.34
$S_{14}$	5.79	$S_{24}$	4.52
$S_{15}$	3.76	$S_{25}$	1.00
$S_{16}$	8.03	$S_{26}$	7.16
$S_{17}$	3.80	$S_{27}$	1.14
		$S_{34}$	6.26
		$S_{35}$	4.44
		$S_{36}$	8.37
		$S_{37}$	4.48

Tabla IV.3. Valores de  $t_{ij}$  del análisis estadístico t-Student en la prueba de selectividad en ensayo competitivo indirecto con detección colorimétrica.

$t_{12}$	3.38		
$t_{13}$	5.12	$t_{23}$	3.84
$t_{14}$	6.26	$t_{24}$	10.75
$t_{15}$	7.50	$t_{25}$	40.40
$t_{16}$	4.97	$t_{26}$	7.29
$t_{17}$	9.10	$t_{27}$	41.16
		$t_{34}$	10.43
		$t_{35}$	12.88
		$t_{36}$	8.23
		$t_{37}$	14.20

El estadístico  $t_{ij}$  tiene  $n_i + n_j - 2$  grados de libertad y de acuerdo a la Tabla A.2 (Miller, J.N., 2010) para un nivel de confianza de 95%, el valor crítico de  $|t|$  es 4.3. Por tanto para valores de  $t_{ij} > |t|$  las medias de los grupos i y j difieren significativamente. Los valores muestran que las medias de las señales obtenidas tanto de *Shigella* (1), *Salmonella* (2) como *E. coli* O157 (3) difieren



significativamente respecto a las medias de las señales de *E. coli* k5 (4), *Proteus* (5), *Kocuria* (6) y *Bacillus* (7).

## APÉNDICE IV.2

Tabla IV.4. Medias y desviaciones estándar de las respuestas (%) de la prueba de selectividad por detección electroquímica, mediante ensayo competitivo indirecto y aptámero biotinilado.

( i )	Bacteria	$\bar{x}_i$	$S_i$
1	<i>Shigella sonnei</i>	65,52	10,71
2	<i>Salmonella typhimurium</i>	35,91	2,63
3	<i>E.coli</i> O157 Shiga	45,75	1,77
4	<i>E. coli</i> k5	22,52	0,17
5	<i>Proteus mirabilis</i>	5,36	1,37
6	<i>Kocuria lutea</i>	11,95	0,08
7	<i>Bacillus cereus</i>	15,52	2,03

$\bar{x}_i = (1 - (\Delta I_{\text{muestra}} / \Delta I_{\text{PBS}})) \cdot 100$ .  $\bar{x}_i$ : valor medio de la señal (%) del grupo de bacterias  $i$ ;  $\Delta I_{\text{muestra}}$ : Intensidad de corriente en presencia de una muestra;  $\Delta I_{\text{PBS}}$ : Intensidad de corriente en presencia del control (PBS);  $S_i$ : desviación estándar del grupo de bacterias  $i$ .

Tabla IV.5. Valores de  $S_{ij}$  de ensayo electroquímico para la prueba de selectividad, mediante ensayo competitivo indirecto y aptámero biotinilado

S <sub>12</sub>	7.80		
S <sub>13</sub>	7.68	S <sub>23</sub>	2.24
S <sub>14</sub>	7.58	S <sub>24</sub>	1.87
S <sub>15</sub>	7.71	S <sub>25</sub>	2.35
S <sub>16</sub>	7.64	S <sub>26</sub>	2.10
S <sub>17</sub>	7.58	S <sub>27</sub>	1.86
		S <sub>34</sub>	1.26
		S <sub>35</sub>	1.90
		S <sub>36</sub>	1.58
		S <sub>37</sub>	1.25

Tabla IV.6. Valores de  $t_{ij}$  de ensayo electroquímico para la prueba de selectividad, mediante ensayo competitivo indirecto y aptámero biotinilado

$t_{12}$	3.80				
$t_{13}$	2.70	$t_{23}$	3.94		
$t_{14}$	5.67	$t_{24}$	7.17	$t_{34}$	17.68
$t_{15}$	6.48	$t_{25}$	8.67	$t_{35}$	15.36
$t_{16}$	7.88	$t_{26}$	14.55	$t_{36}$	24.91
$t_{17}$	7.07	$t_{27}$	12.85	$t_{37}$	26.18

***CAPÍTULO 5. Estrategia de detección N° 2: Detección  
directa de bacterias enteropatógenas***

## **CAPÍTULO 5. Estrategia de detección N° 2: Detección directa de bacterias enteropatógenas.**

### **5.1. Introducción**

En el presente capítulo mostramos el desarrollo de una estrategia de detección directa. Esta alternativa de detección es muy interesante debido a que se reducen considerablemente los tiempos de análisis. Una vez construido el biosensor, lo cual significa que el aptámero ha sido directamente enlazado al transductor, sólo queda por incubar la muestra con el analito y realizar las medidas correspondientes. Además no requiere de reactivos adicionales, lo que implica que es una estrategia de procedimiento simple y de menor costo.

El primer paso para llevar a cabo esta estrategia fue funcionalizar una superficie de oro con el elemento de reconocimiento, el aptámero, de manera de generar una plataforma de detección estable. Para lograr tal funcionalización fue necesario modificar el aptámero en uno de sus extremos con un grupo tiol (-SH) para luego formar una monocapa autoensamblada (SAM, Self-Assembled Monolayer) sobre la superficie de oro. El término "autoensamble" implica la disposición de átomos y moléculas funcionales en una forma ordenada energéticamente estable. La formación de SAM es esencialmente una organización de moléculas en la interfase sólido-líquido, inducida por una fuerte quimisorción entre el sustrato y un átomo o grupo de átomos localizado en un extremo de la molécula (Chaki, N.K., 2002). Aunque las películas de Langmuir-Blodgett formadas por fisorción de anfifílicas son buenas para varias aplicaciones de biosensores, desde un punto de vista fundamental son termodinámicamente inestables, y consecuentemente pequeños cambios de temperatura o exposiciones a solventes pueden arruinar su estructura bidimensional (Chaki, N.K., 2002). La formación de SAMs no solo da como resultado películas orgánicas más rugosas, como consecuencia de la fuerte quimisorción de moléculas adecuadas tales como los compuestos

organosulfurados, sino que también es capaz de imprimir una función deseada cuando moléculas individuales son ensambladas en una arquitectura altamente orientada y ordenada (Frasconi, M., 2010; Chaki, N.K., 2002).

En la primera parte de este capítulo se estudia la funcionalización de un chip de oro con aptámero y su afinidad hacia diferentes bacterias. Primero se muestra la caracterización mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) de la SAM mixta formada por los aptámeros tiolados en combinación con las moléculas de relleno (6-mercaptohexanol) sobre un sustrato de oro (chip). Luego de verificar la formación de la SAM mixta, se analizó mediante SPR la afinidad del aptámero frente a tres bacterias. Dos de ellas, *S. typhimurium* y *E. coli* O157 Shiga, pertenecientes a la misma familia *Enterobacteriaceae*. Como se explicó en el capítulo 1 ambas bacterias son Gram negativas, con forma de bacilo y muy cercanas desde el punto de vista filogenético. La tercera bacteria, *Micrococcus luteus* (o *Kocuria lutea*), pertenece a la familia de las *Micrococcaceae*, las cuales son Gram positivas de forma cocoide.

En la segunda parte de este capítulo se muestra el desarrollo de un aptasensor electroquímico basado en la detección directa de bacterias enteropatógenas. El aptámero tiolado se utilizó para funcionalizar electrodos serigrafados de oro y detectar electroquímicamente las bacterias mediante EIS. Se construyó una curva de calibración con la bacteria *S. typhimurium* por medio de la cual se pudieron obtener los parámetros LOD, sensibilidad y rango de linealidad. También un ensayo de selectividad se llevó a cabo para establecer la efectividad de esta estrategia de detección en la diferenciación del grupo de las bacterias enteropatógenas (*S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei*) respecto del resto de bacterias estudiadas (*E. coli* k5, *B. cereus*, *P. mirabilis* y *K. lutea*).

## Técnicas de detección óptica (SPR) y electroquímica (EIS)

Se utilizó SPR para caracterizar la afinidad del aptámero por la bacteria. Esta técnica se basa en el fenómeno electromagnético cuántico que surge de la interacción de la luz con los electrones libres en una interfase metal-dieléctrico. La espectroscopía SPR ha emergido como un poderoso sensor óptico basado en la detección del cambio en el índice de refracción de un medio adyacente a la superficie del metal (Fen, Y.W., 2013; Green, R.J., 2000).

El principio básico del SPR se puede entender cuando un rayo de luz pasa desde un material con un índice de refracción  $n_1$  (por ejemplo, vidrio) a un material con un menor índice de refracción  $n_2$  (por ejemplo, agua); en tal caso la luz es parcialmente reflejada y parcialmente refractada. Cuando el ángulo en que la luz incide en la interfase (ángulo de incidencia) es mayor que el ángulo crítico (Figura 5.1), la luz no se refracta a través de la interfase y se observa reflexión interna total.

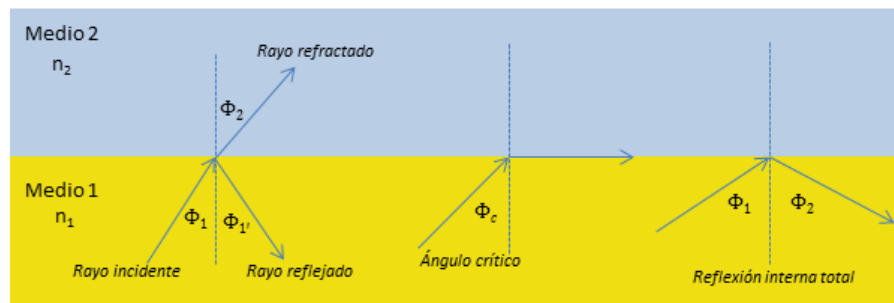


Figura 5.1. Principio básico de SPR.  $\Phi_1$ : ángulo luz incidente;  $\Phi_1'$ : ángulo luz reflejada;  $\Phi_2$ : ángulo luz refractada;  $\Phi_c$ : ángulo crítico;  $n_i$ : índice de refracción.

La técnica SPR se sustenta en este principio básico en donde la interfase es recubierta con una película delgada de metal y la luz incidente es monocromática y p-polarizada. Esta luz es absorbida y la energía es transferida a los electrones, los cuales son transformados en plasmones superficiales en la interfase. El haz de luz incide en un ángulo concreto llamado ángulo de resonancia (Figura 5.2) (Fen, Y. W., 2013).

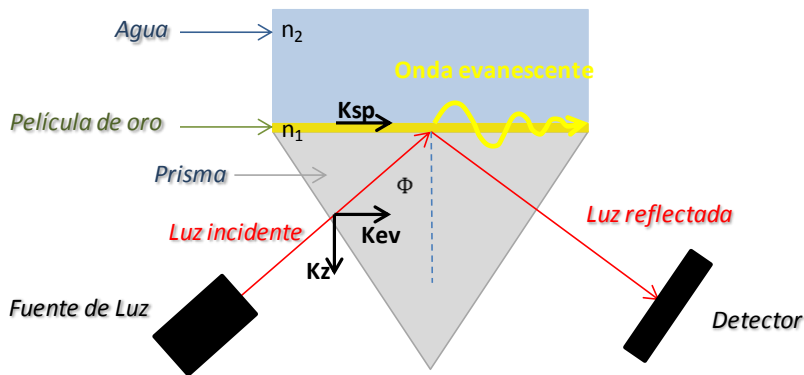


Figura 5.2. Configuración de Kretschmann.

Los plasmones superficiales son excitados utilizando diferentes medios, sin embargo la utilización de prismas de acoplamiento, conocida como configuración de Kretschmann, constituye el método más utilizado para la excitación del plasmón superficial. En esta configuración del método de reflectancia total atenuada (ATR), la luz atraviesa un prisma de alto índice de refracción y es reflejada produciendo una onda evanescente que penetra en la capa metálica. La onda se propaga a lo largo de la interfase con una constante de propagación que produce la excitación del plasmon superficial (Sípová, H., 2013).

Los equipos SPR miden cambios en el índice de refracción sobre la superficie de un metal que presenta plasmón superficial y pueden ser dispositivos altamente sensibles para detectar interacciones biomoleculares cuando un elemento de reconocimiento adecuado se inmoviliza sobre la superficie de la capa metálica. Como muestran las Figuras 5.3 A y B, cuando las moléculas de analito se unen al elemento de reconocimiento se produce un incremento del índice de refracción local en la superficie. Los cambios en el índice de refracción de este medio producen cambios en la constante de propagación del plasmón superficial. Al registrar de forma continua la luz reflejada, se obtiene un perfil de los cambios del índice de refracción en el medio adyacente a la superficie metálica, obteniéndose información en tiempo real de las interacciones que ocurren en él como muestra la Figura 5.3 C, gráfico denominado sensograma. Adicionalmente, es posible



registrar variaciones en el índice de refracción en función del ángulo de la luz incidente, como se muestra en la Figura 5.3 D.

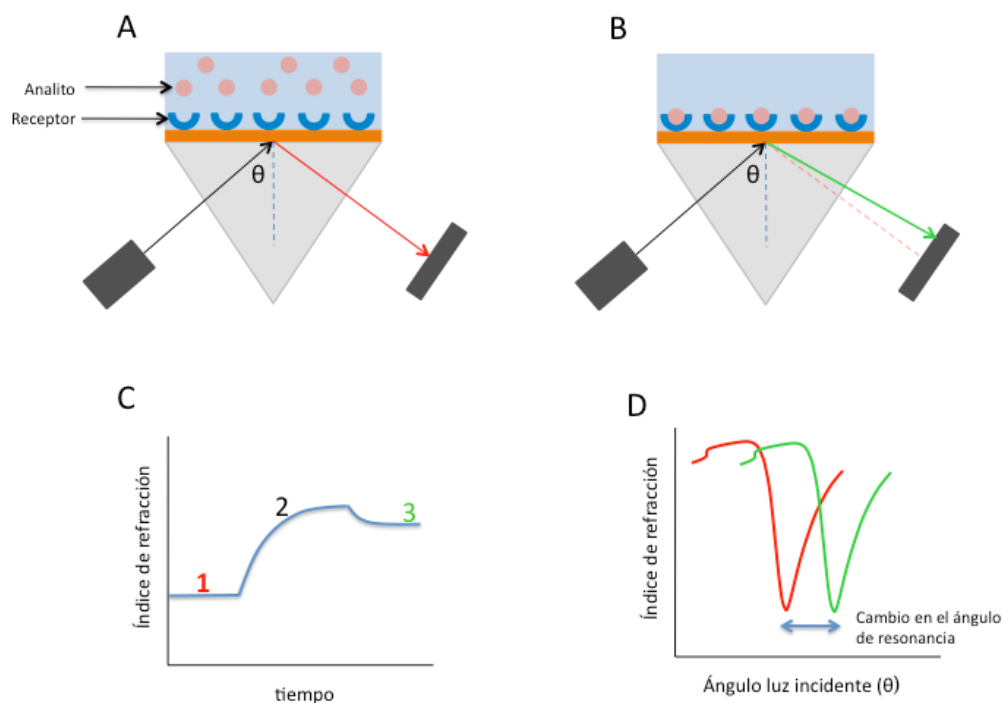


Figura 5.3. Interacción biomolecular entre un receptor inmovilizado en la superficie de oro y un analito en solución (A y B). Variación del índice de refracción en función del tiempo (C) y del ángulo de incidencia (D).

Para caracterizar la unión de nuestro elemento de reconocimiento (aptámero) a la superficie de oro y la posterior unión del analito (bacteria) al elemento de reconocimiento, se registró el cambio en el índice de refracción en función del tiempo, a un ángulo de incidencia fijo (cinética de inmovilización) (Figura 5.3 C). También se registró el índice de refracción respecto del ángulo de incidencia (Figura 5.3 D) antes y después de una etapa de inmovilización, con lo cual se pudo estimar la concentración superficial de moléculas inmovilizadas sobre la superficie de oro.

La técnica electroquímica utilizada en este capítulo para detectar la presencia de la bacteria diana fue EIS. Para entender el concepto de impedancia primero nos

referiremos a la resistencia eléctrica  $R$ . Esta propiedad eléctrica está relacionada a la capacidad de un elemento de un circuito para resistir el flujo de electrones (corriente eléctrica). En circuitos con corriente directa (DC), que son un caso especial de corriente alterna (AC) en donde la frecuencia es igual a 0 Hz, la ley de Ohm (Ecuación 5.1) define la resistencia  $R$  en términos de la relación entre el voltaje de entrada  $V$  y la corriente de salida  $I$  (Lvovich, V.F., 2012):

$$R = \frac{V}{I} \quad \text{E.C. 5.1}$$

Esta ecuación bien conocida, está solamente limitada a un elemento del circuito, el resistor ideal, el cual cumple varias condiciones: 1) cumple con la ley de Ohm en todos los niveles de voltaje y corriente, 2) su valor de resistencia es independiente de la frecuencia, y 3) las señales de voltaje y corriente a través de un resistor están en la misma fase. Sin embargo, en la realidad hay elementos como los inductores y capacitores que poseen comportamientos más complejos. Estos elementos obligan a eliminar el simple concepto de resistencia y en su defecto se utiliza el de impedancia, que es un parámetro del circuito mucho más general. Al igual que la resistencia, la impedancia es una medida de la capacidad de un circuito para resistir el flujo de electrones. A diferencia de la resistencia, la impedancia no está limitada por ninguna de las condiciones anteriores (Ramírez, N., 2009).

En situaciones experimentales la impedancia electroquímica normalmente se mide aplicando una señal de voltaje  $V_A$  (expresado en volt) con amplitud (A) pequeña, a una frecuencia  $f$  (expresada en Hz o  $s^{-1}$ ). La señal voltaje  $V(t)$ , expresada como una función del tiempo  $t$ , sigue la ecuación 5.2. (Lvovich, V.F., 2012):

$$V(t) = V_A \text{sen}(2\pi f t) = V_A \text{sen}(\omega t) \quad \text{E.C. 5.2}$$

En donde  $\omega$  es la “frecuencia radial” (expresada en radianes/segundo), que es igual a  $2\pi f$ . La respuesta corriente  $I$  a un voltaje sinusoidal será una senoide a la

misma frecuencia pero desplazada en fase. La respuesta corriente  $I(t)$ , que está con un desfase  $\Phi$  y con una amplitud  $I_A$ , sigue la ecuación 5.3. (Lvovich, V.F., 2012):

$$I(t) = I_A \text{sen}(\omega t + \phi) \quad \text{E.C. 5.3}$$

Entonces la expresión análoga a la Ley de Ohm nos permite calcular la impedancia compleja del sistema como una relación entre el voltaje de entrada  $V(t)$ , y la corriente de salida  $I(t)$  (ecuación 5.4) (Lvovich, V.F., 2012):

$$Z = Z(t) = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_A \text{sen}(\omega t)}{I_A \text{sen}(\omega t + \phi)} = Z_A \frac{\text{sen}(\omega t)}{\text{sen}(\omega t + \phi)} \quad \text{E.C. 5.4}$$

La impedancia está por tanto expresada en términos de una magnitud (valor absoluto)  $Z_A$  y un desfase  $\Phi$ .

Utilizando la relación de Euler (Ecuación 5.5):

$$e^{j\phi} = \cos\phi + j\text{sen}\phi \quad \text{E.C. 5.5}$$

es posible expresar la impedancia como una función compleja, en donde el potencial  $V(t)$  y la corriente  $I(t)$  quedan expresados como en las ecuaciones 5.6 y 5.7 respectivamente:

$$V(t) = V_A e^{j\omega t} \quad \text{E.C. 5.6}$$

$$I(t) = I_A e^{j\omega t - j\phi} \quad \text{E.C. 5.7}$$

Por lo tanto, la impedancia se representa como un número complejo que también puede ser expresado en matemáticas complejas como una combinación de una

parte “real”, o en fase ( $Z_{REAL}$ ), y una parte “imaginaria”, o fuera de fase ( $Z_{IMAG}$ ) (Lvovich, V.F., 2012), como se muestra en la ecuación 5.8:

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = Z_A e^{j\phi} = Z_A (\cos\phi + j\text{sen}\phi) = Z_{REAL} + Z_{IMAG} \quad \text{E.C. 5.8}$$

Para comprender de que manera la impedancia nos permite detectar la presencia de un analito, y en nuestro caso particular el enlace de bacterias, los eventos que ocurren en las proximidades de la superficie de los electrodos se pueden simplificar a una interfase electrificada como muestra la Figura 5.4 A, basada en el modelo propuesto por Helmholtz (Parsons, R., 1990), y que es modelada por un circuito eléctrico equivalente (o circuito de Randles) (Figura 5.4 B). Este circuito eléctrico modelo está formado por un capacitor de doble capa ( $C_d$ ) en paralelo con un resistor de polarización ( $R_p$ ) (también conocido normalmente como resistencia a la transferencia de carga ( $R_{TC}$ )) y una impedancia de Warburg ( $W$ ), conectados en serie con el resistor que mide la resistencia de la solución electrolito ( $R_s$ ).

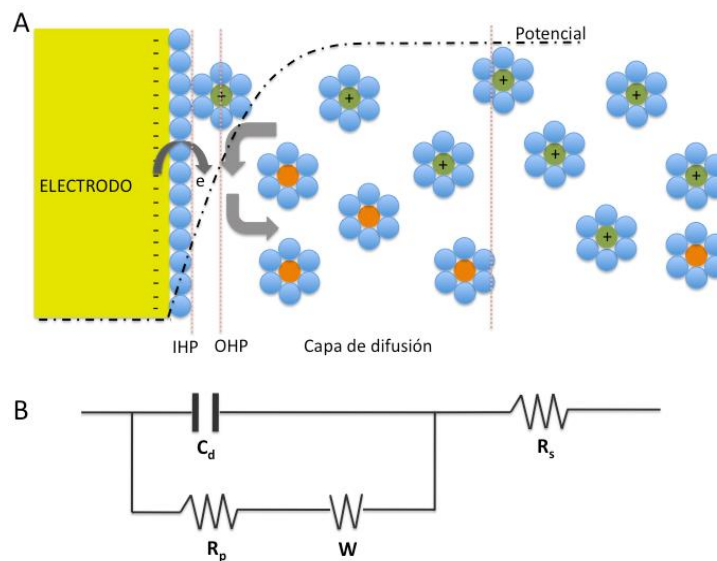


Figura 5.4. (A) Interfase electrificada. IHP: Plano Interno de Helmholtz, OHP: Plano Externo de Helmholtz. (B) Circuito equivalente o de Randles.  $C_d$ : Capacitor de doble capa;  $R_p$ : Resistencia de transferencia de carga;  $W$ : Impedancia de Warburg;  $R_s$ : Resistencia de la solución electrolito. Dibujos modificados de (Park, S.M., 2003).

Una forma adecuada de tratar los datos de impedancia de la interfase electrificada es a través de los gráficos de Nyquist (Figura 5.5). Estos gráficos entregan toda la información necesaria acerca de la interfase electrodo-electrolito y la reacción electroquímica que sucede.

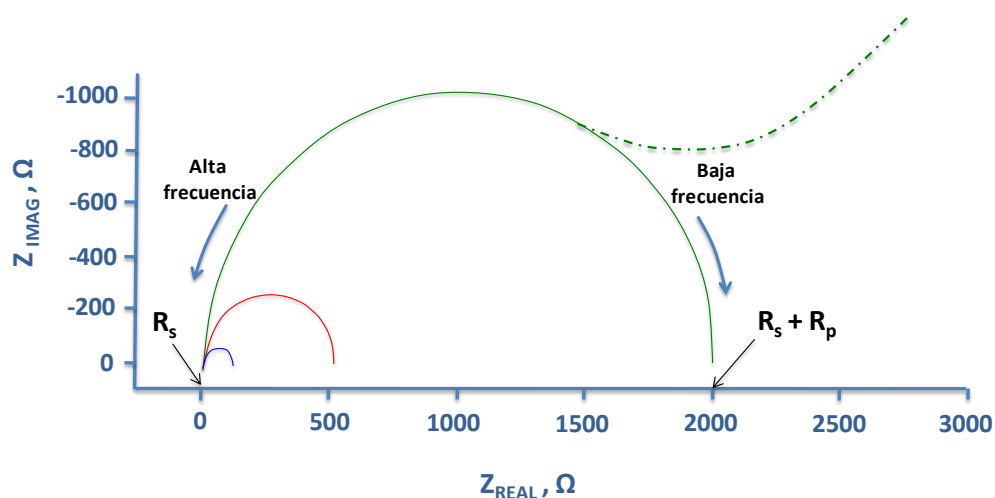


Figura 5.5. Gráfico de Nyquist.  $R_s$ : Resistencia de la solución.  $R_p$ : Resistencia a la transferencia de carga.

Para conocer las características del sistema (interfase electrificada), modelado por el circuito eléctrico de Randles, se requiere interpretar el gráfico de Nyquist de acuerdo a las ecuaciones 5.9 y 5.10 (Park, S.M., 2003).

De acuerdo a la ecuación 5.9, a frecuencias altas la impedancia del sistema,  $Z(\Omega)$ , es igual a la  $R_s$ , la cual corresponde al intercepto en el gráfico de Nyquist sobre el eje  $Z_{REAL}(\Omega)$ , en el lado de frecuencias altas. Para frecuencias muy pequeñas, cercanas a cero, de la ecuación 5.9 se obtiene que  $Z(\Omega)$  es igual a  $R_s + R_p$ , la cual corresponde al intercepto en el eje  $Z_{REAL}(\Omega)$  en el lado de frecuencias bajas.

$$Z(\omega) = R_s + \frac{R_p}{1 - \omega^2 R_p^2 C_d^2} - j \frac{\omega R_p^2 C_d}{1 + \omega^2 R_p^2 C_d^2} \quad \text{E.C. 5.9}$$

Por otro lado, a valores de frecuencia en los cuales se obtiene el máximo  $Z_{\text{IMAG}}(\Omega)$ , se tiene que  $R_p \cdot C_d = 1/\omega = 1/(2\pi f) = \tau_{\text{rxn}}$ , que es la constante de tiempo de la reacción e indica que tan rápida puede ser la reacción.

La contribución de la impedancia de Warburg al sistema tiene importancia a frecuencias bajas porque el transporte de masa de las especies electroactivas puede limitar el proceso de transferencia de electrones. La impedancia de Warburg está dada por la transferencia de masa y se puede obtener de la ecuación 5.10:

$$Z(\omega) = R_s + R_p \left[ 1 + \frac{\lambda}{\sqrt{2\omega}} \right] - R_p \lambda C_d - j R_p \frac{\lambda}{\sqrt{2\omega}} \quad \text{E.C. 5.10}$$

en donde

$$\lambda = \frac{k_1}{\sqrt{D_O}} + \frac{k_2}{\sqrt{D_R}} \quad \text{E.C. 5.11}$$

y  $k_1$  y  $k_2$  son las constantes de velocidad de transferencia de electrones de una reacción redox,  $O + ne^- \leftrightarrow R$ , en el sentido de la reducción y la oxidación respectivamente.  $D_O$  y  $D_R$  son los coeficientes de difusión para el oxidante y reductor respectivamente. El término dependiente de la frecuencia ( $\lambda\sqrt{2\omega}$ ), que aparece tanto en la parte real como imaginaria es llamado impedancia de Warburg (Park, S.M., 2003).

El gráfico de Nyquist permite obtener toda la información sin necesidad de recurrir a las ecuaciones antes descritas. En general, el parámetro más relevante en términos de la influencia en los valores de impedancias debido a los cambios producidos en la superficie de oro, es la resistencia a la transferencia de carga

( $R_p$ ). Este valor corresponde al diámetro del semicírculo observado en los gráficos de Nyquist como se aprecia en la figura anterior.

La Figura 5.6 muestra la estrategia desarrollada para detectar electroquímicamente por EIS las bacterias enteropatógenas.

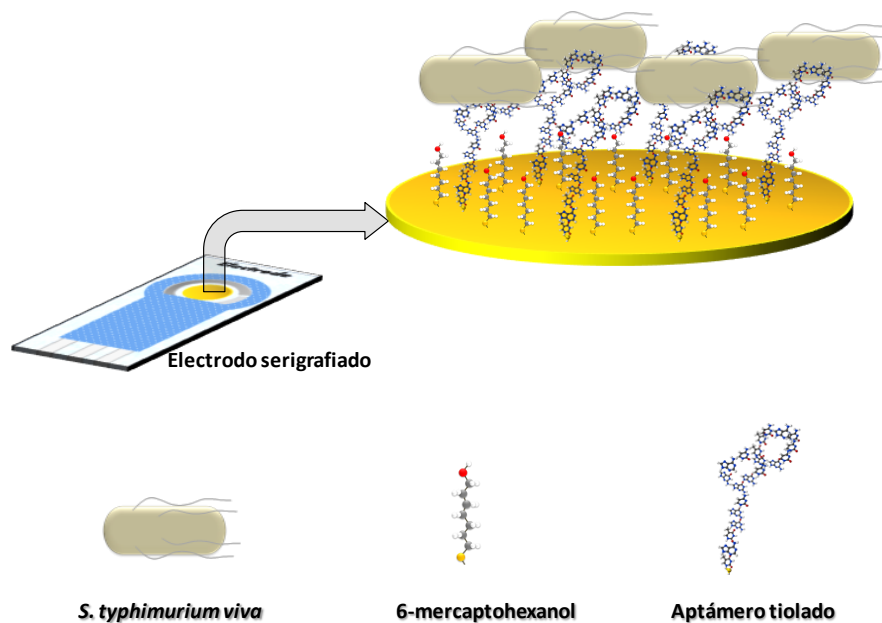


Figura 5.6. Estrategia de detección directa de bacterias, mediante el uso de la técnica electroquímica EIS.

En esta estrategia la utilización de la técnica EIS se aprovecha en virtud de que la transferencia de carga entre la solución y la superficie de oro se ve obstaculizada cuando las bacterias son reconocidas por el aptámero y por tanto capturadas sobre la superficie de oro.

## 5.2. Materiales

Los chips de oro de 2 cm x 2 cm, sobre sustrato de cristal BK7 de 2 mm de espesor, con una capa de cromo de 2 nm sobre el cristal y una capa de oro de 50 nm sobre la capa de cromo fueron comprados a RES-TEC. Los reactivos peróxido de hidrógeno, ácido sulfúrico, 6-mercaptohexanol, tris(hidroximetil)aminometano, ácido perclórico e hidróxido de sodio fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El reactivo Reductacryl fue adquirido de Calbiochem. El aptámero tiolado, 5'- SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-TATGGCGGCGTCACCCGACGGGGACTTGACATTATGACAG-3', fue comprado en DNA technology. Las bacterias *S. typhimurium* cepa SV5015, *E. coli* O157 Shiga y *E. coli* k5 fueron proporcionadas por el laboratorio Microbial biotechnology and host-pathogen interaction (IBEC, Institut de Bioenginyeria de Catalunya). Las bacterias *S. sonnei*, *P. mirabilis*, *B. cereus* y *K. lutea* fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología aplicada y medio ambiental (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona). Los electrodos serigrafados modelo 250AT fueron comprados en Dropsens. Los experimentos de SPR se llevaron a cabo con un instrumento SPR RT2005 (RES-TEC GmbH, Max Planck Institute for Polymer Research). Para realizar las medidas electroquímicas se utilizó un potenciostato Bio-Logic SP 150 y el software utilizado para el ajuste de los espectros de impedancias al circuito eléctrico equivalente (Randles) fue el EC-Lab.

## 5.3. Procedimientos

### *Preparación del chip de oro*

Los chips de oro se sumergieron en 10 mL de una solución piraña (3:7 v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) durante 5 min. Luego se lavaron minuciosamente con agua Milli-Q. Posteriormente los chips se sumergieron en agua Milli-Q y se sonicaron durante 5 min. Se secaron con flujo moderado de N<sub>2</sub> y se dejaron en cámara de ozono por 5 min. Luego fueron puestos en contacto directo con el prisma mediante un aceite



de inmersión para encajarlos en una celda de flujo conectada a una bomba peristáltica (Ismatec). Sobre un soporte metálico (Figura 5.7 A) se insertó la celda de flujo (Figura 5.7 B), sobre la cual se puso el chip de oro (Figura 5.7 C) en contacto directo con el prisma (Figura 5.7 D). Se cerró el soporte metálico (Figura 5.7 E) y se instaló en el equipo SPR (Figura 5.7 F).

La variación de la reflectividad fue medida como una función del tiempo a un ángulo fijo. El flujo de la bomba peristáltica para todos los experimentos se mantuvo a una velocidad constante de 56  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

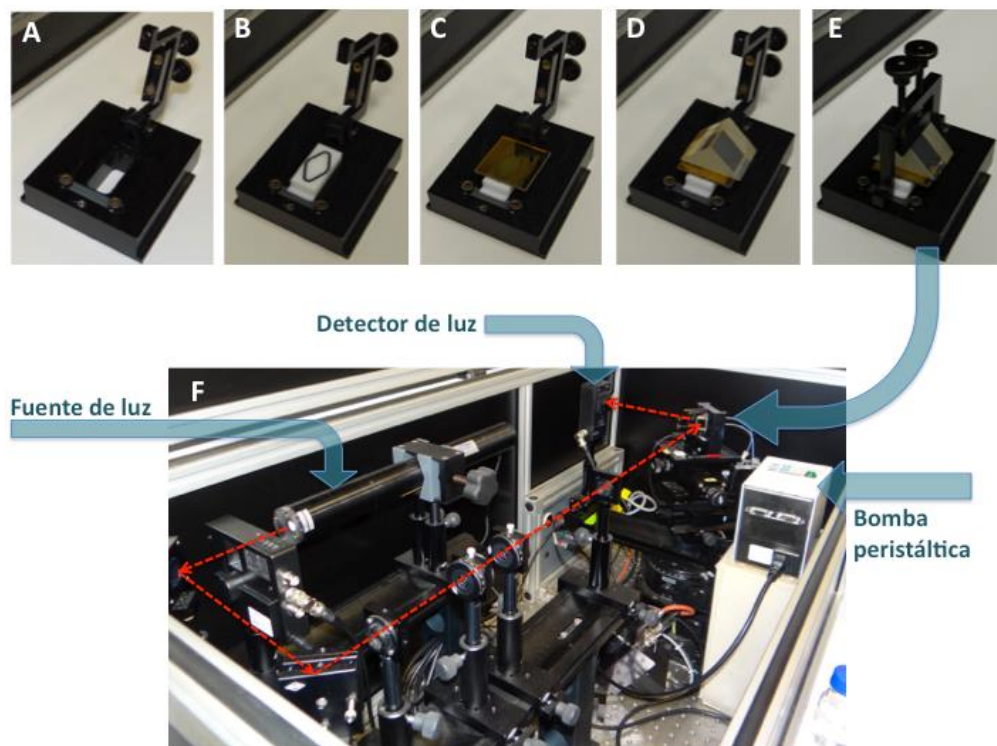


Figura 5.7. Montaje del chip de oro en contacto directo con la celda de flujo y el prisma. A) Soporte de la celda; B) Celda de flujo; C) Chip de oro sobre la celda; D) Prisma sobre el chip; E) Configuración completa para ser insertada en el equipo SPR (F).

### Funcionalización de la superficie de oro del chip

Se preparó una solución de aptámero tiolado ( $1 \mu\text{M}$ ) y 6-mercaptohexanol ( $10 \mu\text{M}$ ) en tampón Tris- $\text{ClO}_4$ , 20 mM y pH 8.6. Se agregó una punta de espátula del reactivo Reductacryl a la solución anterior, y se agitó en un equipo termomixer a 1300 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la solución a 13200 rpm por 15 min a temperatura ambiente, recuperándose el sobrenadante, y descartándose el pellet. En el equipo SPR se hizo recircular la solución sobrenadante de aptámero tiolado y 6-mercaptohexanol por la celda de flujo durante la noche ( $\approx 18$  h). Soluciones de bacterias *S. typhimurium*, *E. Coli* O157 Shiga y *K. lutea* fueron preparadas a una concentración de  $10^7$  CFU/mL en PBS 10 mM a pH 7.4. Se hizo recircular cada una de estas soluciones, en forma separada, por la celda de flujo durante 1 h y se realizaron medidas de SPR. La configuración de los elementos inmovilizados sobre el chip de oro se puede observar en la Figura 5.8.

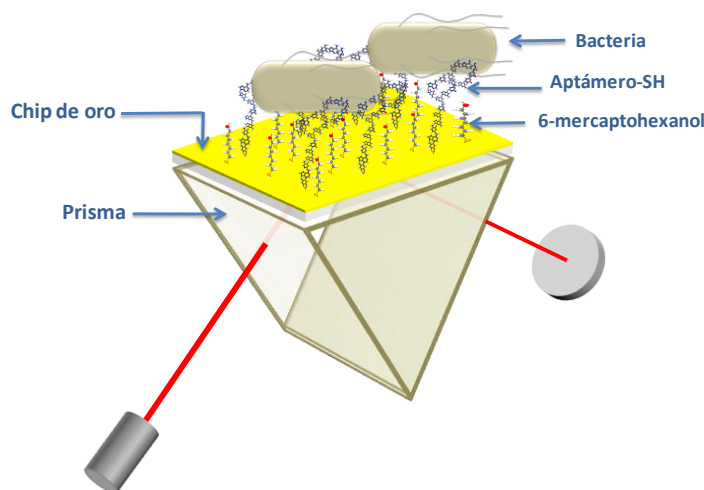


Figura 5.8. Representación de los elementos inmovilizados (aptámero-SH, 6-mercaptohexanol y bacteria) sobre la superficie de oro del chip, el cual está en contacto directo con el prisma.

### *Regeneración de la superficie del chip*

Para realizar un estudio de regeneración de la plataforma de detección (chip de oro modificado con aptámero), después de llevar a cabo la cinética de enlace de *S. typhimurium* a una concentración de  $10^7$  CFU/mL, se ensayaron dos soluciones diferentes. En la primera prueba se hizo recircular por la celda de flujo una solución NaCl 2M por aproximadamente 10 min. En la segunda se ensayó con una solución de NaOH 10 mM durante 5 min, seguida de una solución de NaOH 50 mM durante 5 min y posteriormente NaOH 100 mM durante 5 min más.

### *Detección electroquímica de bacterias mediante EIS*

Inicialmente se depositaron sobre el electrodo 60  $\mu$ L de una solución de ferrocianuro de potasio 2.5 mM y ferricianuro de potasio 2.5 mM en PBS a pH 7.4. Se realizó una voltametría cíclica (CV) a una velocidad de barrido de 100 mV/s, entre -0.4 y +0.6 V y luego se realizó una espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) entre un rango de frecuencias de 100000 Hz a 0.5 Hz, con una amplitud de 5 mV y utilizando el potencial de circuito abierto. Se lavaron los electrodos con PBS, luego con agua Milli-Q y se secaron con  $N_2$ . A una solución de aptámero tiolado (1  $\mu$ M) y 6-mercaptohexanol (10  $\mu$ M) en tampón Tris-ClO<sub>4</sub>, 20 mM a pH 8.6, se le agregó Reductacryl (una punta de espátula). Se agitó en termomixer a 1300 rpm por 15 min a temperatura ambiente. La solución se centrifugó a 13200 rpm por 15 min a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante, descartándose el pellet. Luego se depositaron 40  $\mu$ L de la solución de aptámero tiolado y 6-mercaptohexanol y se incubaron los electrodos a 4°C durante 5 días. Posteriormente se lavaron los electrodos con la solución de Tris-ClO<sub>4</sub> seguido de un lavado con agua Milli-Q y se secaron con  $N_2$ . A continuación se depositaron 60  $\mu$ L de la solución ferrocianuro/ferricianuro, realizando una CV y una EIS a las mismas condiciones previamente descritas. Se lavaron los electrodos con la solución de PBS y posteriormente con agua Milli-Q, para luego secarlos con  $N_2$ . Se incubaron los electrodos con 40  $\mu$ L de una solución de

bacterias a una concentración de  $10^7$  CFU/mL, durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación suave. Se lavaron los electrodos con la solución de PBS y posteriormente con agua Milli-Q, para secarlos posteriormente con  $N_2$ . Finalmente se realizó una CV y una EIS con 60  $\mu$ L de la solución ferrocianuro/ferricianuro depositada en los electrodos.

Para confeccionar la curva de calibrado tanto en PBS como en una matriz real (agua de montaña), se siguió el protocolo previamente descrito, pero en este caso incubando durante 1 h los electrodos con 40  $\mu$ L de una solución de *S. typhimurium* a diferentes concentraciones ( $10^1$  a  $10^7$  CFU/mL) preparada tanto en PBS como en agua de montaña proveniente de los Pirineos, específicamente del lago Sabocos (Capítulo 4). Para evaluar la selectividad se siguió el mismo protocolo mencionado con anterioridad incubando durante 1 h los electrodos con 40  $\mu$ L de una solución de las diferentes bacterias disponibles (*S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga, *E. coli* k5, *B. cereus*, *P. mirabilis* y *K. lutea*) a una concentración de  $10^7$  CFU/mL.

## 5.4. Resultados

### *Caracterización mediante SPR de la afinidad aptámero-bacteria*

El sensograma de la inmovilización del aptámero tiolado y la molécula de relleno 6-mercaptohexanol, preparados en tampón Tris-ClO<sub>4</sub>, 20 mM y pH 8.6, sobre el chip de oro (Figura 5.9), muestra la variación neta en el índice de refracción (R) antes y después de su autoensamblaje. Previo a la inmovilización del aptámero, se hizo recircular sobre el chip de oro una solución de PBS pH 7.4 (solución de referencia o de línea base). Finalizado el periodo de inmovilización (1060 min) se efectuó un lavado haciendo recircular una solución Tris-ClO<sub>4</sub> para eliminar las moléculas de aptámero que no quedaron enlazadas a la superficie de oro. La etapa de inmovilización del aptámero se llevó a cabo durante la noche, de manera de asegurar la estabilidad de la monocapa, aunque se observa que

aproximadamente a los 60 min se logra la estabilidad. Finalmente la solución de referencia se hizo recircular lo que permitió ver la variación neta en el índice de refracción, que alcanzó un valor de 2.3 RU

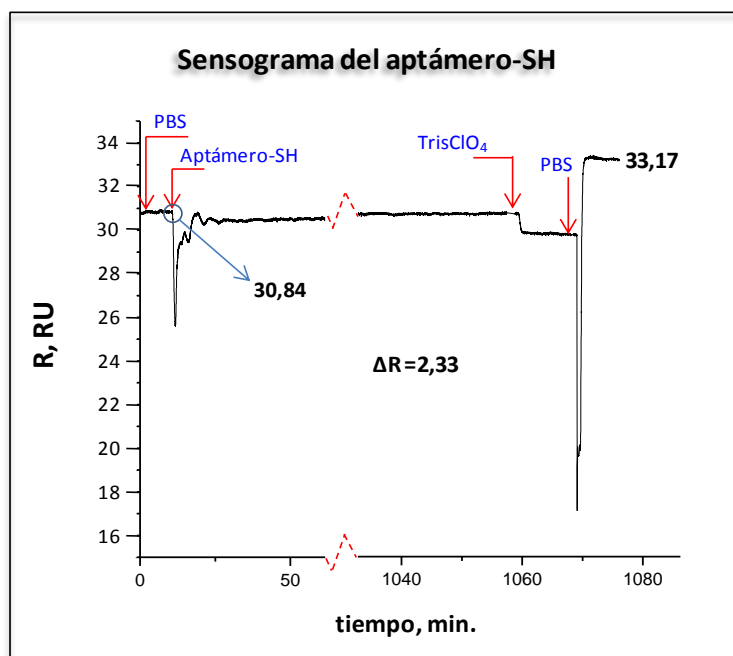


Figura 5.9. Sensograma correspondiente a la inmovilización del aptámero-SH y 6-mercaptophexanol sobre el chip de oro.

La curva de variación del índice de refracción en función del ángulo de incidencia ajustada con el software WinSpall versión 3.02 permitió observar el desplazamiento del ángulo mínimo de reflectividad antes y después de inmovilizar el aptámero tiolado sobre el chip de oro (Figura 5.10).

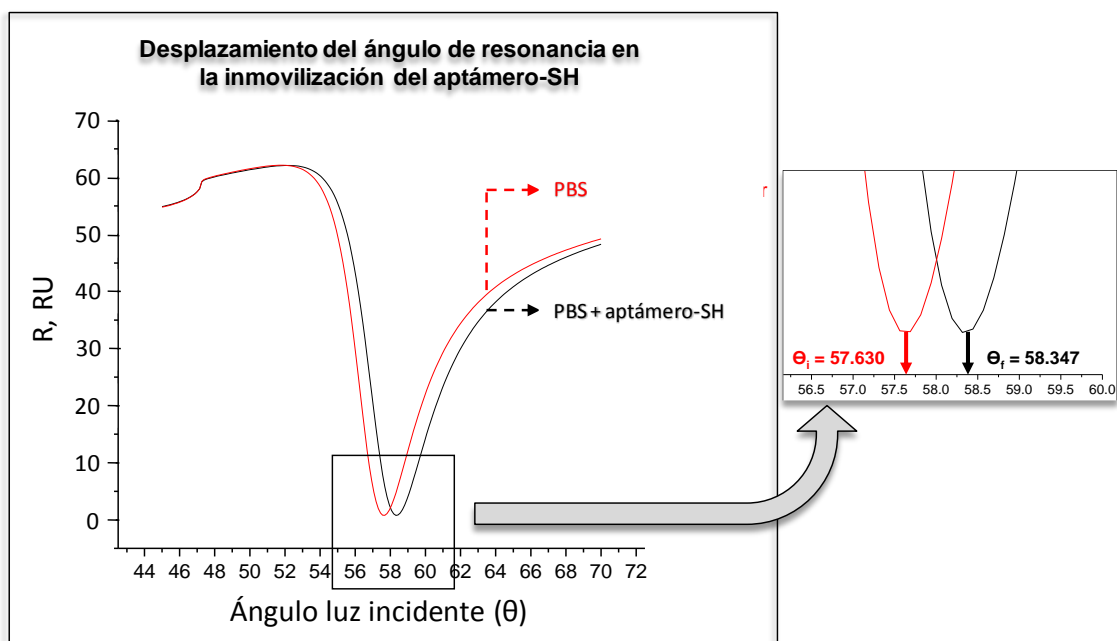


Figura 5.10. Curvas de reflectividad antes y después de la coimmobilización del aptámero-SH y 6-mercaptophexanol.  $\theta_i$ : ángulo de resonancia inicial, previo a la inmovilización;  $\theta_f$ : ángulo de resonancia final, posterior a la inmovilización.

A partir de estas dos curvas se determinó el desplazamiento del ángulo de resonancia ( $\Delta\theta = \theta_f - \theta_i$ ), que en definitiva permitió calcular en forma aproximada el número de moléculas de aptámero-SH inmovilizadas en la superficie de oro. Mediante la Ecuación 5.8 (Yu, F., 2004) formulada para el mismo equipo SPR utilizado en este trabajo, se pudo obtener una aproximación de la masa de moléculas adsorbidas sobre la superficie de oro.

$$\frac{\theta_f - \theta_i}{\Gamma} = 19 [^\circ / \text{ng/mm}^2] \quad \text{EC. 5.8}$$

en donde:

$\theta_f$  : ángulo de resonancia final [ $^\circ$ ], con un valor de 58.347

$\theta_i$  : ángulo de resonancia inicial [ $^\circ$ ], con un valor de 57.630

$\Gamma$  : superficie cubierta,  $\text{ng/mm}^2$

Considerando que el peso molecular del aptámero-SH y del 6-mercaptohexanol son 12737.1 g/mol y 134.2 g/mol, respectivamente, y que ambas moléculas están en una relación molar de 1:10, el valor de  $\Gamma$  para el aptámero-SH fue:

$$\Gamma_{\text{aptámero-SH}} = 1.6 \times 10^{11} \text{ moléculas/mm}^2$$

Una vez comprobada la inmovilización de las moléculas de aptámero se llevaron a cabo las cinéticas para evaluar la afinidad del aptámero hacia las tres bacterias previamente mencionadas: *S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *K. lutea*.

Los resultados de la Figura 5.11 muestran que después de 1 h de recirculación de la solución de *S. typhimurium* a  $10^7$  CFU/mL, la variación neta en el índice de refracción ( $\Delta R$ ) alcanzó un valor de 1.6 RU.

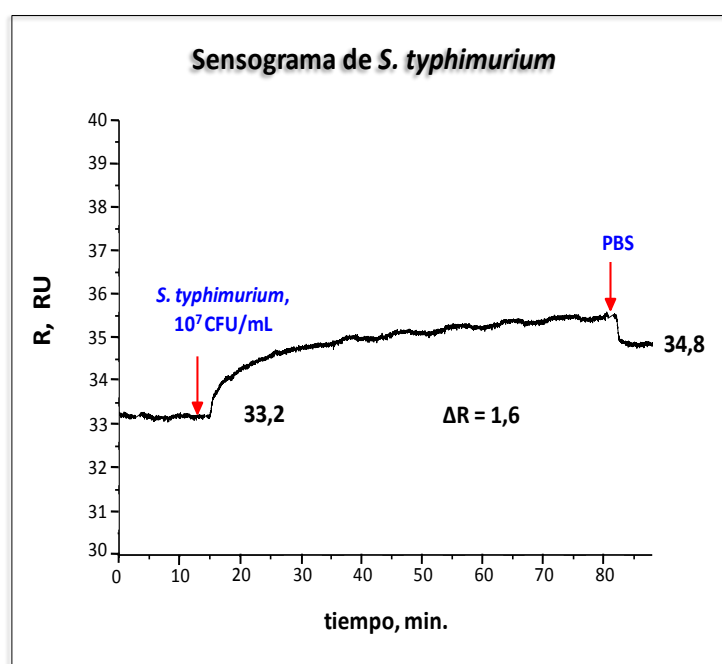


Figura 5.11. Sensograma obtenido con la superficie modificada con aptámero tras ser expuesta 1 h a una solución de *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL.

En forma similar se obtuvo el sensograma para *E. coli* O157 Shiga (Figura 5.12) de cuyo resultado se observa que después de 1 h de recirculación de la bacteria a una concentración  $10^7$  CFU/mL, el incremento en R alcanzó un valor de 4.7 RU.

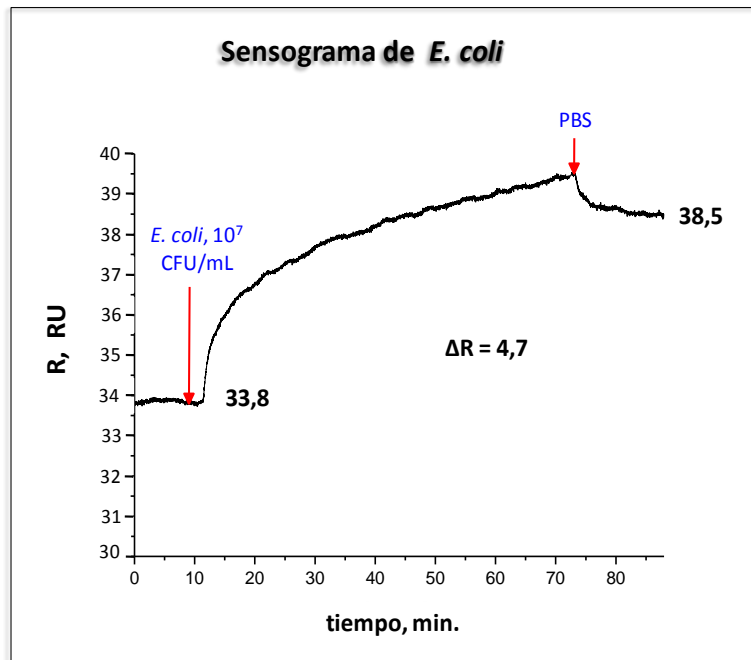


Figura 5.12. Sensograma obtenido con la superficie modificada con aptámero tras ser expuesta 1 h a una solución de *E.coli* O157 Shiga  $10^7$  CFU/mL.

Finalmente, el sensograma obtenido para *K. lutea* (Figura 5.13), a una concentración de  $10^7$  CFU/mL, dió como resultado un incremento nulo del índice de refracción.



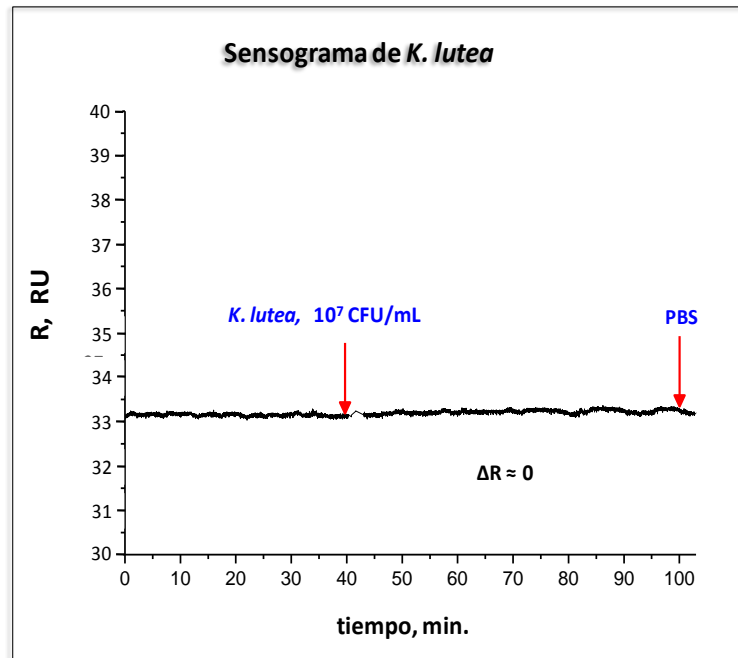


Figura 5.13. Sensograma obtenido con la superficie modificada con aptámero tras ser expuesta 1 h a una solución de *K. lutea* 10<sup>7</sup> CFU/mL.

#### *Regeneración de la superficie del chip*

En el intento de regenerar la plataforma de detección (Figura 5.14) se hizo recircular inicialmente una solución de NaCl 2 M por 10 min, después de haber incubado *S. typhimurium* 10<sup>7</sup> CFU/mL sobre la superficie del sensor durante 1 h. El resultado mostró que el índice de refracción no sufrió cambios, quedándose en el mismo valor obtenido tras el enlace de las bacterias al aptámero inmovilizado (33.2 RU).

En la segunda alternativa de regeneración de la superficie se estudió la aplicación de soluciones de NaOH a diferentes concentraciones (Figura 5.15).

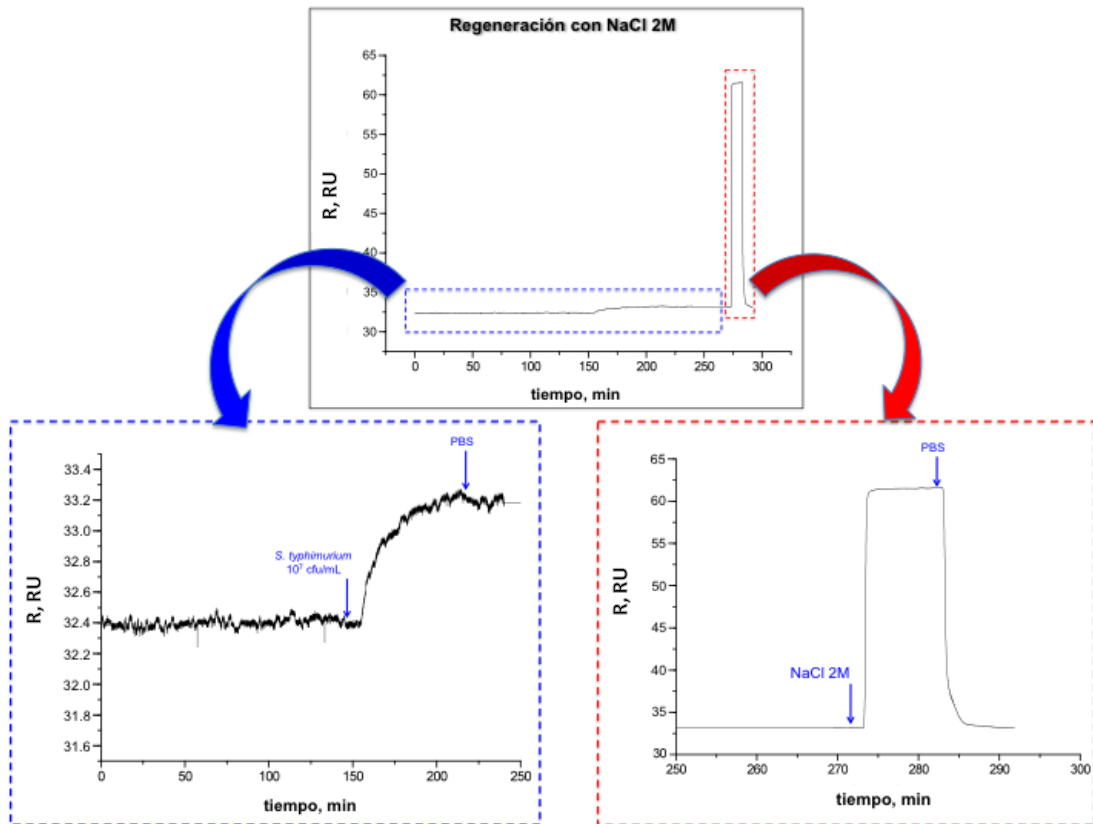


Figura 5.14. Regeneración con NaCl 2 M de la plataforma de detección. El recuadro azul muestra la ampliación de la etapa de enlace de *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL al aptámero inmovilizado. El recuadro rojo muestra la ampliación de la etapa de regeneración haciendo recircular NaCl 2M.

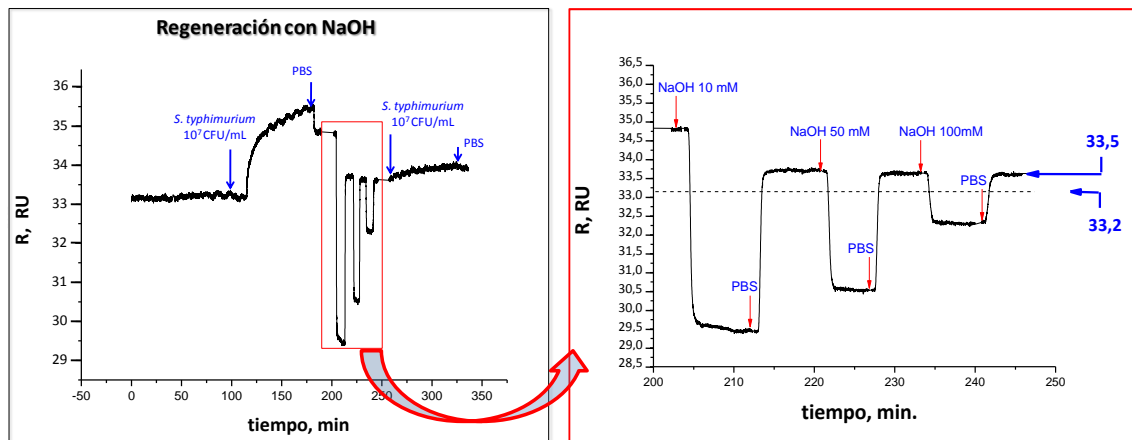


Figura 5.15. Regeneración con NaOH de la plataforma de detección. El recuadro rojo muestra la ampliación de la etapa de regeneración, haciendo recircular tres concentraciones diferentes de NaOH: 10, 50 y 100 mM durante 5 min cada una.

Después de la incubación de *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL sobre el aptámero inmovilizado durante 1 h, el incremento en el índice de refracción fue de 33.2 RU a 34.8 RU ( $\Delta R = 1.6$  RU). Con la primera solución de regeneración (NaOH 10 mM por 5 min), el valor de R alcanzó un valor de 33.6 RU. Al incrementar la concentración de NaOH a 50 y 100 mM y recircularlas durante 5 min cada una, el valor alcanzado para R fue de 33.5 RU para ambas concentraciones. Al hacer recircular una nueva solución de *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL el incremento en el índice de refracción fue de 33.6 RU a 33.9 RU ( $\Delta R = 0.3$  RU).

#### *Aptasensor electroquímico para la detección directa de bacterias mediante EIS*

Previo a la cuantificación de la bacteria mediante EIS, se realizó una caracterización por medio de CVs, con la finalidad de estudiar los cambios en la intensidad de corriente tras la inmovilización del aptámero y posteriormente tras la incubación de las bacterias.

La Figura 5.16 muestra la caracterización mediante CVs del procedimiento para la detección de *S. typhimurium*. El electrodo sin tratamiento previo es coinmovilizado con el aptámero y el mercaptohexanol, para luego realizar la incubación con *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL.

En la Tabla 5.1 se presentan los valores tanto de la intensidad de corriente como de los potenciales de los picos de oxidación y reducción, correspondientes a la Figura 5.6.

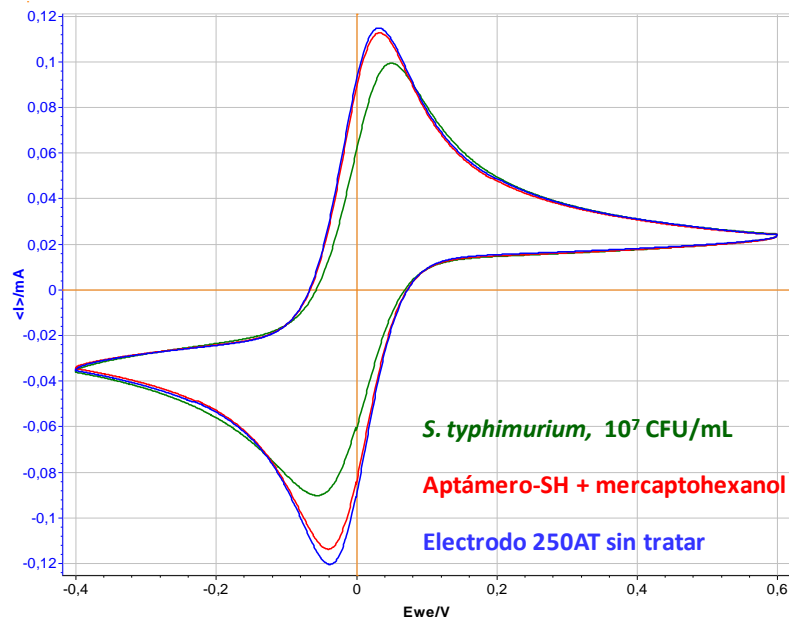


Figura 5.16. Caracterización mediante CVs de la preparación del biosensor y su uso para la detección de *S. typhimurium*. En azul se muestra el CV del electrodo sin tratamiento previo. La línea roja muestra el CV luego de haber coinmovilizado sobre el electrodo el aptámero y el mercaptohexanol. La línea verde es el resultado de la incubación con *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL. Las medidas se realizaron en una solución de ferrocianuro de potasio 2.5 mM y ferricianuro de potasio 2.5 mM en PBS a pH 7.4, a una velocidad de barrido de 100 mV/s, entre -0.4 y +0.6 V.

Tabla 5.1. Valores de la intensidad de corriente (mA) y de los potenciales (E, mV) para los picos de oxidación y reducción correspondientes a los CVs de la Figura 5.16.

	Intensidad de corriente de oxidación $\mu\text{A}$	E de oxidación mV	Intensidad de corriente de reducción $\mu\text{A}$	E de reducción mV	$\Delta E$ mV
Electrodo	115.0	31.5	-121.0	-37.5	69.0
Aptámero + MCH	113.0	33.2	-114.0	-39.9	73.1
Bacteria	99.2	50.2	-90.3	-55.8	106.0

El siguiente procedimiento caracterizado mediante CVs (Figura 5.17) fue para estudiar el control correspondiente a una muestra sin bacterias. En este procedimiento el electrodo, sin tratamiento previo, fue coinmovilizado con el aptámero y el mercaptohexanol para posteriormente realizar una incubación con una solución de PBS sin bacterias. Se presentan en la Tabla 5.2 los valores

correspondientes a la intensidad de corriente y potenciales electroquímicos de los picos obtenidos para los procesos de oxidación y reducción de la Figura 5.17.

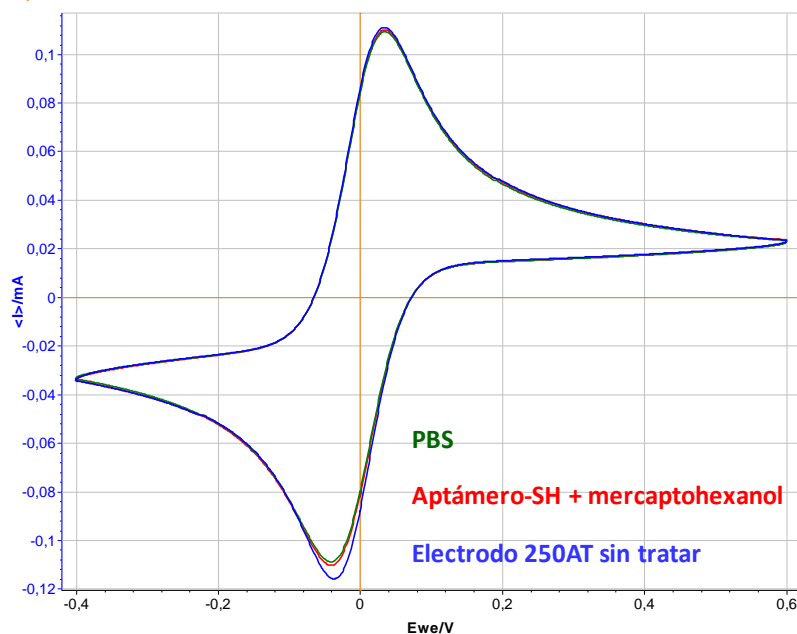


Figura 5.17. Caracterización mediante CVs de la preparación del biosensor y su uso con una muestra sin bacterias (control). En azul se muestra el CV del electrodo sin tratamiento previo. La línea roja muestra el CV luego de haber coimmobilizado sobre el electrodo el aptámero y el mercaptohexanol. La línea verde es el resultado de la incubación con una solución de PBS sin bacterias. Las medidas se realizaron en una solución de ferrocianuro de potasio 2.5 mM y ferricianuro de potasio 2.5 mM en PBS a pH 7.4, a una velocidad de barrido de 100 mV/s, entre -0.4 y +0.6 V.

Tabla 5.2. Valores de la intensidad de corriente (mA) y potenciales (E, mV) para los picos de oxidación y reducción correspondientes a los CVs de la Figura 5.17.

	Intensidad de corriente de oxidación $\mu\text{A}$	E de oxidación mV	Intensidad de corriente de reducción $\mu\text{A}$	E de reducción mV	$\Delta E$ mV
Electrodo	111.0	34.2	-116.0	-36.6	70.8
Aptámero + MCH	110.0	35.0	-110.0	-40.1	75.1
PBS	109.0	35.3	-109.0	-40.9	76.2

Para demostrar la eficacia del aptámero como elemento de reconocimiento del sensor, se estudió el comportamiento de un sensor preparado sin aptámero. En este caso el electrodo sin tratamiento previo fue modificado solo con el mercaptohexanol. Luego fue incubado con una solución de *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL (Figura 5.18).

Los valores correspondientes a la intensidad de corriente y potenciales electroquímicos de los picos obtenidos para los procesos de oxidación y reducción se presentan en la Tabla 5.3.

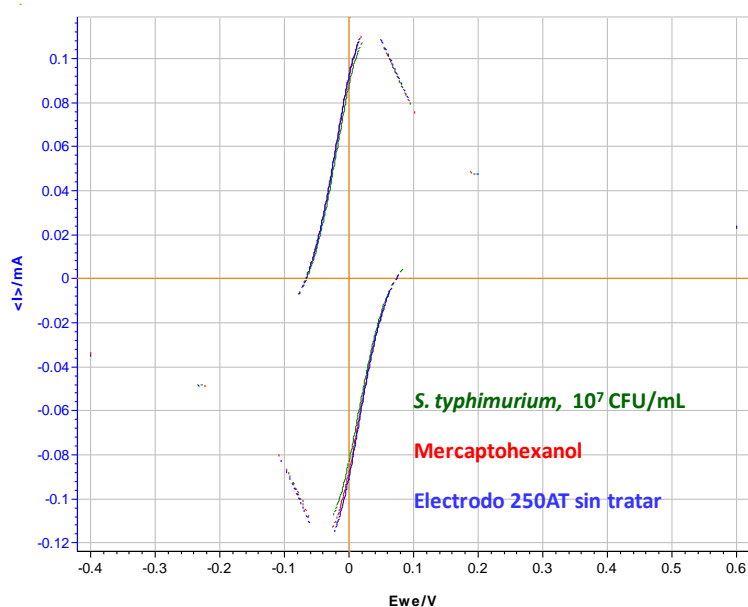


Figura 5.18. Caracterización mediante CVs de la preparación del sensor sin aptámero y su uso para la detección de *S. typhimurium*. En azul se muestra el CV del electrodo sin tratamiento previo. La línea roja muestra el CV luego de haber inmovilizado sobre el electrodo solo el mercaptohexanol. La línea verde es el resultado de la incubación con una solución de *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL. Las medidas se realizaron en una solución de ferrocianuro de potasio 2.5 mM y ferricianuro de potasio 2.5 mM en PBS a pH 7.4, a una velocidad de barrido de 100 mV/s, entre -0.4 y +0.6 V.

Tabla 5.3. Valores de la intensidad de corriente (mA) y de los potenciales (E, mV) para los picos de oxidación y reducción correspondientes a los CVs de la Figura 5.18.

	Intensidad de corriente de oxidación $\mu\text{A}$	E de oxidación mV	Intensidad de corriente de reducción $\mu\text{A}$	E de reducción mV	$\Delta E$ mV
Electrodo	114.0	30.0	-119.0	-36.0	66.0
MCH	113.0	31.2	-116.0	-37.6	68.8
Bacteria	111.0	33.5	-112.0	-39.6	73.3

Si los CVs nos permiten estudiar los cambios producidos en la superficie del electrodo mediante las variaciones generadas en la intensidad de corriente y los potenciales de los picos de oxidación y reducción, los EISs nos dan la posibilidad de cuantificar dichos cambios.

Las Figuras 5.19, 5.20 y 5.21 muestran los gráficos de Nyquist, correspondientes a los procedimientos caracterizados por los CVs de las Figuras 5.16, 5.17 y 5.18.

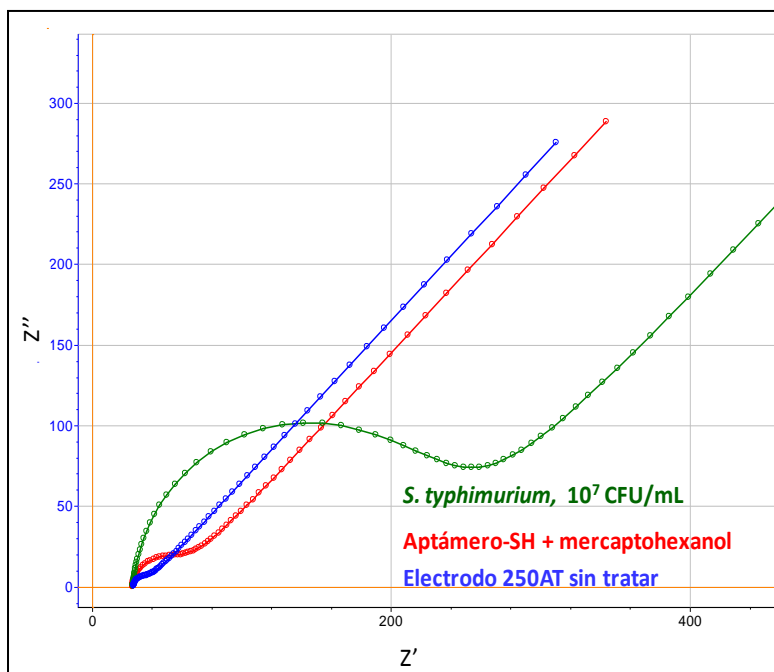


Figura 5.19. EIS para la detección de *S. typhimurium*. En azul se muestra el EIS del electrodo sin tratamiento previo. La línea roja muestra el EIS luego de haber coimmobilizado sobre el electrodo el aptámero y el mercaptohexanol. La línea verde es el resultado de la incubación con *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL. Las medidas se realizaron en una solución de ferrocianuro de potasio 2.5 mM y ferricianuro de potasio 2.5 mM en PBS a pH 7.4, entre un rango de frecuencias de 100000 Hz a 0.5 Hz, con una amplitud de 5 mV y utilizando el potencial de circuito abierto.

Todas las curvas de impedancias fueron ajustadas con el software EC-Lab de Bio-Logic, asumiendo que la configuración del circuito que modela la interfase es el circuito equivalente de Randles. El coeficiente de ajuste ( $\chi^2$ ) de las curvas de impedancia a los valores reales obtenidos fue menor a 0.1 para todos los experimentos.



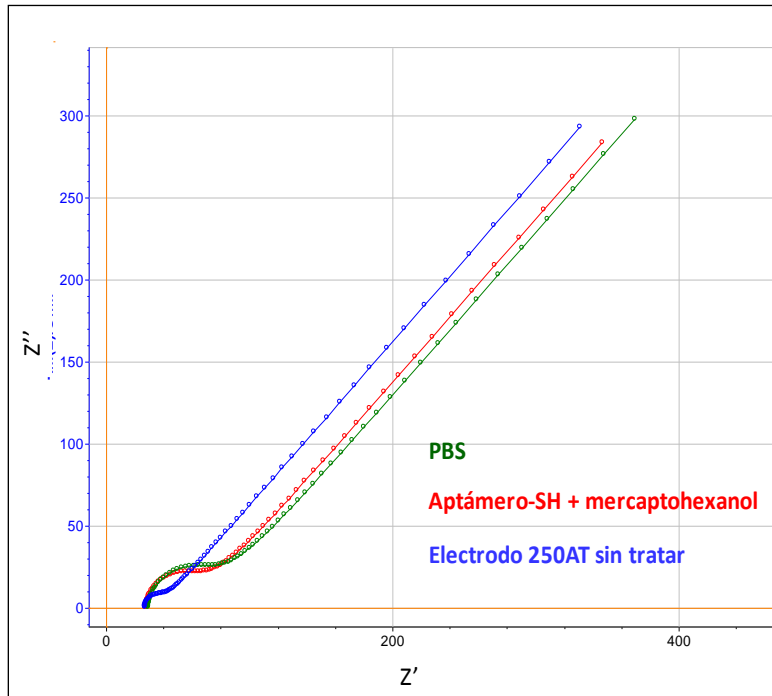


Figura 5.20. EIS para el biosensor cuando se incubó una muestra sin bacterias. En azul se muestra el EIS del electrodo sin tratamiento previo. La línea roja muestra el EIS luego de haber inmovilizado sobre el electrodo el aptámero y el mercaptohexanol. La línea verde es el resultado de la incubación con una solución de PBS sin bacterias. Las medidas se realizaron en una solución de ferrocianuro de potasio 2.5 mM y ferricianuro de potasio 2.5 mM en PBS a pH 7.4, entre un rango de frecuencias de 100000 Hz a 0.5 Hz, con una amplitud de 5 mV y utilizando el potencial de circuito abierto.

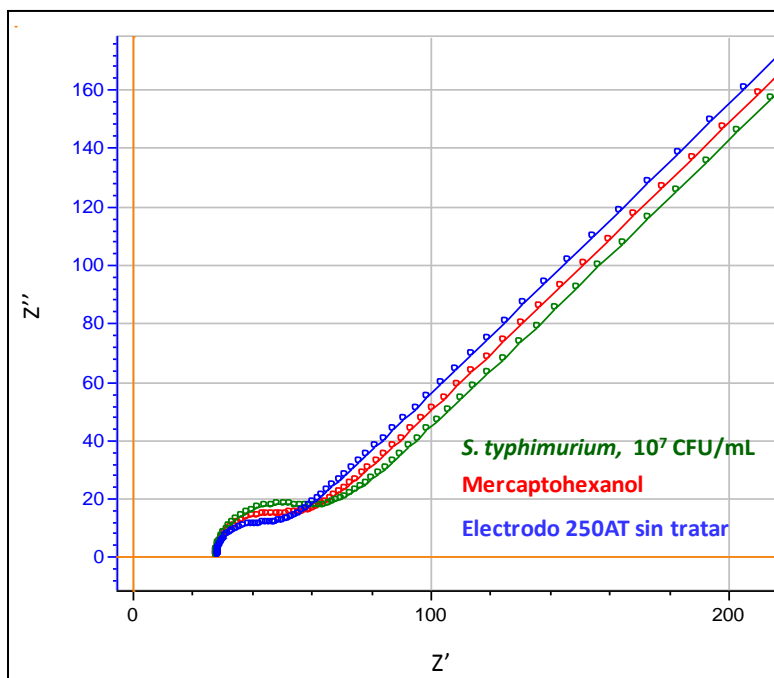


Figura 5.21. EIS para la detección de *S. typhimurium* con un electrodo modificado solo con mercaptohexanol. En azul se muestra el EIS del electrodo sin tratamiento previo. La línea roja muestra el EIS luego de haber inmovilizado sobre el electrodo solo el mercaptohexanol. La línea verde es el resultado de la incubación con una solución de *S. typhimurium* 10<sup>7</sup> CFU/mL. Las medidas se realizaron en una solución de ferrocianuro de potasio 2.5 mM y ferricianuro de potasio 2.5 mM en PBS a pH 7.4, entre un rango de frecuencias de 100000 Hz a 0.5 Hz, con una amplitud de 5 mV y utilizando el potencial de circuito abierto.

Las medidas de  $R_P$  se normalizaron (Tabla 5.4) para poder comparar diferentes experimentos y en particular experimentos con diferentes concentraciones de bacterias. Para ello se utilizó un cociente adimensional entre la resistencia a la transferencia de carga final ( $R_{Pf}$ ) y la resistencia a la transferencia de carga inicial ( $R_{Pi}$ ) de dos mediciones consecutivas llevadas a cabo con un mismo electrodo. De esta manera las medidas que se realizan en dos y más electrodos se normalizan de la forma siguiente:

$$R_P \text{ normalizada} = (R_{Pf} - R_{Pi}) / R_{Pi},$$

La  $R_P$  puede ser visualizada y calculada tras el ajuste del gráfico de Nyquist al circuito eléctrico de Randles como se explicó anteriormente (Figura 5.5).

Tabla 5.4. Valores de  $R_P$  normalizados  $((R_{Pf} - R_{Pi})/R_{Pi})$ . Los valores mostrados  $(\mu \pm \sigma)$  están determinados para un tamaño de muestra  $n = 2$ . En la columna A se observan los resultados de  $R_P$  normalizados al exponer el biosensor (electrodo funcionalizado con el aptámero) a una muestra con *S. typhimurium* de concentración  $10^7$  CFU/ mL. La columna B presenta los valores de  $R_P$  normalizados al exponer el biosensor a una muestra sin bacterias (PBS). En la columna C están los valores de  $R_P$  normalizados al exponer el electrodo, funcionalizado solo con mercaptohexanol, a una muestra con *S. typhimurium* de concentración  $10^7$  CFU/mL.

	$R_P$ normalizada $((R_{Pf} - R_{Pi})/ R_{Pi})$ , $\Omega$		
	(A)	(B) Sin bacteria	(C) Sin aptámero
Aptámero-SH	$2.6 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.6$	$0.4 \pm 0.0$
Muestra	$4.9 \pm 0.6$	$0.3 \pm 0.2$	$0.4 \pm 0.3$

Para determinar el comportamiento de este biosensor electroquímico se construyó una curva de calibrado en PBS para un rango de concentraciones entre  $10^1$  y  $10^7$  CFU/mL de *S. typhimurium*. Se obtuvo un LOD de 320 CFU/mL y el rango lineal entre  $4.2 \times 10^3$  y  $2.2 \times 10^5$  CFU/mL. Para el caso del parámetro sensibilidad, 29.6 [%/(CFU/mL)], se transformaron los datos de  $R_P$  normalizada en porcentaje de respuesta, tomando como 100% la  $R_P$  normalizada para la máxima concentración de bacterias. De esta manera podemos comparar el parámetro sensibilidad de esta estrategia con las desarrolladas en los otros capítulos. El tiempo de análisis (1 h) se debió principalmente al tiempo de incubación de la bacteria sobre el biosensor. El tiempo de la medida electroquímica fue de solo 4 min.

El LOD se calculó como  $y_b + 3\sigma_b$ , donde  $y_b$  es el valor medio y  $\sigma_b$  es la desviación estándar de los valores de señal ( $n = 2$ ) correspondientes a PBS sin bacterias (Palma, A., 2006). La sensibilidad del ensayo se obtuvo calculando la pendiente

de la parte lineal de la curva. Y el rango lineal se obtuvo mediante la recta correspondiente a la prolongación de la parte lineal, determinando los puntos de divergencia con la curva sigmoide.

Determinado el comportamiento del biosensor en PBS, se analizó el efecto de matriz debido al agua de montaña utilizada como muestra real. Para ello también se construyó una curva de calibración en dicha matriz para un rango de concentraciones de  $10^1$  a  $10^7$  CFU/mL de *S. typhimurium*. Los parámetros LOD, sensibilidad y rango lineal fueron calculados de igual forma que para el caso de las muestras de *S. typhimurium* en PBS. De esta manera se logró un LOD de 220 CFU/mL y un rango lineal entre  $3 \times 10^2$  y  $1 \times 10^5$  CFU/mL, y una sensibilidad de 30.1 [%/(CFU/mL)]. La Figura 5.22 muestra las curvas de calibración utilizando las muestras de *S. typhimurium* en PBS y en agua de montaña.

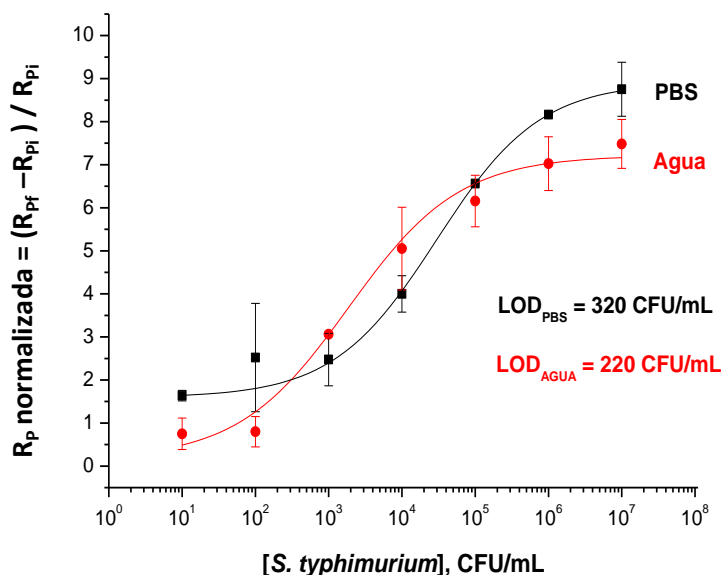


Figura 5.22. Curva de calibración para *S. typhimurium* en PBS y agua. La respuesta corresponde a la  $R_p$  normalizada, en donde  $R_{pf}$  es la resistencia a la transferencia de carga luego de la incubación con la bacteria y  $R_{pi}$  es la resistencia a la transferencia de carga después de modificar el electrodo con el aptámero y el mercaptohexanol.

La respuesta para cada concentración de bacterias se determina calculando la  $R_P$  normalizada entre la resistencia a la transferencia de carga luego de la incubación con la bacteria ( $R_{Pf}$ ) y la resistencia a la transferencia de carga después de modificar el electrodo con el aptámero y el mercaptohexanol ( $R_{Pi}$ ). Ambas curvas se ajustan a curvas de tipo sigmoideal logística con las siguientes ecuaciones: en PBS  $y = (1.59 - 8.92)/(1 + (x/(29719))^{0.62}) + 8.92$ ; en agua,  $y = (0.15 - 7.22)/(1 + (x/(1873))^{0.57}) + 7.22$

El estudio de la selectividad del biosensor se llevó a cabo ejecutando el ensayo de detección para las 7 bacterias ya analizadas previamente: *S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga, *S. sonnei*, *E. coli* k5, *B. cereus*, *P. mirabilis* y *K. lutea*, a una concentración de  $10^7$  CFU/mL. La Figura 5.23 muestra el resultado del ensayo de selectividad.

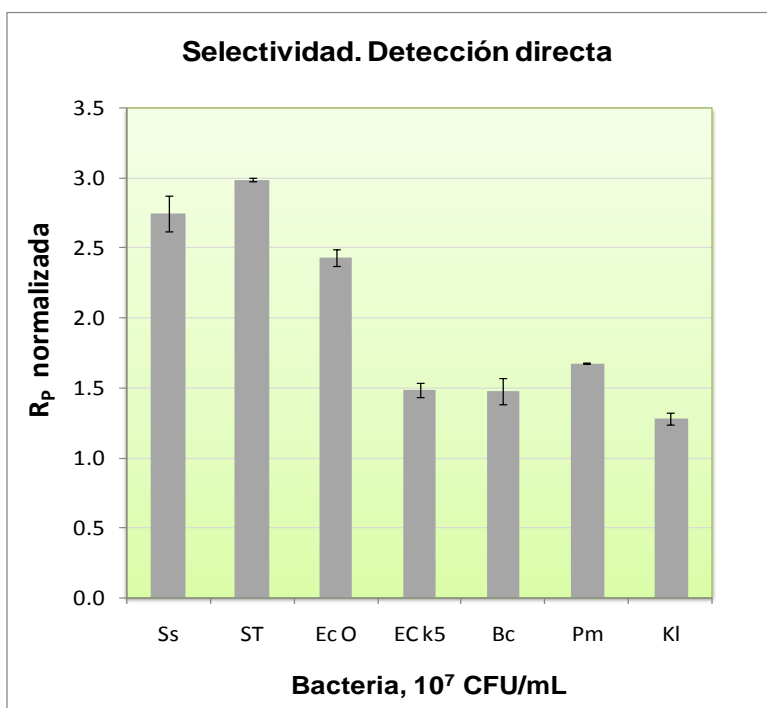


Figura 5.23. Selectividad del biosensor mediante detección electroquímica (EIS). Ss: *S. sonnei*; St: *S. typhimurium*; Ec O: *E. coli* O157 Shiga; Ec k5: *E. coli* k5; Bc: *B. cereus*; Pm: *P. mirabilis*; Kl: *K. lutea*.  $R_P$  normalizada =  $(R_{Pf} - R_{Pi})/R_{Pi}$ .

## 5.5. Discusión y conclusiones

### *Caracterización mediante SPR de la afinidad aptámero-bacteria*

Del sensograma de inmovilización del aptámero tiolado sobre el chip de oro se observó un cambio neto en el índice de refracción  $\Delta R = 2.3$  RU. Este cambio demuestra que la superficie del chip fue modificada adecuadamente con las moléculas tioladas. Significa que una SAM de las moléculas de aptámero tiolado y 6-mercaptohexanol quedó ensamblada en la superficie de oro. Para cuantificar el número de moléculas de aptámero tiolado que teóricamente quedaron enlazadas en la superficie del chip se realizaron con el equipo SPR medidas de reflectividad, barriendo el ángulo de la luz incidente entre los  $45^\circ$  y los  $70^\circ$ . De esta manera se generó una curva de reflectividad versus ángulo incidente (Figura 5.3 y 5.10). En el valor mínimo de esta curva (reflectividad aproximadamente cero) encontramos el ángulo donde ocurre la resonancia del plasmón superficial ( $\theta_{sp}$ ). El desplazamiento del ángulo de resonancia entrega una medida de un evento de unión molecular producido sobre la superficie del sensor o un cambio en el índice de refracción de un fluido próximo a la superficie del sensor.

Una revisión bibliográfica de valores de superficie cubierta ( $\Gamma$ ) obtenidos para diferentes moléculas tioladas sobre superficies de oro nos entrega una referencia respecto al valor obtenido en este trabajo ( $\Gamma_{\text{aptámero-SH}} = 1.6 \times 10^{11}$  moléculas/mm<sup>2</sup>). En un estudio de la interacción aptámero-trombina (Basnar, B., 2006), utilizando medidas de microgravimetría se estimó un valor de superficie cubierta del aptámero tiolado sobre una superficie de oro de  $6 \times 10^{12}$  moléculas/cm<sup>2</sup> ( $6 \times 10^{10}$  moléculas/mm<sup>2</sup>). En otro trabajo llevado a cabo por Demers y colaboradores (Demers, L.M., 2000) se determinaron la superficie cubierta y la eficiencia de hibridación de un oligonucleótido tiolado enlazado a una película plana de oro. Estimaron mediante un método basado en fluorescencia que el valor de superficie cubierta con el oligonucleótido tiolado sobre la película de oro fue de  $18 \pm 3$  pmol/cm<sup>2</sup> ( $(1.08 \pm 0.18) \times 10^{11}$  moléculas/mm<sup>2</sup>). Estos resultados nos indican que

nuestra estimación de la superficie cubierta por el aptámero tiolado, determinada por las medidas de SPR, está en concordancia con los valores obtenidos por otros autores.

También se determinó el porcentaje de aptámero inmovilizado sobre la superficie de oro respecto a la masa inicial. El número inicial de moléculas de aptámero ( $2 \times 10^{14}$ ) se determinó considerando el volumen utilizado de solución de aptámero (400  $\mu\text{L}$ ) y la concentración (1  $\mu\text{M}$ ) (Figura 5.20). Por otro lado en la celda de flujo el área que está en contacto con el chip de oro tiene una geometría romboide como muestra la Figura 5.21 con lo cual se calculó el área aproximada del chip de oro que está en contacto directo con la solución de aptámero tiolado.

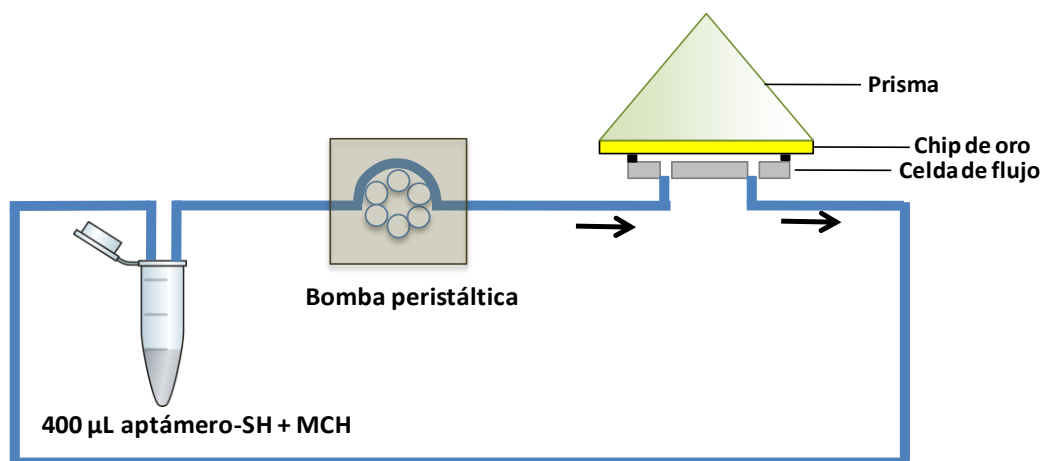


Figura 5.24. Sistema de recirculación de la solución de aptámero, inserto en el equipo de SPR. Una bomba peristáltica permite el movimiento de la solución de aptámero a través de una celda de flujo, en la cual se establece el contacto directo de la solución con la superficie de oro.

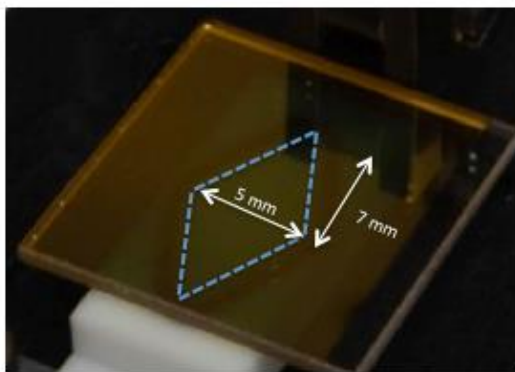


Figura 5.25. Forma geométrica de la superficie de oro disponible (determinada por la celda de flujo) para la inmovilización de las moléculas de aptámero.

El área de la zona romboide del chip es aproximadamente  $35 \text{ mm}^2$ , con lo cual el número estimado de moléculas de aptámero tiolado que quedaron inmovilizadas en la superficie del oro se calculó utilizando el valor de la superficie cubierta ( $\Gamma_{\text{aptámero-SH}}$ ). Este cálculo resultó en un valor estimado de  $5.6 \times 10^{12}$  moléculas de aptámero tiolado. Así, el porcentaje de moléculas de aptámero que se inmovilizaron en la superficie de oro fue un 3% respecto al número de moléculas iniciales. Estudios utilizando SPR han mostrado que la densidad superficial de ADN de hebra simple tiolado en un extremo, está en el orden de las  $10^{13}$  moléculas/ $\text{cm}^2$  ( $10^{11}$  moléculas/ $\text{mm}^2$ ), lo cual es aproximadamente un 10% de los sitios posibles de quimisorción sobre el oro (Georgiadis, R., 2000). Entonces el número máximo de moléculas de aptámero tiolado inmovilizadas sobre la superficie de oro no depende de la concentración inicial, aunque esta concentración sí influye en la cinética de quimisorción (Georgiadis, R., 2000).

De acuerdo a los sensogramas de enlace de las bacterias se concluye que la cantidad de bacteria *E. coli* O157 Shiga que se unió a la superficie del chip, mediante su interacción con el aptámero tiolado, fue superior respecto a *S. typhimurium*. Y en el caso de la bacteria *K. lutea*, no hubo interacción de esta con el aptámero inmovilizado sobre la superficie. Este resultado muestra que la afinidad del aptámero por *S. typhimurium* no es exclusiva de esta bacteria, sino



que también hay una afinidad del aptámero por *E. coli* O157 Shiga. Este resultado también está en concordancia con los resultados obtenidos en el capítulo 4 en donde se demostró que la afinidad del aptámero por *S. typhimurium* no es exclusiva de esta bacteria, también hay afinidad por *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei*.

El objetivo de la regeneración de la superficie tras la interacción con bacterias es la reutilización del biosensor atendiendo a criterios económicos, entre otros factores.

Dentro de los tipos de regeneración de biosensores (química, térmica o electroquímica) (Goode, J.A., 2014), se aplicaron dos alternativas de regeneración química. Primero se llevó a cabo la regeneración con una solución de NaCl 2 M, la cual afecta principalmente a la fuerza iónica de la solución óptima para mantener la interacción entre el aptámero y el analito. La otra alternativa de regeneración utilizada fue una solución de NaOH a diferentes concentraciones (10, 50 y 100 mM). Esta solución tiene por finalidad incrementar el pH de la solución para disminuir la afinidad entre el aptámero y el analito y de esta forma poder separar ambos elementos.

La regeneración de la plataforma de detección con NaCl 2 M no dió el resultado esperado. Después de hacer recircular la solución de NaCl por 10 min, el índice de refracción quedó en el mismo valor, correspondiente a las bacterias enlazadas al aptámero inmovilizado (33.2 RU). Este hecho refleja que el NaCl no fue capaz de producir el desacoplamiento entre el aptámero y las bacterias.

El ensayo de regeneración con NaOH resultó en una recuperación de la plataforma de detección, pero incompleta. El índice de refracción alcanzado al final de la regeneración fue de 33.6 RU (Figura 5.15). Sin embargo el valor del índice para la formación de la capa de aptámero tiolado inmovilizado alcanzó un valor de 33.2 RU. Se comprobó la regeneración parcial del biosensor con la inyección de

una solución de *S. typhimurium* ( $10^7$  CFU/mL), mostrando un incremento inferior en el índice de refracción (0.3 RU) comparado con el incremento del índice en la detección inicial de la bacteria (1.6 RU). Probablemente un pH básico como el de la solución de NaOH produjo una alteración en la estructura de los aptámeros, lo que condujo a una menor capacidad de unir las bacterias a la superficie. Una solución con concentración de NaOH 10 mM como la que utilizamos para la regeneración del biosensor nos da como resultado una solución de pH= 12. Los pK<sub>a</sub>s a pH fisiológico de las bases nitrogenadas guanina y timina están entre 9 y 10 (Verdolino, V., 2008), con lo cual a pHs altos (>10) aquellas bases se desprotonan. Debido a esta desprotonación, parte de los enlaces generados por los puentes de hidrógeno entre las bases complementarias GC y AT son eliminados, generando inestabilidad entre las bases. Por lo tanto, dada la naturaleza nucleotídica del aptámero y que en la configuración tridimensional adquirida por este están presentes las uniones de bases complementarias, es probable que el NaOH haya alterado la estructura tridimensional del aptámero y por consiguiente la capacidad de unión con la bacteria.

#### *Aptasensor electroquímico para la detección directa de bacterias mediante EIS*

La caracterización por medio de CVs de los procesos de formación de SAMs y de la interacción de bacterias, permitieron constatar los cambios sufridos en la superficie del electrodo. Estos cambios de la superficie se manifestaron en variaciones de las intensidades de corriente y de los potenciales de los picos de oxidación y reducción. Mientras las intensidades de corriente de oxidación y reducción disminuyeron, los potenciales electroquímicos se desplazaron, incrementándose el de oxidación y disminuyendo el de reducción y por tanto la diferencia de potencial electroquímico ( $\Delta E$ ) se incrementó. Como se observa en la Figura 5.16 y en la Tabla 5.1 las mayores variaciones se produjeron al incubar la bacteria sobre el biosensor. Este resultado está en correspondencia con el aumento de la resistencia a la transferencia de carga que supone la presencia de la bacteria sobre la superficie del electrodo. Variaciones de menor grado se pudieron

observar al formar las SAMs de aptámero y mercaptohexanol y solo mercaptohexanol sobre los electrodos. Pero al mismo tiempo fue posible observar las diferencias en las variaciones de intensidad de corriente y potenciales en uno y otro caso, con variaciones menores para el caso de la SAM con mercaptohexanol (Figura 5.18 y Tabla 5.3).

Los resultados del primer ensayo (Figura 5.19, 5.20 y 5.21) para detectar *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL mediante EIS mostraron la factibilidad de la estrategia diseñada. Los resultados de los gráficos de Nyquist mostraron un aumento de la  $R_p$  (línea roja de Figuras 5.19 y 5.21) después de haber coinmovilizado durante 5 días a 4 °C (Labib, M., 2012) el aptámero tiolado y mercaptohexanol. Un aumento de menor tamaño se observó al inmovilizar solo el mercaptohexanol (línea roja Figura 5.20). La magnitud real de estos resultados se puede ver en la Tabla 5.3, en donde la  $R_p$  normalizada para el caso del electrodo modificado solo con mercaptohexanol dio un valor ( $0.4 \pm 0.0$ ) bastante menor que el correspondiente al caso de los electrodos modificados con aptámero. Estos resultados nos demuestran la formación de una SAM sobre la superficie de oro de los electrodos. Los tiempos típicos para la formación de la SAM (12-18 h) son experimentalmente convenientes, pero para algunas aplicaciones, la formación durante varios días puede mejorar la reproducibilidad de los experimentos subsecuentes que usan la SAM, como por ejemplo en el caso de estudios de transferencia de electrones a través de SAMs (Love, J.C, 2005). La interacción de *S. typhimurium* con el aptámero inmovilizado se pudo observar claramente por el considerable incremento del semicírculo verde en la Figura 5.19 en contraposición con los ensayos en ausencia de bacteria (Figura 5.20) y en ausencia de aptámero (Figura 5.21). En la tabla 5.4 se pueden observar las diferencias cuantitativas de cada una de las  $R_p$  normalizadas. Para el biosensor incubado en solución de bacteria el valor de  $R_p$  normalizado fue de 4.9 (columna A), mientras que para el biosensor incubado en PBS sin bacteria el valor fue de 0.3 (columna B). Finalmente las medidas realizadas con el electrodo funcionalizado solamente con

mercaptohexanol, entregaron un valor de  $R_P$  normalizado de 0.4 al incubarlo con bacterias.

En relación a las curvas de calibrado (Figura 5.22), se alcanzaron valores similares para los LODs: 320 y 220 CFU/mL, para muestras de *S. typhimurium* preparadas en PBS y agua respectivamente. Por otro lado al calcular las pendientes de los segmentos lineales de ambas curvas se obtuvieron los valores de 2.3 y 2.1 ([CFU/mL]<sup>-1</sup>) para PBS y agua respectivamente. Esto implica que la sensibilidad del biosensor al cambiar de una matriz optimizada (PBS) a una matriz real como es el agua de montaña, varía levemente (de 2.3 a 2.1 [CFU/mL]<sup>-1</sup>), con una variación porcentual de 8.7%. Este valor indica que hay interferencia de algún o algunos de los componentes presentes en la muestra de agua. La muestra de agua utilizada tiene una composición (Santolaria, Z., 2015) bastante diferente respecto de la matriz optimizada, como se expuso en el capítulo 4. De acuerdo a este autor, además de los iones Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> que se encuentran en la matriz optimizada de PBS, se encuentran presentes los iones Ca<sup>+2</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Sumado a esta diferencia de composición iónica, está la diferencia de pHs entre la muestra de agua y la matriz optimizada. Ambos factores (composición iónica y pH) probablemente incidieron en las curvas de calibración, en particular en la pendiente de las curvas, acusando un efecto de matriz. Esto se tradujo en una disminución de la sensibilidad posiblemente atribuible a una menor afinidad del aptámero por la bacteria

La diferencia en los LODs no es relevante considerando las siguientes razones: el resultado final alcanzado en los LODs es producto de seguir un protocolo en donde las diluciones del cultivo, el plaqueo de las muestras y el conteo de placas luego del crecimiento, tienen una variabilidad importante (Sutton, S., 2012). Particularmente en el conteo de placas utilizamos un indicador, la CFU (Unidades Formadoras de Colonia), que es solamente un valor estimativo del número de células presentes (Sutton, S., 2012) y que por tanto valores cercanos, que ni siquiera alcanzan una diferencia de un orden de magnitud, se pueden considerar

similares. Es decir las diferencias obtenidas en los LODs para ambas matrices es muy probable que sea producto de la variabilidad inherente de los procedimientos microbiológicos (Sutton, S., 2012) y no de la composición diferente entre ambas matrices. Probablemente los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , entre otros varios iones presentes en el agua de montaña (Capítulo 4), fueron predominantes en la adopción de la estructura del aptámero, generando resultados similares entre las dos matrices.

La prueba de selectividad nos muestra la separación de los dos grupos de bacterias analizados, como son los grupos correspondientes a las bacterias enteropatógenas (*S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *Shigella sonnei*) y las no enteropatógenas (*E. coli* k5, *B. Cereus*, *P. mirabilis* y *K. lutea*). Vemos que esta alternativa de biosensor también tiene la capacidad de discriminar los dos grupos de bacterias como ya se ha visto anteriormente para la estrategia basada en el uso de partículas magnéticas y el aptámero biotinilado. De acuerdo al test estadístico t de student (APÉNDICE V.1) hay diferencias significativas de cada una de las medias de las señales de las bacterias enteropatógenas respecto a las no enteropatógenas.

## 5.6. Referencias

Basnar, B.; Elnathan, R. and Willner, I. **Following Aptamer-Thrombin Binding by Force Measurements.** Anal. Chem. 2006; 78: 3638.

Chaki, N.K.; Vijayamohanan, K. **Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor. Applications.** Biosens Bioelectron. 2002; 17: 1.

Fen, Y. W. and Yunus, W.M.M. **Surface plasmon resonance spectroscopy as an alternative for sensing heavy metal ions: a review.** Sensor Rev. 2013; 33: 305.

Frasconi, M.; Mazzei and Ferri, F. T. **Protein immobilization at gold-thiol surfaces and potential for biosensing.** Anal Bioanal Chem. 2010; 398:1545.

Georgiadis, R.; Peterlinz, K.P. and A. Peterson, W. **Quantitative Measurements and Modeling of Kinetics in Nucleic Acid Monolayer Films Using SPR Spectroscopy.** J. Am. Chem. Soc. 2000; 122: 3166.

Goode, J.A.; Rushworth, J.V. and Millner, P.A.. **Biosensor Regeneration; A review on common techniques and outcomes.** Langmuir. 2015; 31: 6267.

Green, R.J.; Frazier, R.A.; Shakeshe, K.M.; Davies, M.C.; Roberts, C.J. and Tendler, S.J.B. **Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials.** Biomaterials .2000; 21: 1823.

Labib, M.; Zamay, A.S.; Kolovskaya, O.S.; Reshetneva, I.T.; Zamay, G.S.; Kibbee, R.J.; Sattar, S.A.; Zamay, T,N. and Berezovski, M.V. **Aptamer-Based Viability Impedimetric Sensor for Bacteria.** Anal. Chem. 2012; 84: 8966.

Love, J.C.; Estroff, L.A.; Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G. and Whitesides, G.M. **Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology.** Chem. Rev. 2005; 105: 1103.

Lvovich, V.F. **Impedance Spectroscopy: Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena.** Chapter 1: Fundamentals of Electrochemical Impedance Spectroscopy. 2012 John Wiley & Sons, Inc.

Palma, A., Lapresta-Fernández, A., Ortigosa-Moreno, J.M., Fernández-Ramos, M.D., Carvajal, M.A., Capitán-Vallvey, L.F. **A simplified measurement procedure and portable electronic photometer for disposable sensors based on ionophore-chromoionophore chemistry for potassium determination.** Anal Bioanal Chem 2006; 386: 1215

Park, SM. and Yoo, JS. **Electrochemical impedance spectroscopy for better electrochemical measurement.** Analytical Chemistry. 2003; 1:455.

Parsons, R. **Electrical Double Layer: Recent Experimental and Theoretical Developments.** Chem. Rev. 1990; 90: 813.

Ramírez, N.; Regueiro, A.; Arias, O. y Contreras, R. **Espectroscopía de impedancia electroquímica, herramienta eficaz para el diagnóstico rápido microbiológico.** Biotecnología Aplicada. 2009; 26: 1.

Sípová, H. and Homola, J. **Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: A review.** Analytica Chimica Acta. 2013; 773: 9.

Sutton, S. **The Limitations of CFU: Compliance to CGMP Requires Good Science.** Journal of GXP Compliance. 2012; 16: 74

Verdolino, V. **Calculation of pKa Values of Nucleobases and the Guanine Oxidation Products Guanidinohydantoin and Spiroiminodihydantoin using Density Functional Theory and a Polarizable Continuum Model.** J Phys Chem B. 2008; 112: 16860.

Yu, F. **Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy and Surface Plasmon Diffraction in Biomolecular Interaction Studies.** Doctoral thesis. 2004. The Johannes Gutenberg University of Mainz. Germany.



## APÉNDICE V.1.

Tabla V.1. Medias y desviaciones estándar de las respuestas (%) de la prueba de selectividad para el aptasensor basado en detección directa mediante EIS.

i	Bacteria	$\bar{x}_i$	$s_i$
1	<i>Shigella sonnei</i>	2.75	0.13
2	<i>Salmonella typhimurium</i>	2.99	0.02
3	<i>E.coli</i> O157 Shiga	2.43	0.06
4	<i>E. coli</i> k5	1.48	0.05
5	<i>Bacillus cereus</i>	1.48	0.10
6	<i>Proteus mirabilis</i>	1.68	0.01
1	<i>Kocuria lutea</i>	1.28	0.04

$\bar{x}_i$ : valor medio de la señal del grupo de bacterias i;  $x_i = (R_{Pf} - R_{Pi})/R_{Pi}$ . Donde  $R_{Pf}$ :  $R_P$  final;  $R_{Pi}$ :  $R_P$  inicial;  $s_i$  desviación estándar de la señal del grupo de bacterias i.

Tabla V.2. Valores de  $s_{ij}$  del análisis estadístico t-Student en la prueba de selectividad para el aptasensor basado en detección directa mediante EIS.

S12	0.09				
S13	0.10	S23	0.04		
S14	0.10	S24	0.04	S34	0.06
S15	0.11	S25	0.07	S35	0.08
S16	0.09	S26	0.01	S36	0.04
S17	0.10	S27	0.03	S37	0.05

Tabla V.3. Valores de  $t_{ij}$  del análisis estadístico t-Student en la prueba de selectividad para el aptasensor basado en detección directa mediante EIS.

$t_{12}$	2.61				
$t_{13}$	3.14	$t_{23}$	12.75		
$t_{14}$	12.82	$t_{24}$	38.17	$t_{34}$	16.86
$t_{15}$	11.20	$t_{25}$	21.96	$t_{35}$	12.01
$t_{16}$	11.74	$t_{26}$	101.38	$t_{36}$	17.92
$t_{17}$	15.21	$t_{27}$	50.74	$t_{37}$	21.99

Tabla V.4. Valores de  $R_P$  normalizada ( $n = 2$ ) con el promedio ( $\bar{R}_{TC}$ ) y la desviación estándar ( $S_{TC}Desv$ ) para las curvas de calibrado en PBS y agua de la Figura 5.22.

CFU/mL	PBS(i)				AGUA(j)				$S_{ij}$	$t_{ij}$
	$R_{TC1}$	$R_{TC2}$	$\bar{R}_{TC}Prom$	$S_{TC}D$ esv	$R_{TC1}$	$R_{TC2}$	$\bar{R}_{TC}Prom$	$S_{TC}Desv$		
$10^1$	1.549	1.723	1.636	0.123	0.490	1.007	0.749	0.365	0.272	6.516
$10^2$	1.632	3.411	2.522	1.258	1.048	0.549	0.799	0.353	0.924	3.730
$10^3$	2.905	2.044	2.475	0.609	3.093	3.028	3.061	0.046	0.432	2.715
$10^4$	3.701	4.300	4.001	0.424	5.731	4.373	5.052	0.961	0.742	2.833
$10^5$	6.556	6.570	6.563	0.010	6.580	5.733	6.157	0.600	0.424	1.917
$10^6$	8.175	8.153	8.164	0.016	7.466	6.584	7.025	0.624	0.441	5.162
$10^7$	9.197	8.309	8.753	0.628	7.884	7.083	7.484	0.567	0.598	4.245

***CAPÍTULO 6. Estrategia de detección N° 3: Detección de bacterias enteropatógenas mediante la inhibición enzimática causada por cambio conformacional del aptámero***

## Capítulo 6. Estrategia de detección N° 3: Detección de bacterias enteropatógenas mediante la inhibición enzimática causada por cambio conformacional del aptámero.

### 6.1. Introducción

En el presente capítulo la detección de las bacterias se basó en la inhibición de la enzima fosfatasa alcalina (AP) enlazada al aptámero, causada por el cambio conformacional de este último tras su enlace con el analito (Prieto-Simón, B., 2014). El grado de inhibición enzimática y, por consiguiente, la cuantificación de las bacterias, se midió electroquímicamente como la disminución de la actividad de la enzima causada por el bloqueo del sitio activo producido por el plegamiento del aptámero.

En primer lugar se llevó a cabo la preparación del biosensor, previa al protocolo para la detección de las bacterias, que consistió en dos etapas de funcionalización. Primero se inmovilizó sobre una superficie de oro un oligonucleótido tiolado compuesto por 10 bases de adenina (oligo 10A-SH), siendo el grupo tiol el que permite la inmovilización del ssDNA mediante la formación de una capa autoensamblada (Figura 6.1).

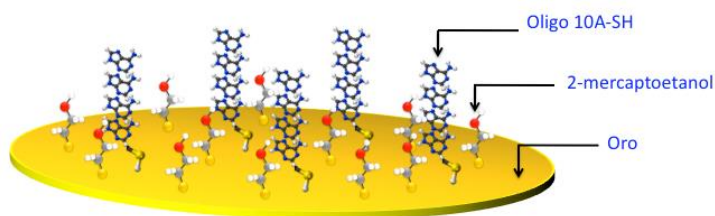


Figura 6.1. Inmovilización de moléculas de oligonucleótido tiolado (10A-SH) en una superficie de oro. Como elemento de relleno de los espacios libres de oligonucleótidos se utilizó 2-mercaptoetanol.

Luego en el segundo paso de la funcionalización, el aptámero conjugado con la enzima fosfatasa alcalina en el extremo 5' y con 10 timinas en el extremo 3' (10T-aptámero-AP) se hibridó con el oligonucleótido previamente inmovilizado sobre la superficie del electrodo de oro mediante las bases complementarias A=T (Figura 6.2).

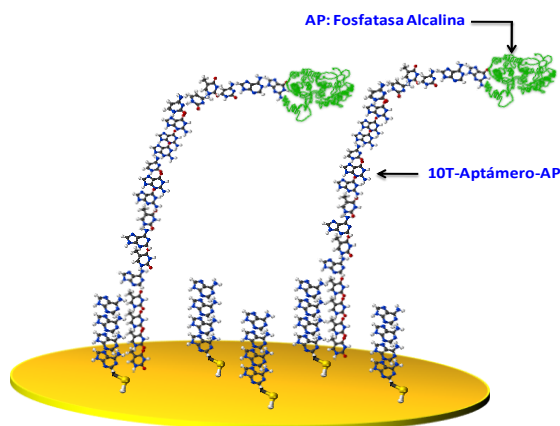


Figura 6.2. Hibridación del aptámero con el oligonucleótido inmovilizado sobre el electrodo de oro, mediante las bases nitrogenadas complementarias A=T. El aptámero está conjugado con la enzima AP.

En este punto la enzima AP se encuentra con su sitio activo expuesto, permitiendo la transformación del sustrato  $\alpha$ -naftilfosfato al producto  $\alpha$ -naftol (Ahmad, B., 2010), el cual es una molécula electroactiva cuya oxidación puede cuantificarse electroquímicamente como se muestra en la Figura 6.3.

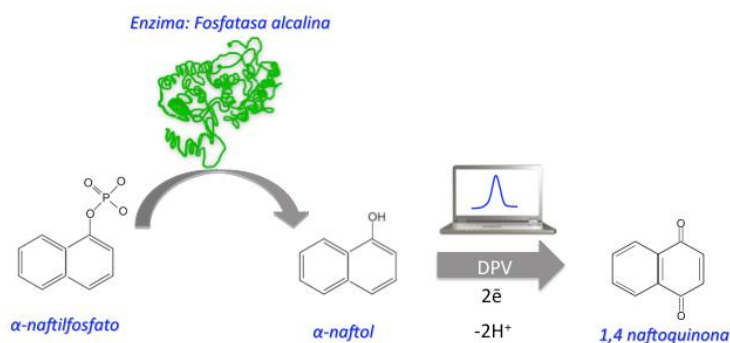


Figura 6.3. Transformación enzimática del  $\alpha$ -naftilfosfato a  $\alpha$ -naftol y posterior oxidación electroquímica (DPV: Voltametría de Pulso Diferencial) del  $\alpha$ -naftol a 1,4-naftoquinona.

Finalmente, para la detección se incubó la solución de bacterias sobre el aptasensor (Figura 6.4).

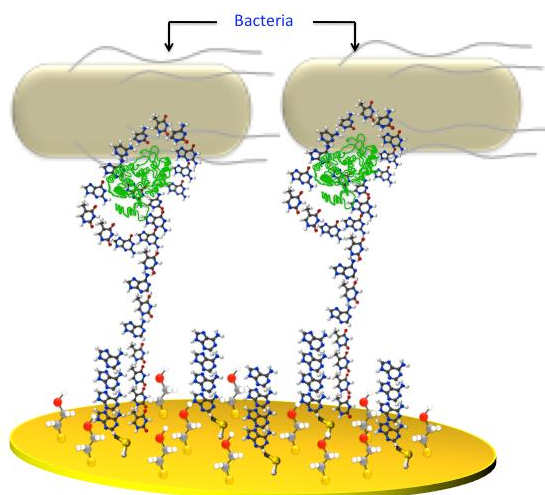


Figura 6.4. Unión bacteria-aptámero. El aptámero sufre un cambio conformacional adoptando una configuración espacial que inhibe la actividad de la enzima AP.

En esta etapa, la presencia de las bacterias induce un cambio conformacional en los aptámeros (Xiao, Y., 2005) que ocasiona que el sitio activo de la enzima no quede expuesto al sustrato. Este hecho tiene como consecuencia que no se produzca la molécula  $\alpha$ -naftol y por tanto su señal de oxidación será nula (Figura 6.5).

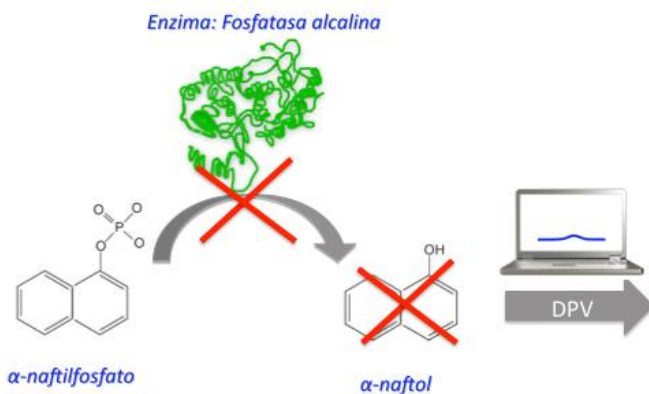


Figura 6.5. Enzima inhibida, luego de la unión del aptámero a la bacteria. La ausencia de  $\alpha$ -naftol se refleja en la nula señal de intensidad de corriente al aplicar el potencial de oxidación adecuado.

Para determinar el comportamiento de esta nueva estrategia, primero se funcionalizaron electrodos de oro serigrafiados con oligonucleótido tiolado (10A-SH) y 2-mercaptoetanol, para luego realizar la hibridación con el aptámero (AP-aptámero-10T). A continuación se construyó una curva de calibración para *S. typhimurium* mediante la cual se obtuvieron los parámetros de comportamiento (LOD, sensibilidad y rango de linealidad). Finalmente, el estudio de selectividad fue llevada a cabo con el objeto de evaluar la efectividad de esta estrategia a la hora de diferenciar el grupo de las bacterias enteropatógenas (*S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei*) de las no enteropatógenas (*E. coli* k5, *B. cereus*, *P. mirabilis* y *K. lutea*).

## 6.2. Materiales

Los reactivos 2-mercaptoetanol, tris(hidroximetil)aminometano (Tris),  $\alpha$ -naftilfosfato ( $\alpha$ -NP), dietanolamina (DEA), ácido perclórico y hidróxido de sodio fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El reactivo Reductacryl fue adquirido de Calbiochem. El aptámero 5'-AP-C<sub>6</sub>-TAT GGC GGC GTC ACC CGA CGG CTT GAC ATT ATG ACA GTT TTT TTT TT-3' y el oligonucleótido 5'-tiol-C<sub>6</sub>-AAA AAA AAA A-3' fueron comprados en DNA technology. Las bacterias *S. typhimurium* cepa SV5015, *E. coli* O157 Shiga y *E. coli* k5 fueron proporcionadas por el laboratorio Microbial biotechnology and host-pathogen interaction (IBEC,). Las bacterias *S. sonnei*, *P. mirabilis*, *B. cereus* y *K. lutea* fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología aplicada y medio ambiental (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona). Los electrodos de oro serigrafiados modelo 250AT, que incluyen el electrodo de trabajo, construido de oro, el auxiliar de platino y el de referencia de plata fueron comprados en Dropsens. Para realizar las medidas electroquímicas se utilizó un potencióstato Bio-Logic SP 150.

### 6.3. Procedimientos

#### *Preparación de los electrodos de oro y detección electroquímica de bacterias mediante DPV*

Para la preparación del aptasensor, se codepositaron sobre los electrodos de oro, en relación 1:10, 40  $\mu\text{L}$  de una solución de oligonucleótido tiolado 10A-SH (1  $\mu\text{M}$ ) y 2-mercaptoetanol (10  $\mu\text{M}$ ) en tampón Tris- $\text{ClO}_4$  20 mM y pH 8.6, específicamente sobre el electrodo de trabajo. Se dejaron los electrodos a 4  $^\circ\text{C}$  durante 5 días bajo atmósfera húmeda. Posteriormente se lavaron los electrodos con la solución de Tris $\text{ClO}_4$ , seguido de un lavado con agua Milli-Q y se secaron con flujo de  $\text{N}_2$ . Finalmente se incubaron los electrodos con 40  $\mu\text{L}$  de una solución de AP-aptámero-10T 4nM en solución tampón PBS 10 mM, pH 7.4, por 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave.

Una vez funcionalizados los electrodos, el siguiente paso fue la detección de las bacterias. Para ello se lavaron los electrodos con agua Milli Q y luego se agregaron 60  $\mu\text{L}$  del sustrato enzimático  $\alpha\text{-NP}$  a una concentración de 4 mg/mL en tampón DEA 0.1 M y pH 9.5, incubando durante un tiempo de 4 min. Se llevaron a cabo medidas de DPV a una velocidad de barrido de 0.2 V/s, entre los potenciales -0.4 a 0.5 V (potencial del pulso: 0.04 V; tiempo del pulso: 0.2 s) y la corriente de oxidación se midió a 0.25 V. Posteriormente se incubaron electrodos con 40  $\mu\text{L}$  de una solución de *S. typhimurium* a una concentración de  $10^7$  CFU/mL en PBS, o bien en PBS sin bacteria, durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Se lavaron los electrodos con la solución de PBS y posteriormente con agua Milli-Q. Nuevamente se agregaron 60  $\mu\text{L}$  del sustrato enzimático  $\alpha\text{-NP}$  y se llevaron a cabo medidas de DPV en las mismas condiciones, midiendo la corriente de oxidación a 0.25 V.

Una vez demostrada la detección de *S. typhimurium* mediante la estrategia descrita, se procedió a evaluar el aptasensor desarrollado mediante una curva de



calibrado en PBS siguiendo el protocolo previamente descrito, incubando durante 1 h los electrodos con 40  $\mu\text{L}$  de solución de *S. typhimurium* a concentraciones desde  $10^1$  a  $10^7$  CFU/mL. Para evaluar la selectividad se siguió el mismo protocolo antes mencionado incubando durante 1 h los electrodos con 40  $\mu\text{L}$  de una solución de las diferentes bacterias disponibles (*S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga, *E. coli* k5, *B. cereus*, *P. mirabilis* y *K. lutea*) a una concentración de  $10^7$  CFU/mL.

#### 6.4. Resultados

Los resultados de la detección electroquímica de *S. typhimurium* a una concentración de  $10^7$  CFU/mL mediante la inhibición enzimática causada por el cambio conformacional del aptámero tras la unión con la bacteria, se muestran en la Figura 6.6.

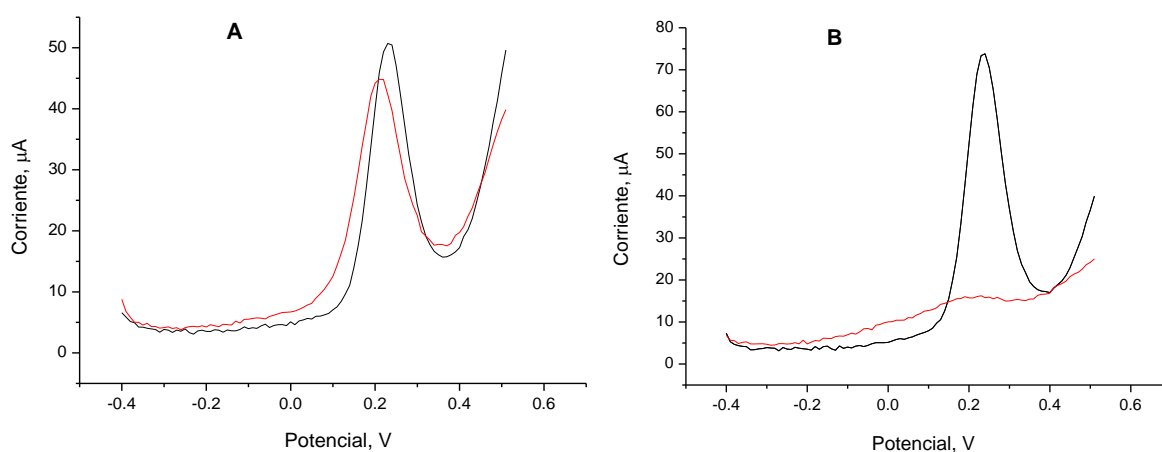


Figura 6.6. Detección electroquímica mediante DPV de *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL. (A) Muestra sin bacteria, antes (negro) y después (rojo) de incubar el aptasensor en PBS. (B) Muestra con bacteria (*S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL), antes (negro) y después (rojo) de incubar con la bacteria.

En (A) se muestran los resultados de DPV, para la muestra en ausencia de bacterias y en (B) los resultados para la muestra con *S. typhimurium*. La señal neta de cada medición se determinó como la diferencia entre las intensidades del pico de corriente antes y después de la incubación de la muestra. El cambio en

intensidad de corriente cuando el aptasensor se incubó en PBS o en una solución de *S. typhimurium*  $10^7$  CFU/mL entregó una diferencia neta de 58  $\mu$ A. Todas las medidas de DPV fueron corregidas restando los correspondientes valores en ausencia de  $\alpha$ -NP.

Se construyó una curva de calibrado en PBS, en donde el valor de la respuesta (%) para cada concentración de bacterias corresponde a un valor porcentual del valor de la señal neta para la máxima concentración de bacterias ( $10^7$  CFU/mL) (Figura 6.7). A partir de esta curva de calibración se determinaron los parámetros de comportamiento usando la misma metodología que en los capítulos anteriores.

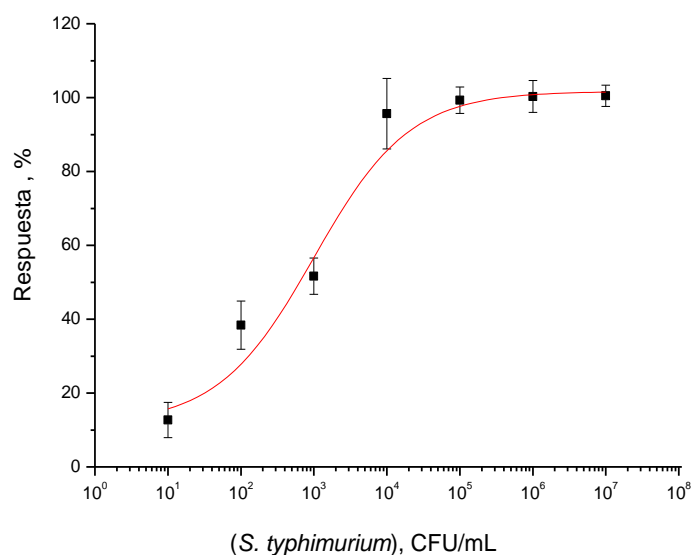


Figura 6.7. Curva de calibración para *S. typhimurium* usando el aptámero conjugado con la enzima AP. La respuesta corresponde a un valor porcentual del valor de la señal neta para la máxima concentración de bacterias. La curva se ajusta a una sigmoideal logística de ecuación:  $y = (101.7 - 11.7)/(1 + (x/(999.2))^{0.662}) + 11.7$ , con un  $R^2 = 0.985$ ,  $n = 2$ .

El LOD (570 CFU/mL) se calculó como en los capítulos anteriores, es decir  $y_b + 3\sigma_b$ , donde  $y_b$  es el valor medio y  $\sigma_b$  es la desviación estándar de los valores de señal ( $n = 2$ ) correspondientes a la muestra en PBS, sin bacteria. La sensibilidad

del ensayo ( $27\% / (\text{CFU/mL})$ ) se obtuvo calculando la pendiente de la parte lineal de la curva y el rango lineal se obtuvo intersectando en el eje x los puntos correspondiente a los límites de la linealidad, valores que se determinaron al hacer coincidir una línea recta sobre la parte lineal de la curva y determinando los puntos de divergencia de ambas curvas.. El rango lineal estuvo entre  $2 \times 10^2$  y  $4.5 \times 10^4$  [CFU/mL] y se obtuvo mediante la recta correspondiente a la prolongación de la parte lineal, determinando los puntos de divergencia con la curva sigmoide.

La selectividad del biosensor (Figura 6.8) se probó realizando el ensayo de detección con las 7 bacterias disponibles (*S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga, *S. sonnei*, *E. coli* k5, *B. cereus*, *P. mirabilis* y *K. lutea*) a una concentración de  $10^7$  CFU/mL.

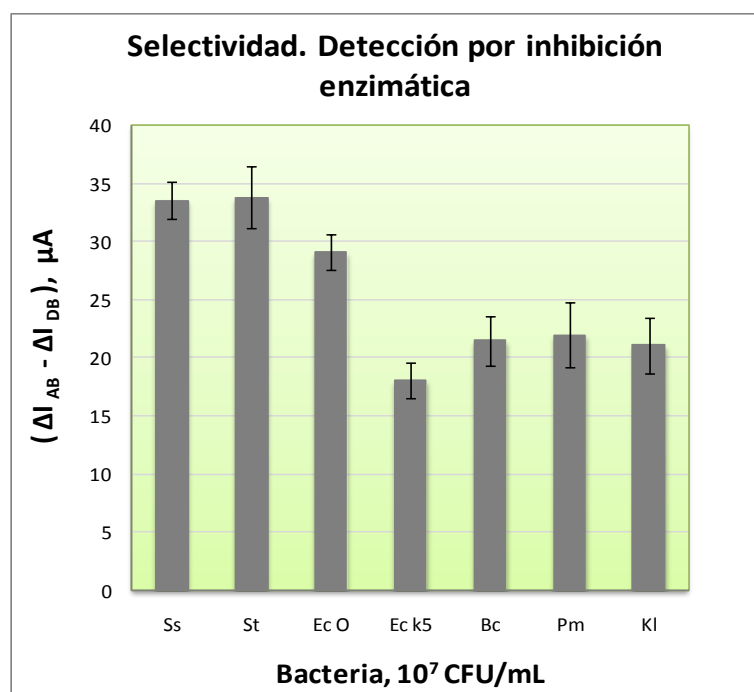


Figura 6.8. Selectividad del biosensor mediante detección electroquímica (DPV) con el aptámero marcado con la enzima AP. La respuesta corresponde a la diferencia entre la señal neta antes de incubar con la bacteria ( $\Delta I_{AB}, \mu A$ ) y la señal neta después de incubar con la bacteria ( $\Delta I_{DB}, \mu A$ ). Ss: *Shigella sonnei*; St: *S. typhimurium*; Ec O: *E. coli* O157 Shiga; Ec k5: *E. coli* k5; Bc: *B. cereus*; Pm: *P. mirabilis*; Kl: *K. lutea*.

## 6.5. Discusión y conclusiones.

La inmovilización del aptámero marcado con la enzima AP sobre la superficie de oro se realizó en forma indirecta por medio de su hibridación con el oligonucleótido tiolado 10A-SH. Esta alternativa de funcionalización del electrodo se eligió, principalmente, para evitar la inactivación de la enzima debido al procedimiento de autoensamblaje de moléculas tioladas. De esta manera se previene que la enzima esté expuesta a tiempos largos de incubación, minimizando su adsorción sobre la superficie de oro. Se evita también el contacto con soluciones tampón inapropiadas y procedimientos de lavado que podrían afectar a la actividad enzimática.

Mediante la nueva estrategia y utilizando la técnica electroquímica DPV se logró inicialmente detectar *S. typhimurium* a una concentración de  $10^7$  CFU/mL. Se obtuvo una intensidad de corriente significativa (Figura 6.6 A) para la muestra con bacterias (58  $\mu$ A), y una reducida intensidad de corriente (Figura 6.6 B) para la muestra sin bacterias (7  $\mu$ A). Estos estudios preliminares nos permiten demostrar que la estrategia planteada funciona, y por lo tanto planificar en el futuro estudios más detallados respecto al desarrollo de biosensores utilizando esta estrategia.

Para determinar los parámetros de comportamiento del nuevo aptasensor se construyó una curva de calibración ( $R^2= 0.985$ ) obteniendo un LOD de 570 CFU/mL, superior al determinado por la estrategia directa mediante EIS.

La sensibilidad del biosensor (27 [%/(CFU/mL)]) fue la más baja alcanzada respecto a las estrategias de detección directa del enlace aptámero-bacteria mediante EIS y al ensayo competitivo indirecto, mientras que el rango lineal fue igual que el obtenido para las otras estrategias, cubriendo dos órdenes de magnitud ( $2 \times 10^2 - 4.5 \times 10^4$  [CFU/mL]).

El tiempo total de análisis fue de 2 h. El tiempo total de análisis incluye, además de la incubación de la muestra, los tiempos de incubación del sustrato  $\alpha$ -NP, que corresponden a 4 min antes y después de la incubación con la solución de bacterias.

El ensayo de selectividad mostró la capacidad del sensor para discriminar entre los dos grupos de bacterias analizadas: las bacterias correspondientes a los enteropatógenos (*S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei*) y los no enteropatógenos (*E. coli* k5, *B. Cereus*, *P. mirabilis* y *K. lutea*). Se utilizó el test estadístico t de student (APÉNDICE VI.1) para comprobar la separación de los grupos de bacterias.

Comparando esta estrategia de detección con las desarrolladas en los capítulos previos se puede concluir que es un sistema de detección que implica un mayor cuidado en el tratamiento de los electrodos funcionalizados. La enzima, enlazada al aptámero, requiere no solo de condiciones físico-químicas adecuadas para el buen funcionamiento, sino también requiere la prescindencia de procedimientos agresivos como los lavados y secados de electrodos, de manera de no dañar ni la estructura terciaria ni el sitio activo de dicha enzima. Este sistema de detección si bien alcanzó un LOD más cercano a la estrategia de detección directa, requirió de un tiempo total de análisis de 2 h, el doble requerido en el sistema de detección por EIS.

## 6.6. Referencias

Ahmad, B. **Production and characterization of alkaline phosphatase from psychrophilic bacteria.** Tesis Doctoral. Department of Microbiology Quaid-i-Azam University 2010.

Prieto-Simón, B and Samitier J. **"Signal off" aptasensor based on enzyme inhibition induced by conformational switch.** Anal Chem. 2014; 86: 1437.

Xiao, Y.; Lubin, A.A.; Heeger, A.J. and Plaxco, K.W. **Label-Free Electronic Detection of Thrombin in Blood Serum by Using an Aptamer-Based Sensor.** Angew. Chem. 2005; 117: 5592.

## APÉNDICE VI.1

Tabla VI.1. Medias y desviaciones estándar de las respuestas (%) en la detección electroquímica por DPV utilizando el aptámero marcado con AP.

Nº	Bacteria	$\bar{x}_i$	$S_i$
1	<i>Shigella sonnei</i>	30,7	0.1
2	<i>Salmonella typhimurium</i>	29.2	0.5
3	<i>E.coli</i> O157 Shiga	21.6	2.9
4	<i>E. coli</i> k5	49.0	0.9
5	<i>Proteus mirabilis</i>	49.6	3.1
6	<i>Kocuria lutea</i>	52.9	0.2
7	<i>Bacillus cereus</i>	45.5	1,7

$x_i$  es la señal determinada para cada concentración de bacterias y calculada como el porcentaje remanente de actividad enzimática de la AP,  $\bar{x}_i$ : valor medio de la señal del grupo de bacterias i, y  $S_i$ : desviación estándar de la señal del grupo de bacterias i.

Tabla VI.2. Valores de  $s_{ij}$  del análisis estadístico t-Student en la prueba de selectividad en detección electroquímica por DPV utilizando el aptámero marcado con AP.

S <sub>12</sub>	0.33				
S <sub>13</sub>	2.10	S <sub>23</sub>	2.12		
S <sub>14</sub>	0.63	S <sub>24</sub>	0.70	S <sub>34</sub>	2.19
S <sub>15</sub>	2.22	S <sub>25</sub>	2.24	S <sub>35</sub>	3.05
S <sub>16</sub>	0.14	S <sub>26</sub>	0.34	S <sub>36</sub>	2.10
S <sub>17</sub>	1.18	S <sub>27</sub>	1.22	S <sub>37</sub>	2.41

Tabla VI.3. Valores de  $t_{ij}$  del análisis estadístico t-Student en la prueba de selectividad en detección electroquímica por DPV utilizando el aptámero marcado con AP.

$t_{12}$	4.86				
$t_{13}$	4.36	$t_{23}$	3.56		
$t_{14}$	28.72	$t_{24}$	28.17	$t_{34}$	12.50
$t_{15}$	8.46	$t_{25}$	9.09	$t_{35}$	9.15
$t_{16}$	153.08	$t_{26}$	70.56	$t_{36}$	14.88
$t_{17}$	12.44	$t_{27}$	13.35	$t_{37}$	9.91



## ***CAPÍTULO 7. Conclusiones generales***

## Capítulo 7. Conclusiones generales

La finalidad de esta tesis fue investigar y desarrollar aptasensores para la detección de bacterias enteropatógenas, dada la importancia de estos microorganismos en las enfermedades transmitidas por los alimentos contaminados. Se investigaron diferentes estrategias de detección, explotando fundamentalmente las propiedades únicas de los aptámeros como elementos de reconocimiento para diseñar nuevas estrategias.

Del análisis bibliográfico presentado en el capítulo 2, podemos concluir que la mayoría de los trabajos desarrollados para la detección de bacterias utilizando aptámeros, están centrados en un grupo reducido de patógenos. *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* son los tres patógenos a los cuales se hacen más referencias. Entre los trabajos científicos recopilados se puede observar la utilización de diferentes estrategias de detección. Dentro de las estrategias expuestas nos encontramos algunas que se repiten en la literatura de biosensores como la estrategia tipo sandwich, la directa y competitiva. Mayoritariamente los aptámeros seleccionados y/o utilizados en los trabajos mostrados fueron del tipo ADN con valores de constantes de disociación ( $K_D$ ) en el rango nM. También en esta recopilación observamos que los nanomateriales se utilizaron en el 60% del total de los artículos científicos presentados para mejorar el comportamiento de los sistemas de detección desarrollados. Los nanomateriales más utilizados fueron las nanopartículas de oro (GNPs), los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs), el óxido de grafeno (GO) y su derivado el óxido de grafeno reducido (RGO), y finalmente los puntos cuánticos (QDs). Estos nanomateriales se utilizaron principalmente como amplificadores y/o transductores de señal. Las técnicas de detección más utilizadas fueron las ópticas y las electroquímicas, siendo estas últimas con las cuales se alcanzaron los mejores resultados.

En el capítulo 3 se caracterizó la bacteria *S. typhimurium* SV5015, con el fin de comprobar la existencia de las proteínas de membrana a las cuales se une el aptámero: transportador ABC, OmpA y precursor OmpD. Esta comprobación se efectuó separando las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida. En el resultado de SDS-PAGE la aparición de bandas correspondientes a los pesos moleculares de estas proteínas indicaron la presencia de estas en la membrana de la bacteria. Y por otro lado el análisis de la carga eléctrica neta de la bacteria *S. typhimurium* en las condiciones físico-químicas de detección se caracterizó por medio del potencial zeta, obteniéndose un valor de -8.4 mV, el cual está dentro del rango de los valores encontrados en la bibliografía para otras bacterias.

Por otro lado la afinidad del aptámero por la bacteria *S. typhimurium* quedó demostrada en el capítulo 3, en donde se utilizaron tres técnicas para caracterizar la unión del aptámero a la bacteria. Mediante la impresión por  $\mu$ CP se logró imprimir un patrón de moléculas carboxiladas en zonas específicas de una superficie de oro. Las bacterias inmovilizadas en aquellas zonas mediante enlaces amidas fueron observadas por AFM. Finalmente utilizando estreptavidina marcada con el fluoróforo Texas Red se visualizó la unión de los aptámeros biotinilados a las bacterias usando la microscopía de fluorescencia.

En la primera estrategia de detección, desarrollada y presentada en el capítulo 4, la caracterización por SEM de las partículas magnéticas antes y después de la modificación con la bacteria control positivo permitió comprobar esta conjugación. La aplicación de un ensayo competitivo indirecto utilizando el aptámero biotinilado permitió detectar *S. typhimurium* viva, lográndose la detección colorimétrica tras la incubación con estreptavidina-HRP, mientras que la detección electroquímica se realizó tras la incubación con neutravidina-AP. La absorbancia de la solución y la intensidad de corriente medidas fueron inversamente proporcionales a la concentración de bacterias. A través de las curvas de calibración se determinaron los parámetros de comportamiento de los dos sistemas (electroquímico y colorimétrico), dando como resultado una mejora en los parámetros de

comportamiento con el ensayo electroquímico. Se redujo el LOD de  $2.5 \times 10^4$  a  $3 \times 10^3$  CFU/mL, mientras que la sensibilidad se incrementó en un 40% aproximadamente (de 42 a 58 [%/(CFU/mL)]). Por otro lado el tiempo total de detección se redujo en 1 h (de 3.5 a 2.5 h). Con estos resultados se demuestran las ventajas de la detección electroquímica por sobre la colorimétrica. Principalmente se reduce el LOD y se incrementa la sensibilidad.

Tanto la conjugación de las partículas magnéticas con *S. typhimurium* control positivo, como las condiciones de unión entre el aptámero y *S. typhimurium* (vivas) fueron optimizadas. Los resultados mostraron que las mejores condiciones para el ensayo competitivo son las proporcionadas con una solución de PBS 10 mM, pH 7.4 con 2.7 mM NaCl y 137 mM KCl, una concentración de aptámero de 4 nM y un tiempo de incubación de 1 h.

El análisis de selectividad llevado a cabo tanto con la detección colorimétrica como electroquímica demostraron que el aptámero no solo tiene afinidad por *S. typhimurium*, también lo tiene por *E. coli* O157 Shiga y *Shigella sonnei*. Los dos sistemas de detección discriminaron estas tres bacterias enteropatógenas de los microorganismos no enteropatógenos: *E. coli* k5, *P. mirabilis*, *B. cereus* y *K. lutea* (*M. luteus*).

Estos resultados muestran que existe reactividad cruzada entre las bacterias *S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *Shigella sonnei*, es decir que este aptámero no sólo tiene afinidad por las proteínas dianas de *S. typhimurium*, sino también por las proteínas análogas u otras de las cepas de *E. coli* O157 Shiga y *S. soneii*. Probablemente la causa de esta detección “triple” se debió a que las proteínas diana de este aptámero en estas bacterias tengan una similitud en cuanto a secuencia y conformación. Para poder corroborar en forma aproximada la hipótesis anterior se realizó una búsqueda, mediante la base de datos UniProt, de la existencia de proteínas análogas a las proteínas diana (transportador ABC, OmpA y OmpD) de *S. typhimurium* en las otras bacterias. Luego se realizó el

alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes a las proteínas equivalentes de las bacterias involucradas en el ensayo de selectividad por medio del programa informático BLAST. Los resultados nos muestran que el porcentaje de identidad de las proteínas diana de *S. typhimurium* con las análogas de *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei* es superior con respecto al obtenido para las otras bacterias. Esta información nos ayuda a entender de alguna manera nuestros resultados respecto a la reactividad cruzada entre las bacterias *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7 y *S. sonnei*. Aunque es una información valiosa que apoya nuestros resultados, los factores que influyen en la unión del aptámero a las proteínas diana, desde el punto de vista del sitio de unión, van más allá de una secuencia de aminoácidos determinada. La estructura tridimensional que presenta la proteína en la membrana celular, las moléculas y la variedad de estructuras que están presentes en la membrana, son factores que probablemente afectan al sitio de unión del aptámero.

Con los resultados de las curvas de calibración para *S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei*, mediante detección electroquímica y utilizando la estrategia de detección con partículas magnéticas, se concluye que en general con la detección electroquímica se lograron mejores parámetros de comportamiento frente a *S. typhimurium* (LOD =  $3 \times 10^3$  CFU/mL, sensibilidad = 58 [%/(CFU/mL)]), en desmedro de *E. coli* O157 (LOD =  $3.5 \times 10^5$  CFU/mL, sensibilidad = 38.9 [%/(CFU/mL)]) y *S. sonnei* (LOD =  $2 \times 10^5$  CFU/mL, sensibilidad = 26.1 [%/(CFU/mL)]).

En la estrategia de detección directa (capítulo 5), el aptámero tiolado se inmovilizó por quimisorción sobre una superficie de oro, para permitir la captura directa de la bacteria diana. La caracterización por SPR de la SAM formada por la inmovilización del aptámero tiolado entregó como resultado un incremento en el índice de refracción (2.3 RU) en la cinética de inmovilización, demostrando que la superficie de oro quedó cubierta con las moléculas tioladas. El cambio en la superficie de oro debido a la inmovilización de las moléculas también se vió

reflejado en el cambio del ángulo de resonancia, el cual nos permitió estimar la concentración superficial del aptámero tiolado ( $1.6 \times 10^{11}$  moléculas/mm<sup>2</sup>).

Se estudió el grado de afinidad del aptámero por las bacterias *S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *K. lutea*, mediante las cinéticas de inmovilización. La idea fue estudiar el comportamiento del aptámero frente a tres bacterias. Dos de ellas muy similares (*S. typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga) por cuanto ambas pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, son Gram negativas, de morfología bacilar y muy cercanas desde el punto de vista filogenético. La tercera bacteria (*K. lutea*) es diferente, pertenece a la familia Micrococcaceae, es Gram positiva, de morfología cocoide, y alejada filogenéticamente de las bacterias anteriores. Los resultados nos demostraron que la afinidad del aptámero por *S. typhimurium* no es exclusiva de esta bacteria, también existe una alta afinidad por *E. coli*, dado los resultados obtenidos en los sensogramas para ambas bacterias. El incremento en el índice de refracción para *S. typhimurium* y *E. coli* fue de 1.6 y 4.7 RU respectivamente. Y en el caso de *K. lutea* el incremento en el índice de refracción fue nulo. Estos resultados confirman la afinidad del aptámero por *S. typhimurium*, pero también por *E. coli*, siendo mayor para ésta última. Por el contrario, no hay afinidad del aptámero por *K. lutea*.

La regeneración de la plataforma de detección se llevó a cabo mediante el uso de dos métodos químicos. La regeneración de la plataforma de detección con NaCl 2 M no dió el resultado esperado, reflejando que el NaCl no fue capaz de interferir en la interacción del aptámero con las bacterias, debido a que no alteró suficientemente la fuerza iónica de la solución que mantiene unidos el aptámero y el analito. El ensayo de regeneración con NaOH resultó en una recuperación incompleta de la plataforma de detección. Probablemente un pH básico como el de la solución de NaOH produjo una alteración en la estructura de los aptámeros, lo que condujo a una menor capacidad de unir las bacterias a la superficie y por tanto a una regeneración parcial.

La detección directa mediante electroquímica se realizó usando electrodos serigrafados de oro en los cuales se inmovilizaron los aptámero tiolados. Por medio de EIS se logró detectar *S. typhimurium* y construir curvas de calibración en PBS y en muestra de agua proveniente de la montaña para analizar el comportamiento del nuevo biosensor. La caracterización por medio de CVs de los procesos de formación de SAMs y de la interacción de bacterias, permitieron constatar las modificaciones de la superficie del electrodo. Estas modificaciones de la superficie se manifestaron en variaciones de la intensidad de corriente y del potencial de los picos de oxidación y reducción. Las mayores variaciones se produjeron al incubar la bacteria sobre el biosensor, resultado que está en concordancia con el aumento de la resistencia a la transferencia de carga que supone la presencia de la bacteria sobre la superficie del electrodo.

Los resultados de las curvas de calibración para la detección directa de *S. typhimurium* en PBS y en la muestra de agua mostraron valores similares para los LODs: 320 y 220 CFU/mL respectivamente. Por otro lado el resultado de las pendientes de los segmentos lineales de ambas curvas mostraron valores de 29.6 y 30.1 [%/(CFU/mL)] para PBS y agua respectivamente. Esto implica que la variabilidad en la sensibilidad del biosensor al cambiar de una matriz optimizada (PBS) a una matriz real como es el agua de montaña es insignificante. Este valor indica que no hay interferencia de los componentes presentes en la muestra de agua.. La diferencia en los LODs no es relevante considerando las siguientes razones: el resultado final alcanzado en los LODs es producto de seguir un protocolo en donde las diluciones del cultivo, el plaqueo de las muestras y el conteo de placas luego del crecimiento, tienen una variabilidad importante.

El tiempo de análisis de la estrategia de detección directa fue de 1 h, lo que implica una reducción considerable respecto a la estrategia utilizando las partículas magnéticas. El ensayo de selectividad utilizando la estrategia de detección directa demostró una vez más la diferenciación entre los dos grupos de bacterias utilizadas.

En la estrategia basada en la inhibición de la enzima AP causada por el cambio conformacional del aptámero tras su enlace con la bacteria, los resultados mostraron un progresivo descenso de la intensidad de corriente asociada a la actividad enzimática de la enzima AP antes y después de la incubación de *S. typhimurium* a medida que se incrementaba la concentración de la bacteria. La curva de calibración construida en una matriz de PBS, con un comportamiento sigmoideal, permitió determinar los parámetros de comportamiento del biosensor. El LOD logrado con este biosensor fue de 570 CFU/mL, mientras que el valor de sensibilidad fue de 27 [%/(CFU/mL)] y el tiempo de análisis de 2 h.. El ensayo de selectividad realizado con esta nueva estrategia mostró una vez más diferencias significativas entre el grupo de los enteropatógenos y los no enteropatógenos.

Comparando esta estrategia de detección con las previamente desarrolladas se puede concluir que es un sistema de detección que implica un mayor cuidado en el tratamiento de los electrodos funcionalizados. La enzima, enlazada al aptámero, requiere no solo de condiciones físico-químicas adecuadas para el buen funcionamiento, sino también requiere la prescindencia de procedimientos agresivos como los lavados y secados de electrodos, de manera de no dañar ni la estructura terciaria ni el sitio activo de dicha enzima. Este sistema de detección requirió de un tiempo total de análisis de 2 h, el doble del requerido en el sistema de detección directa por EIS.

Comparando las tres estrategias desarrolladas podemos concluir que desde el punto de vista de la facilidad en la construcción, el tiempo de detección y los parámetros de comportamiento, el sistema de detección directa fue el más adecuado.

El aptámero utilizado en el presente trabajo fue seleccionado para *S. typhimurium* (cepa PT10), y específicamente para las proteínas de membrana: transportador ABC, OmpA y precursor OmpD. Sin embargo quedó demostrado a lo largo de este trabajo la existencia de una reactividad cruzada entre los patógenos *S.*



*typhimurium*, *E. coli* O157 Shiga y *S. sonnei*. Esta reactividad cruzada impidió que los biosensores desarrollados detectaran exclusivamente *S. typhimurium*. Sin embargo, la capacidad de detectar los tres enteropatógenos es una gran ventaja, dado que la presencia de cualquiera de estos tres microorganismos en una muestra de alimentos traería como consecuencias enfermedades gastrointestinales.