

Detección rápida de *Staphylococcus aureus* usando un biosensor electroquímico basado en electrodos serigrafiados de oro modificados con cisteína y peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*).

Paula Andrea Guarín Guio

Trabajo de Grado para Optar el título de Química

Director

John Jairo Castillo León

Ph. D. en Química

Co-director

Hermínul de Jesús Cano Calle

Ph. D. en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2020

**Tabla de Contenido**

	Pág.
Introducción .....	13
1. Objetivos.....	15
1.1 Objetivo General.....	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
3. Cuerpo del Trabajo .....	15
3.1 Marco teórico.....	15
3.1.1 Biosensores.....	15
3.1.1.1 Clasificación de los biosensores .....	16
3.1.2 Biosensores con enzimas.....	18
3.1.3 Peroxidasas.....	19
3.1.4 Peroxidasa de pasto guinea .....	21
3.1.5 Monocapas autoensambladas.....	23
3.1.6 Bacterias patógenas.....	25
3.1.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
3.1.7 Biosensores electroquímicos para la detección de bacterias patógenas.....	29
3.1.8 Técnicas electroquímicas para el estudio de biosensores .....	31
3.1.8.1 Voltamperometría ciclica.....	31
3.2 Metodología .....	33
3.2.1 Extracción y semipurificación de PPG .....	33
3.2.1.1 Extracción .....	34
3.2.1.2 Eliminación de pigmentos.....	34

3.2.1.3 Cromatografía por exclusión de tamaño .....	35
3.2.1.4 Ultrafiltración.....	35
3.2.1.5 Determinación de actividad enzimática .....	35
3.2.1.6 Determinación de proteínas por el método de Bradford.....	36
3.2.2 Modificación de la superficie de los electrodos de oro.....	36
3.2.3 Caracterización electroquímica de los electrodos modificados .....	37
3.2.3.1 Caracterización electroquímica de los electrodos por voltamperometría ciclica usando ferrocianuro de potasio como electrolito .....	37
3.2.3.2 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la respuesta enzimática del electrodo por voltamperometría cíclica.....	37
3.2.3.3 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peroxido de hidrógeno por voltamperometría cíclica .....	38
3.2.4 Evaluación analítica del biosensor en soluciones de <i>S. aureus</i> y en muestras de alimentos contaminados .....	38
3.2.4.1 Preparación de los cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	38
3.2.4.1.1 Caja de repique de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 .....	38
3.2.4.1.2 Preinoculo .....	39
3.2.4.1.3 Diluciones seriadas .....	39
3.2.4.1.4 Siembra por micro-dilución .....	39
3.2.4.2 Monitoreo electroquímico del consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por el <i>Staphylococcus aureus</i> en cultivos y muestras de alimentos contaminados.....	40
3.2.4.2.1 Monitoreo electroquímico del consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en soluciones de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	40

3.2.4.2.1.1 Determinación de los parámetros analíticos.....40

3.2.4.2.2 Monitoreo electroquímico del consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la bacteria *Escherichia coli* como experimento de control .....41

3.2.4.2.3 Monitoreo electroquímico del consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por el *Staphylococcus aureus* en una muestra de leche comercial.....42

3.3 Análisis y discusión de resultados .....43

3.3.1 Extracción y semipurificación de PPG .....43

3.3.2 Modificación de la superficie de los electrodos.....44

3.3.3 Caracterización por métodos electroquímicos.....45

3.3.3.1 Caracterización de los electrodos por voltamperometría cíclica usando ferrocianuro de potasio como electrolito.....46

3.3.3.2 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la respuesta enzimática del electrodo por voltamperometría cíclica.....49

3.3.3.3 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno por voltamperometría cíclica .....50

3.3.4 Evaluación analítica del biosensor en soluciones de *S. aureus* y en muestras de alimentos contaminados .....52

3.3.4.1 Monitoreo electroquímico del consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivos de *Staphylococcus aureus* .....52

3.3.4.1.1 Determinación de los parámetros analíticos.....54

3.3.4.2 Monitoreo electroquímico del consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la bacteria *Escherichia coli* como experimento de control .....55

3.3.4.3 Monitoreo electroquímico del consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por el *Staphylococcus aureus* en una muestra de leche comercial .....56

4. Conclusiones .....59

5. Recomendaciones .....60

Referencias Bibliográficas .....61

**Lista de Tablas**

Tabla 1. Características de las distintas clases de peroxidasa de plantas.....20

Tabla 2. Determinantes de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*.....27

Tabla 3. Algunos biosensores para la detección de *S. aureus* reportados.....30

Tabla 4. Etapas de extracción y semipurificación de la PPG.....44

Tabla 5. Diferencia de potencial y relación de corriente entre los picos de oxidación y reducción de los electrodos estudiados.....48

**Lista de Figuras**

Figura 1. Configuración de un biosensor.....16

Figura 2. Fotografía de pasto guinea (*Panicum maximun*).....22

Figura 3. Partes de las monocapas autoensambladas.....24

Figura 4. Micrografía SEM de colonias de *S. aureus*. Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library.....25

Figura 5. Estructura de la pared celular de bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus*.....26

Figura 6. Esquema voltamperograma cíclico de una reacción reversible.....32

Figura 7. Proceso de extracción y semipurificación de PPG, paso a paso.....34

Figura 8. Modificación de los electrodos serigrafiados de oro con el bioconjugado Cys-PPG.....37

Figura 9. Selección de placas para recuentos de unidades formadoras de colonias.....40

Figura 10. Montaje de las mediciones electroquímicas en las muestras de leche contaminadas con *S. aureus* y sin contaminar.....42

Figura 11. Actividad volumétrica de las fracciones recolectadas en la etapa de cromatografía por exclusión de tamaño.....43

Figura 12. Modificación de la superficie del electrodo serigrafiado de oro por el bioconjugado Cys/PPG.....45

Figura 13. Montaje experimental de las mediciones electroquímicas realizadas.....46

Figura 14. Electrodos sin modificar (Au), modificado con cisteína (Au/Cys) y modificado con el bioconjugado cisteína – peroxidasa (Au/Cys/PPG).....47

Figura 15. CVs de los electrodos modificados con cisteína y peroxidasa (Au/Cys/PPG) sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (azul) y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5mM (morado).....50

Figura 16. CVs de los electrodos modificados con cisteína y PPG en solución PBS 30mM con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3Mm a diferentes velocidades de barrido.....51

Figura 17. Diagrama de picos de corrientes catódicas y anódicas versus la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.....52

Figura 18. Voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados (Au/CysPPG) en buffer fosfato 30mM pH 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM para concentraciones de *S. aureus* de 0 hasta 3x10<sup>8</sup> UFC/mL.....53

Figura 19. Respuesta del electrodo modificado a las soluciones de *S. aureus* a diferentes concentraciones (UFC/mL) a un potencial fijo de -810 mV.....54

Figura 20. VCs de los electrodos serigrafados de oro modificados en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. Comparación de la corriente bioelectrocatalítica de los electrodos modificados. Velocidad de barrido 50mV/s.....55

Figura 21. Voltamperogramas cíclicos del electrodo modificado Cys/PPG en muestras de leche comercial. Los análisis se llevaron a cabo a una concentración de *S. aureus* 3x10<sup>4</sup> UFC/mL.....58

## Resumen

**TITULO:** Detección rápida de *Staphylococcus aureus* usando un biosensor electroquímico basado en electrodos serigrafiados de oro modificados con cisteína y peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*).\*

**AUTOR:** Paula Andrea Guarin Guio\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Biosensor, peroxidasa de pasto guinea, cisteína, voltamperometría ciclica, *Staphylococcus aureus*.

### DESCRIPCIÓN:

La presencia de bacterias patógenas en alimentos y/o aguas de consumo humano representan un problema de salud pública a nivel mundial debido al elevado número de muertes que causa al año. Existe un enorme interés en el desarrollo de metodologías analíticas novedosas y confiables que permitan llevar a cabo diagnósticos rápidos, in situ y confiables como los biosensores electroquímicos. En este trabajo se presenta un biosensor para la determinación rápida de *Staphylococcus aureus* mediante el consumo de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por parte de las catalasas presentes en *S. aureus* y detectado por electrodos de oro modificados con peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*).

El trabajo se desarrolló en cuatro etapas: la primera consistió en la extracción y semipurificación de la enzima donde se obtuvo un extracto con actividad volumétrica de 470 U/mL. La segunda etapa consistió en la inmovilización del extracto enzimático sobre electrodos serigrafiados de oro usando cisteína como agente entrecruzante. En la tercera etapa se realizó la caracterización de los electrodos modificados mediante voltamperometría cíclica. Finalmente, en la cuarta etapa se evaluó la respuesta del biosensor enzimático en diferentes concentraciones de *S. aureus* presentando una relación lineal entre la corriente y la concentración de bacterias en un intervalo de  $3 \times 10^2$ - $3 \times 10^8$  UFC/mL a un potencial de trabajo de -810mV. Además, fue posible detectar la presencia de la bacteria en muestras de leche comercial contaminadas con el microorganismo. Esto indica que el biosensor fabricado puede convertirse en una potencial herramienta analítica para la detección rápida de bacterias en alimentos.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de ciencias, Escuela de Química, Director: John Jairo Castillo León, Doctor en Química.

### Abstract

**TITTLE:** Rapid detection of *Staphylococcus aureus* using an electrochemical biosensor based on gold screen-printed electrodes modified with cysteine and guinea grass peroxidase (*Panicum maximum*).

**AUTHOR:** Paula Andrea Guarin Guio \*\*

**KEY WORDS:** Biosensor, guinea grass peroxidase, cysteine, cyclic voltammetry, *Staphylococcus aureus*.

### DESCRIPTION:

The presence of pathogenic bacteria in food and/or water for human consumption represents a public health problem worldwide due to the high number of deaths it causes per year. There is an enormous interest in the development of innovative and reliable analytical methodologies that allow fast, in situ and reliable diagnoses such as electrochemical biosensors. This paper presents a biosensor for rapid detection of *Staphylococcus aureus* by the consumption of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) by catalase present in *S. aureus* and detected by gold electrodes modified with guinea grass peroxidase (*Panicum maximum*).

This study was developed in four stages: the first was the extraction and semi-purification of the enzyme, obtaining an extract with volumetric activity of 470 U/mL. The second stage consisted of the immobilization of the enzymatic extract on the surface of gold electrodes using cysteine as a crosslinking agent. The third stage was the characterization of the modified electrodes by cyclic voltammetry. Finally, in the fourth stage the response of the enzymatic biosensor in different concentrations of *S. aureus* was evaluated presenting a linear relationship between the current signal and the bacteria concentration in a range of  $3 \times 10^2$ - $3 \times 10^8$  CFU/mL at a working potential of -810mV. In addition, it was possible to detect the presence of the bacteria in commercial milk samples contaminated with the microorganism. This indicates this biosensor can become a potential analytical tool for the rapid detection of bacteria in food.

---

\* Grade project

\*\* Faculty of Ssciences, School of Chemistry, Manager: John Jairo Castillo León, Doctor of Chemistry

## Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se manifiestan de forma súbita y son causadas por la ingestión de alimentos o bebidas contaminados con microorganismos patógenos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor en forma individual o colectiva (Flores *et al.*, 2005). Se caracterizan por una variedad de síntomas gastrointestinales, como náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal y fiebre; en algunos casos se pueden presentar complicaciones severas, como sepsis, meningitis, abortos, síndrome de Reiter o la muerte (Soto *et al.*, 2016). El crecimiento progresivo en los últimos años de las ETA producidas por bacterias patógenas constituye un importante problema de salud pública debido a la aparición de nuevas formas de transmisión, el aumento de la resistencia de los organismos patógenos a compuestos antimicrobianos y la aparición de grupos poblacionales vulnerables, lo que es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos y se ha demostrado que se pueden contaminar durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada pues algunos de estos microorganismos constituyen parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado (Abushelaibi *et al.*, 2003)

En Colombia, según la información registrada en el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) durante el año 2016 se presentaron 668 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, 859 brotes en 2017 y en 2018 se registraron 881 brotes con 11502 casos de personas con intoxicación alimentaria (Dirección de vigilancia y análisis de riesgo en salud pública, 2018). Lo que ha generado la necesidad de desarrollar nuevos métodos de detección más rápidos, sensibles y específicos que los usados tradicionalmente para aislar e identificar bacterias de alimentos en el laboratorio, en los cuales los protocolos tardan mucho tiempo en generar resultados y son poco sensibles, permitiendo el crecimiento de otras bacterias, lo que dificulta la detección

del patógeno. Existen otros métodos con mayor sensibilidad y especificidad basados en técnicas analíticas como: cromatografía de gases, espectroscopia fluorescente, citometría de flujo y bioluminiscencia, no obstante, los altos costos de los equipos necesarios y su mantenimiento siguen siendo una desventaja, lo que limita su aplicación para la detección rápida y confiable de microorganismos (Arora *et al.*, 2011).

Actualmente, en busca de soluciones a este problema se ha planteado el uso de biosensores electroquímicos, cuyas ventajas frente a los demás métodos son: la obtención de una respuesta rápida, bajos límites de detección, selectividad en la bacteria a detectar además de la posibilidad de miniaturización del dispositivo (Jimenez *et al.*, 2009). Por lo tanto, en este trabajo se propone el desarrollo de un biosensor electroquímico utilizando electrodos serigrafiados de oro modificados con peroxidasa de pasto guinea (PPG) y cisteína para lograr la detección de *S. aureus* que es una bacteria común e importante a nivel mundial que provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo general

Obtener un biosensor electroquímico utilizando electrodos serigrafiados de oro funcionalizados con cisteína y peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) que permitan detectar *Staphylococcus aureus*.

### 1.2 Objetivos específicos

- Aislar y purificar parcialmente la peroxidasa de pasto guinea
- Sintetizar y caracterizar bioconjugados -peroxidasa de pasto guinea con posible actividad electroquímica.
- Caracterizar los electrodos modificados mediante voltamperometría cíclica.
- Evaluar la capacidad analítica del biosensor mediante la determinación de parámetros analíticos como: nivel mínimo de detección, rango de linealidad, sensibilidad.

## 3. Cuerpo del trabajo

### 3.1 Marco teórico

#### 3.1.1 Biosensores

Los biosensores son dispositivos analíticos de tamaño reducido capaces de transformar un proceso biológico en una señal eléctrica que permita su cuantificación. Fundamentalmente, el dispositivo consta de un receptor o elemento de reconocimiento biológico y un transductor. El receptor es el

elemento que interacciona de forma selectiva con el analito y siempre es de naturaleza biológica, constituyendo una capa delgada de material biológico que está en contacto con el transductor. El transductor es el elemento encargado de convertir en una señal cuantificable el cambio fisicoquímico observado. Esta señal es proporcional al compuesto o grupo de compuestos que se quiere determinar y puede recoger información cualitativa o cuantitativa (Moreno, 2017)

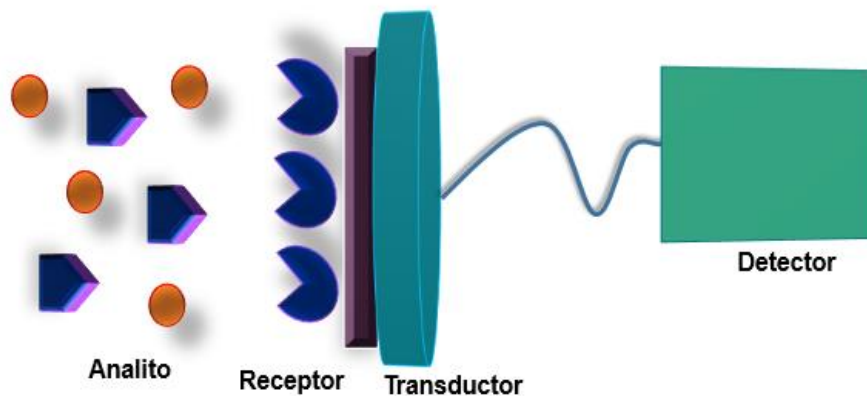


Figura 1. Configuración de un biosensor.

### 3.1.1.1 Clasificación de los biosensores

Los biosensores se pueden clasificar de dos maneras. La primera y más general está basada en la naturaleza del proceso biológico, donde se distinguen dos tipos.

Biosensores catalíticos: Son los más aplicados y mejor conocidos, se basan en el empleo de un catalizador para favorecer una reacción química y obtener uno o varios productos conocidos sin consumo del biocatalizador, de modo que se regenera y puede volver a ser empleado en una nueva reacción. Estos biocatalizadores suelen ser enzimas o sistemas multienzimáticos.

Biosensores de afinidad: Este tipo de sensores se basan en la interacción del analito con el elemento de reconocimiento sin que exista una transformación catalítica. Simplemente se produce

una reacción de equilibrio en la que se forma un complejo analito-receptor, por eso normalmente se suelen emplear anticuerpos.

La segunda clasificación está basada en el tipo de transductor empleado.

Electroquímicos: Estos transductores transforman la señal que se produce por la interacción entre el analito y el sistema de reconocimiento en una señal eléctrica, y proporcionan una información analítica cuantitativa o semicuantitativa. Existen diferentes tipos de biosensores electroquímicos, pudiendo ser conductimétricos, potenciométricos, amperométricos e impedimétricos, en función de si los sistemas transductores detectan cambios en la conductividad, en el potencial, en una corriente generada o en la impedancia.

Ópticos: En este caso, el fundamento consiste en la medida de las variaciones que se producen en las propiedades de la luz como consecuencia de la interacción física o química entre el analito y el sistema de reconocimiento del sensor. La señal se mide mediante los cambios producidos en la absorción, fluorescencia, luminiscencia, dispersión o índice de refracción.

Piezoeléctricos: Éstos miden cambios directos de masa por la formación de un complejo antígeno-anticuerpo. Para el diseño de estos sensores se emplean materiales piezoeléctricos, es decir, materiales que al aplicarles un campo magnético alterno externo entran en resonancia. Estos materiales, que suelen ser cristales, se recubren con el elemento de reconocimiento (anticuerpo) y se pone en contacto con el analito y lo que se mide es la frecuencia de oscilación.

Nanomecánicos: Cuando se emplean este tipo de transductores, el elemento de reconocimiento se inmoviliza sobre la superficie de una micropalanca de silicio que se sumerge en una muestra líquida y la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito produce un cambio en la tensión superficial del líquido, de modo que lo que se mide es un cambio de la deflexión en la

micropalanca o bien, se puede medir también la frecuencia de resonancia. Generalmente se emplean anticuerpos (González *et al.*, 2005).

### **3.1.2 Biosensores con enzimas**

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos. En una reacción catalizada por una enzima se produce una unión del sustrato en una región concreta de la enzima denominada centro activo, que comprende un sitio de unión y un sitio catalítico. Una vez formados los productos la enzima se recupera pudiendo comenzar un nuevo ciclo de reacción. En ocasiones puede ser necesaria la presencia de cofactores para que la enzima pueda regenerarse y estar activa de nuevo (González., 2010).

Un biosensor enzimático cuantifica la concentración del analito a partir del efecto producido por la reacción catalizada. El funcionamiento básico de estos dispositivos se podría resumir de la siguiente manera: El analito difunde, primero a través de la disolución y después a través de la membrana (en el caso de existir), hasta entrar en contacto con el centro activo de la enzima, donde reacciona generando el producto, generalmente con propiedades redox. Éste es oxidado o reducido sobre el electrodo, generando un producto que difunde de nuevo a la solución. Los transductores electroquímicos se fundamentan en la proporcionalidad existente entre la concentración de una determinada especie electroactiva y la corriente eléctrica registrada al oxidarse o reducirse sobre la superficie de un electrodo polarizado. Como consecuencia de la reacción enzimática puede ocurrir un cambio de color, un cambio en la concentración de los protones o electrones en la muestra, un desprendimiento o una captación de gases, una emisión de luz o de calor, o bien la producción de compuestos de productos electroactivos. Todos esos cambios pueden ser transformados por medio de un transductor a una señal amplificada y medible por el usuario final (González *et al.*, 2005).

Las enzimas/proteínas más estudiadas son:

- Peroxidasas
- Oxidasas
- Hidrogenasas
- Hemoproteínas

### **3.1.3 Peroxidasas**

Las peroxidasas (POD) son un tipo de enzimas pertenecientes al grupo de las oxidorreductasas, ampliamente distribuidas en los reinos animal y vegetal. En general, catalizan reacciones redox utilizando peróxido de hidrógeno, algunos peróxidos orgánicos, o peroxiácidos de la fórmula general ROOH como agente oxidante (López, 2017). Estas enzimas se dividen en tres grandes superfamilias: la superfamilia de peroxidasas animales, la superfamilia de las catalasas y la superfamilia de peroxidasas de plantas.

En 1992 Welinder hizo una clasificación interna diferenciando en la familia de peroxidasas de plantas tres clases en función de sus diferentes elementos estructurales. En la clase I se encuentran las peroxidasas de origen procariontico, implicadas en procesos de detoxificación de las plantas. Las peroxidasas de clase II son las secretadas por hongos, responsables de los procesos de degradación de lignina y por ultimo las peroxidasas de clase III, aquellas que son secretadas por plantas y las más estudiadas hasta el momento. Todas ellas se caracterizan por tener un grupo prostético, un grupo hemo tipo b (protoporfirina IX), con Fe (III) pentacoordinado, que constituye el centro activo de la enzima (Welinder, 1992). En la tabla 1 se pueden observar las características más importantes de cada una de las clases.

Tabla 1.  
Características de las distintas clases de peroxidasa de plantas.

Elementos	Clase I	Clase II	Clase III
Grupo hemo	Si	Si	Si
Carbohidratos	No	0-5%	0-25%
Iones metálicos	No	Ca <sup>2+</sup> (2)	Ca <sup>2+</sup> (2)
Puentes disulfuro	No	4	4
Señal peptídica de secreción	No	En el extremo N-terminal	En el extremo N-terminal
Propéptidos en el extremo C-terminal	No	No	Si
Hélices extra	B' entre B-C	B' entre B-C	D' entre D-E F' Y F'' entre F-G
Ejemplos	APXs	LiP, MnP	HRP-C, CEP, RPTPT, AOPTP

Recientemente, la comisión Científica de la unión europea ha definido a las peroxidasas como las proteínas con mayor interés biotecnológico para el siglo XXI por su potencial para sustituir ventajosamente algunos catalizadores agresivos o tóxicos utilizados en la industria como el cloro en el proceso de blanqueo del papel durante el reciclaje o al formaldehído utilizado en la fabricación de resinas fenólicas. Además, son muy utilizadas en bioquímica clínica. Por ejemplo, en ensayos para determinación y cuantificación de metabolitos como glucosa, ácido úrico, colesterol o triglicéridos en fluidos biológicos donde usan POD como enzima acoplada (Hidalgo, 2011 y Solano, 2016). También ha demostrado ser un excelente marcador inmunocitoquímico, cuando se le conjuga con anticuerpos IgG, para la detección de antígenos virales (Genarina *et al.*, 1982). La mayoría de biosensores electroquímicos se han desarrollado utilizando peroxidasa de rábano picante (HRP) debido a su elevada actividad enzimática y estabilidad térmica, sin embargo, ha presentado algunas desventajas como la inactivación y desnaturalización cuando se hacen

mediciones en presencia de altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y pHs externos (Solano, 2016). Por eso, es considerado conveniente encontrar otras fuentes vegetales de peroxidasa que puedan reemplazar la HRP y potencialmente superar las limitaciones con las que esta cuenta. En un estudio realizado por Sakharov y col. a diferentes frutos, raíces y hojas tropicales que crecen en Colombia se encontró que algunas especies como la raíz de batata (*Ipómoea batatas*), las hojas de pasto guinea (*Panicum maximum*), las de dormidera (*Mimosa priga*) las de higuera (*Ricinus communis L.*) y las de las siguientes palmas: mararai (*Aiphanes cariótifolia*), de botella (*Roystonea regia*), dactilera (*Phoenix dactylifera*) y africana (*Elaeis guineensis*) presentan alta actividad de peroxidasa, en donde se destaca la peroxidasa de pasto guinea (PPG), cuyo valor de actividad enzimática fue de 908 U/g hoja, siendo de las actividades más altas (Sakharov *et al.*, 1999).

#### **3.1.4 Peroxidasa de pasto guinea**

La hierba de Guinea (*Panicum maximum*) es una hierba perenne alta y vigorosa con hojas largas y anchas, muy bien distribuidas en los tallos, presentando una alta relación de hoja/tallo y al igual que una alta tasa de rebrote. La altura de la planta depende de la variedad, yendo desde 0,80 metros hasta más de 2 metros, que varía ampliamente en el hábito de crecimiento (Joaquín *et al.*, 2001). Es autóctona de las áreas subtropicales del sur de África, donde crece principalmente debajo de los árboles. El sistema de raíces profundas, densas y fibrosas permite que la hierba de Guinea sobreviva a períodos de sequía bastante largos e incendios de rápido movimiento que no dañan las raíces subterráneas, pero se desempeña mejor en suelos bien drenados de buena fertilidad en regiones de alta precipitación (Aganga y Tshwenyane, 2004).



Figura 2. Fotografía de pasto guinea. Bobby Hattaway (2011). Tomado de [https://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I\\_TOBH4840&res=640](https://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I_TOBH4840&res=640)

El pasto Guinea se utiliza principalmente en pastoreo. En épocas de mucha producción y por la gran altura que alcanza, puede usarse para corte, heno o ensilaje. Cuando el pasto alcanza de 80 a 100 centímetros de altura o antes de iniciar la floración, se considera la época más adecuada para el pastoreo; ya que en estas condiciones presenta hasta el 60% de digestibilidad (Padilla *et al.*, 1980).

En el estudio realizado por Centeno se reportó la extracción y semipurificación de la peroxidasa de pasto guinea con actividad específica de 408 U/mg. Adicionalmente se determinó que la PPG posee un peso molecular de aproximadamente 30kDa, termoestabilidad de 44 °C a 66 °C y actividad óptima a pH 8 (Centeno, 2017).

En la actualidad se han desarrollado biosensores inmovilizando la PPG en electrodos de grafeno para la detección de peróxido de hidrógeno. En el cual se reportó la obtención de un extracto de PPG con actividad específica de 724.7 U/mg (Solano, 2016) y en electrodos de nanotubos de

carbono para la detección de triclosan, con un extracto de PPG con actividad específica de 609U/mg (Ordúz *et al.*, 2019).

### **3.1.5 Monocapas autoensambladas (self-assembled monolayer: SAM)**

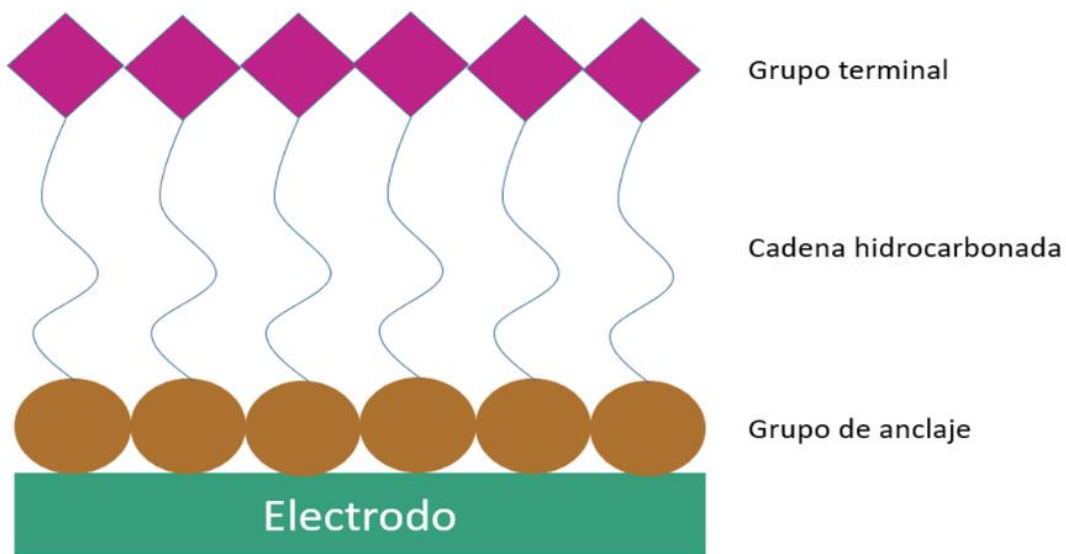
El funcionamiento de un biosensor depende en su mayoría, de la inmovilización del sistema de reconocimiento biológico sobre el transductor. El objetivo fundamental de esto es permitir un estrecho contacto entre la enzima y el transductor manteniendo inalterable la estabilidad de dicho sistema de reconocimiento biológico. Los métodos de inmovilización comprenden métodos físicos, principalmente por adsorción o por atrapamiento, y métodos químicos, ya sea mediante unión covalente o por entrecruzamiento (Love *et al.*, 2005).

Uno de los métodos más comunes para modificar la superficie de un electrodo es por la formación de monocapas autoensambladas. Que son estructuras moleculares ordenadas que se obtienen por la adsorción espontánea de cierto tipo de moléculas orgánicas, desde una fase gaseosa o líquida, sobre la superficie de sólidos o líquidos. Este proceso está gobernado por la interacción entre la superficie y algún átomo de la molécula, que normalmente forma un enlace covalente con el sustrato, y por fuerzas de vander walls entre las moléculas adsorbidas.

En las moléculas que forman las SAM'S se pueden distinguir tres pares

- a) El grupo anclaje que presenta afinidad específica por el sustrato, formado generalmente un enlace covalente como en el caso de la interacción entre el grupo tiol y un buen número de metales.
- b) La cadena hidrocarbonada, que actúa como espaciados o puente molecular entre el electrodo metálico y la disolución, cuyas interacciones laterales dan lugar a una estructura densamente empaquetadas.

- c) El grupo terminal, que se encuentra en contacto con la disolución. Determina en gran medida las propiedades superficiales de la monocapa. De este modo se emplean SMA's terminadas en grupos metilo o hidroxilo (u otros) como modelos de superficies hidrofobicas o hidrofílicas, respectivamente, mientras que las SAMs terminadas en grupos carboxilo y amino se emplean para obtener superficies ionizadas con carga negativa (carboxilo) o positiva (amino). En función del pH de la disolución.



*Figura 3. Partes de las monocapas autoensambladas.*

Los alcanotieoles (R-SH) con grupos terminales  $-\text{COOH}$  e  $-\text{NH}_2$  como la cisteína, son sensibles a variación de pH y permiten el control de densidad de carga de la superficie de las SAM, conforme el pH de la solución en que estos son sumergidos. Además, con la posibilidad de uso de alcanotieoles conteniendo diferentes grupos funcionales es posible el desenvolvimiento de superficies con funciones y características específicas y con elevado nivel de control sobre su arquitectura molecular, hidrofobicidad y reactividad (Huayhuas, 2015).

### 3.1.6 Bacterias patógenas

#### 3.1.6.1 *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos son cocos Gram positivos de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, catalasa positivos, que se agrupan en parejas y en tétradas, y que en forma característica se dividen en más de un plano para formar racimos irregulares (figura 4) (Castañón, 2012).

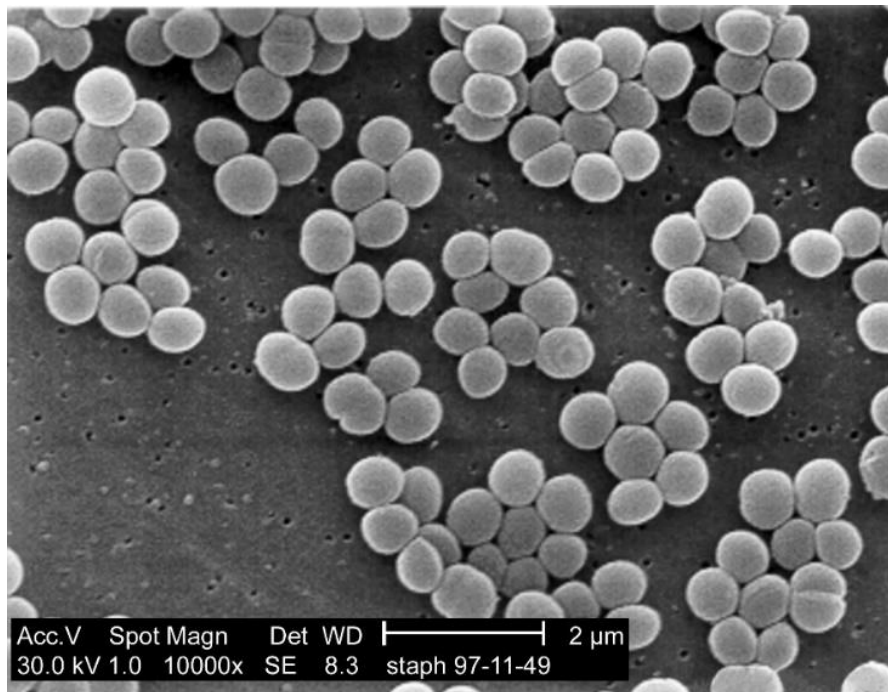


Figura 4. Micrografía SEM de colonias de *S. aureus*. Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library. Tomado de:  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Staphylococcus\\_aureus\\_01.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_01.jpg)

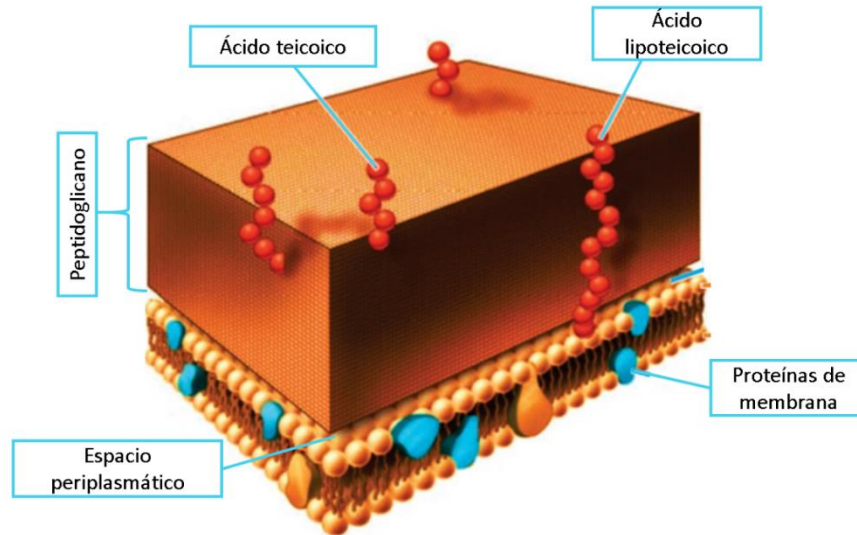


Figura 5. Estructura de la pared celular de bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus*. Tomado de <http://biotube5.blogspot.com/p/las-bacterias.html>.

El género *Staphylococcus* posee alrededor de 30 especies, de las cuales se destacan *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* y *S. aureus*. Esta última, se destaca como un comensal común de la piel y las membranas mucosas de los humanos, con estimaciones de 20-30% para la colonización persistente y 60% para la colonización intermitente y produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario (Wertheim *et al.*, 2005). La colonización aumenta significativamente el riesgo de infecciones, ya que proporciona un reservorio a partir del cual las bacterias se diseminan cuando las defensas del hospedero se ven comprometidas. Se considera que la colonización precede a la infección. Los abscesos locales ocurren cuando el microorganismo es inoculado en la piel desde el sitio de transporte. La bacteria puede difundir a nivel local o tener acceso al torrente sanguíneo. Una vez en la sangre, *S. aureus* puede propagarse a sitios periféricos en órganos distantes. Como resultado de esta diseminación, se pueden presentar diversas infecciones. Finalmente, incluso si el microorganismo no invade, es posible que se presenten síndromes específicos provocados por el efecto de toxinas de acción local o sistémica (Plata *et al.*, 2009).

**Determinantes de patogenicidad:** Cualquier enfermedad infecciosa es el resultado de la interacción entre el microorganismo causal y el huésped. Los factores de patogenicidad de *S. aureus* pueden ser divididos en tres grupos (tabla 2) (Bacteriología y virología, 2006).

Tabla 2.  
*Determinantes de patogenicidad de Staphylococcus aureus.*

Determinante de patogenicidad	Propiedades
<b>1. Componentes de la pared celular</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activación del complemento</li> <li>- Antifagocítica</li> <li>- Antifagocítica</li> <li>- Adherencia</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peptidoglicano</li> <li>- Ácidos teicoicos</li> <li>- Proteína A</li> <li>- Capsula mucoide</li> </ul>	
<b>2. Enzimas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formación de absceso</li> <li>- Destrucción del coágulo</li> <li>- Invasión hística</li> <li>- Colonización</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coagulasa</li> <li>- Estafiloquinasas</li> <li>- Hialuronidasa</li> <li>- Lipasas</li> </ul>	
<b>3. Toxinas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alteración de la permeabilidad celular de fagocitos</li> <li>- Epidermólisis</li> <li>- Shock</li> <li>- Intoxicación alimentaria</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Leucocidina</li> <li>- Toxina exfoliativa</li> <li>- Toxina del shock tóxico</li> <li>- Enterotoxinas</li> </ul>	

*Staphylococcus aureus* cuenta con diversos factores de virulencia, dentro de los cuales, las toxinas estafilocócicas (ST), causantes de la SPF contribuyen a la patogenicidad del microorganismo. Así mismo, *S. aureus* produce una amplia variedad de proteínas tóxicas como la toxina 1 del síndrome de shock tóxico (TSST1), toxinas exfoliativas y enterotoxinas (SEs), de las cuales solo las SEs han sido reportadas como productoras de intoxicación estafilocócica alimentaria (Argudín *et al.*, 2010). De los cinco tipos antigénicos de enterotoxinas estafilocócicas (SE) que tradicionalmente se conocen (SEA, SEB, SEC, SED y SEE), la SEA es la más comúnmente asociada con brotes de intoxicación alimentaria seguida de la SED, SEB y SEC (Pinchuk *et al.*, 2010 y do Carmo *et al.*, 2004). En los últimos años se ha reportado la existencia de nuevos tipos de SEs, incluyendo la pseudoenterotoxina (SEI) y las toxinas SEG, SEH, SEI, SEJ; de estas, las SEG, SEH y SEI, también han sido asociadas con casos de intoxicación alimentaria

(Ikeda *et al.*, 2005). Recientemente, se han descrito nuevos tipos de enterotoxinas estafilocócicas (SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEQ, SER, SET, SEU y SEV) (Boynukara, 2008). Las SE son altamente estables y resistentes al calor y a las condiciones ambientales como la congelación y el secado (le Loir *et al.*, 2003). También son resistentes a las enzimas proteolíticas como la pepsina o la tripsina y el pH bajo, lo que les permite ser completamente funcionales en el tracto gastrointestinal después de la ingestión (Hennekinne *et al.*, 2012). Las SEs son reconocidas por su resistencia al calor la cual es diferente en cada toxina, y por lo tanto resistirán el proceso de pasteurización de la leche; por ejemplo, la SEC es más resistente que la SEB, que a su vez es más resistente que la SEA. Igualmente, la SEE tiene una estructura más estable que la SEA, mientras que la SEI es menos estable que la SEA. Los tipos SEB y SEC son producidas principalmente al final de la fase estacionaria del crecimiento como metabolitos secundarios; los tipos SEA y SEE son producidas durante toda la fase logarítmica del crecimiento (Bautista *et al.*, 1998).

Los mecanismos de las SE que causan intoxicación alimentaria no se conocen con claridad. Sin embargo, se cree que las SEE afectan directamente el epitelio intestinal y el nervio vago, lo que provoca la estimulación del centro emético. La cantidad de SE que debe ser ingerida para causar ETA no se conoce exactamente, pero se reportan rangos entre 0,1 – 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}^{34}$ , esta concentración de SE es alcanzada con cargas microbianas superiores a  $10^5$  UFC/g (Novick, 2003). En 2003 se reportó una dosis de 20 a 100 ng de SE por persona en un brote de ETA en Japón relacionado con la ingestión de leche baja en grasa contaminada (Asao *et al.*, 2003). Otra dosis reportada asociada al consumo de leche achocolatada fue de 94 ng (Evenson *et al.*, 1988). La SEA se ha detectado en concentraciones de  $10^4$  UFC/g. En leche, se ha detectado SEA y SED con recuentos de  $10^7$  UFC/g pero no por debajo de este nivel. Empleando una cepa productora de SEA, SEB y SED, la SEB y SED se detectaron cuando el recuento alcanzó  $6 \times 10^6$  UFC/mL (1 ng/mL de SE), mientras que la

SEA (4 ng/mL) fue detectada con un recuento de  $3 \times 10^7$  UFC/mL (Duquenne *et al.* 2010). No obstante se investigaron 31 brotes de IAE, en los cuales se reportaron recuentos de *S. aureus* coagulasa positiva entre  $7,6 \times 10^2$  y  $7,5 \times 10^9$  UFC/g y se detectó SE en 25 de los 31 alimentos implicados (80%) (Kérouantón *et al.*, 2007).

### **3.1.7 Biosensores electroquímicos para detección de bacterias patógenas.**

La relación del hombre con los microorganismos da lugar a una interacción que puede ser beneficiosa o nociva. Según la naturaleza de esta interacción los microorganismos se clasifican en: Comensales, cuando colonizan las superficies corporales sin causar daño. Patógenas, cuando dañan al huésped por invasión directa y lesión o por la producción de sustancias tóxicas. Los biosensores que existen para detectar microorganismos patógenos en alimentos son principalmente de tipo inmunológicos combinados con transductores piezoeléctricos, ópticos, bioluminiscentes o de impedancia, que permiten una detección directa sin marcaje de la interacción antígeno-anticuerpo. Existen también biosensores que permiten una detección indirecta de los microorganismos, entre los que se incluye detección mediante marcaje con fluorescencia, detección de metabolitos microbianos y detección electroquímica (García *et al.*, 1996).

En el caso de microorganismos patógenos, la impedancia es uno de los parámetros fisicoquímicos más utilizados para registrar la presencia de bacterias. Básicamente se registran cambios en la impedancia eléctrica del medio de reacción donde la bacteria ha sido cultivada. El metabolismo bacteriano produce un aumento ya sea en la conductancia o en la capacitancia mientras se observa una disminución en la impedancia (Flores y Rojas, 2005). Se han reportado varios estudios sobre el desarrollo de biosensores aplicados a la detección de bacterias contaminantes en alimentos tales como: *E. coli* O157:H7 (Radke y Alocilja, 2005), *Salmonella typhimurium* (Seo *et al.*, 1999).

Tabla 3.  
Algunos biosensores para la detección de *S. aureus* reportados.

Electrodo	Límite de detección UFC/mL	Elemento de reconocimiento biológico	Método	Sistema de detección	Referencia
Disco de Pt	100	Enzima	Ensayo tipo sándwich con amplificación enzimática, utilizando un ciclo redox específico de NAD <sup>+</sup> que genera NADH	Amperométrico	Brooks <i>et al.</i> , 1990
-	5x10 <sup>5</sup>	Anticuerpo	Inmovilización de IgG y evaluación de cambio de masa debido a unión de <i>S. aureus</i>	Piezoeléctrico	Le <i>et al.</i> , 1995
Carbono	1000	Enzima	Inmunosensor con coimmobilización de glucosa oxidasa y RbIgG marcado con HRP	Amperométrico	Rishpon <i>et al.</i> , 1997
Oro	1.6x10 <sup>5</sup>	Anticuerpo	Inmunosensor con electrodos modificados con MPA y HRP como etiqueta enzimática	Amperométrico	Escamilla <i>et al.</i> , 2007
Oro	1.7x10 <sup>5</sup>	Anticuerpo	Inmunosensor integrado utilizando un electrodo modificado por tirosinasa-MPA	Amperométrico	Escamilla <i>et al.</i> , 2008
Oro	10.0	Anticuerpo	Inmovilización de anticuerpos anti- <i>S. aureus</i> utilizando una SAM de MPA.	Impedimétrico	Braiek <i>et al.</i> , 2012
Nanotubos de carbono	8x10 <sup>2</sup>	Aptámero	Nanotubos de carbono funcionalizados con aptámeros mediante la formación de enlaces covalentes.	Potenciométrico	Zelada <i>et al.</i> , 2011
Platino	10.0	Anticuerpo	Monitoreo del consumo de peróxido de hidrógeno	Amperométrico	Majumdar <i>et al.</i> , 2013
Carbón	1.0	Aptámero	Inmovilización de un aptámero anti- <i>S. aureus</i> primario biotinilado en cuentas magnéticas recubiertas con estreptavidina (MB).	Amperométrico	Abbaspou <i>et al.</i> , 2015
Nanotubos de carbono	13.0	Anticuerpo	Inmovilización del bioconjugado Ab-SWCNT al electrodo de trabajo.	Electroquímico	Bhardwaj <i>et al.</i> , 2017

Nota: NAD<sup>+</sup> nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada, NADH nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida, IgG inmunoglobina G, RbIgG inmunoglobina G de conejo, HRP peroxidasa de rábano picante, MPA ácido 3-mercaptopropionico, SAM monocapa autoensamblada, Ab-SWCNT bioconjugado anticuerpo-nanotubos de carbono de pared simple.

### **3.1.8 Técnicas electroquímicas para el estudio de biosensores.**

La electroquímica es la rama de la química que se encarga del estudio de los cambios químicos causados por el paso de una corriente eléctrica y la producción de energía eléctrica por reacciones químicas. Se pueden realizar mediciones electroquímicas en sistemas químicos por varias razones. Por ejemplo, el interés en obtener datos termodinámicos sobre una reacción o querer generar un intermedio inestable como un ion radical y estudiar su tasa de descomposición o sus propiedades espectroscópicas. En estos ejemplos, los métodos electroquímicos se emplean como herramientas en el estudio de los sistemas químicos de la misma manera que los métodos espectroscópicos se aplican con frecuencia. También hay investigaciones en las que las propiedades electroquímicas de los sistemas en sí son de interés principal, por ejemplo, en el diseño de una nueva fuente de energía o para la electrosíntesis de algún producto (Bard y Faulkner, 1980).

#### ***3.1.8.1 Voltamperometría cíclica***

La voltamperometría cíclica (CV) es una técnica electroquímica eficaz y muy popular que consiste en cambiar de una manera cíclica el potencial de un electrodo estacionario o de trabajo inmerso en una solución en reposo y medir la corriente resultante.

La señal de excitación es un barrido de potencial lineal con una onda de forma triangular. Esta señal barre el potencial del electrodo de trabajo en dirección de ida y vuelta entre dos valores designados llamados potenciales de conmutación (Elgrishi *et al.*, 2018). El triángulo regresa a la misma velocidad y permite la visualización de un voltamperograma completo con las formas de las ondas catódica (reducción) y anódica (oxidación), al realizar el barrido inicialmente en sentido anódico, se observa que al alcanzar cierto potencial aumenta notablemente la intensidad, debido a

la reacción de oxidación. Del mismo modo, al realizarse el barrido en sentido contrario se observa un pico de intensidad al producirse la reacción de reducción (figura 6).

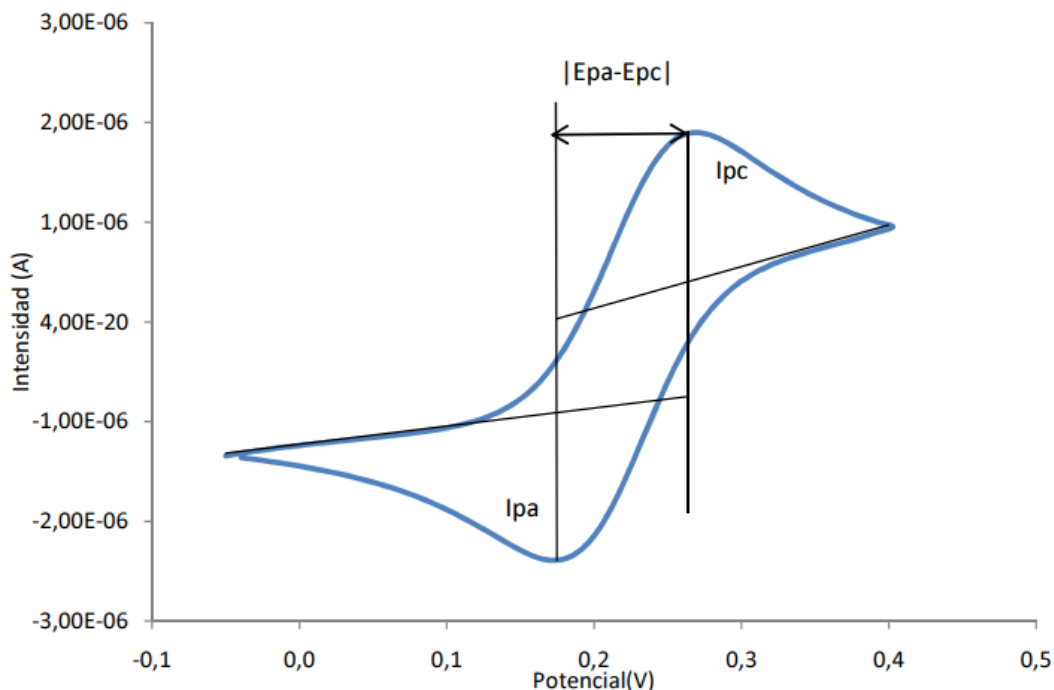


Figura 6. Esquema voltamperograma cíclico de una reacción reversible<sup>56</sup>.

La utilidad de esta técnica depende de la naturaleza del analito a estudiar. Es necesario que sea un analito con posibilidad de ser oxidado o reducido en el rango de potenciales del barrido aplicado y es deseable que la reacción redox sea reversible. La forma que presentará el voltamperograma dependerá del analito, de su concentración, de la ventana de potenciales escogida y la velocidad de barrido. La forma del voltamperograma da información acerca del analito y/o del electrodo y según la finalidad del estudio electroquímico (Morales, 2001).

Los datos de interés del voltamperograma son los siguientes:

- Ipc: pico de intensidad catódica. Señalará el pico de intensidad alcanzado en el proceso de reducción.

- $I_{pa}$ : pico de intensidad anódica. Señalará el pico de intensidad alcanzado en el proceso de oxidación.
- $I_{pc}/I_{pa}$ : cociente de intensidades.
- $|E_{pa}-E_{pc}|$ : diferencia de potencial absoluto entre los picos catódico y anódico.

### 3.2 Metodología

El desarrollo del proyecto se llevó a cabo en cuatro etapas principales:

- Extracción y semipurificación de PPG.
- Modificación de la superficie de los electrodos de oro con cisteína y PPG.
- Caracterización electroquímica de los electrodos modificados.
- Evaluación analítica del biosensor en soluciones de  $H_2O_2$  y en muestras de alimentos contaminados conteniendo *S. aureus*.

#### 3.2.1 Extracción y semipurificación de la peroxidasa de pasto guinea:

El proceso de extracción y semipurificación de la PPG a partir de las hojas de pasto guinea recolectadas en la ciudad de Bucaramanga, se realizó siguiendo cuatro etapas fundamentales: extracción, eliminación de pigmentos, cromatografía por exclusión de tamaño y ultrafiltración centrifugada (figura 6), según un protocolo propuesto en estudios anteriores (Centeno *et al.*, 2017).



Figura 7. Proceso de extracción y semipurificación de PPG, paso a paso.

### 3.2.1.1 Extracción

Las hojas recolectadas fueron lavadas con agua destilada, despojadas de su nervadura central, cortadas en pequeños trozos y trituradas en un molino de granos, donde se obtuvieron 100 g de material vegetal. Posteriormente, este fue dividido en dos porciones iguales y homogenizado utilizando un buffer fosfato 30 mM pH 8.0. La primera porción fue homogenizada en 120 mL de buffer e incubada en agitación constante durante 6 horas. El extracto fue filtrado con tela de algodón, el sobrenadante fue utilizado para homogenizar la segunda porción de material vegetal dejándolo en agitación constante por un periodo de 12 horas.

Para eliminar residuos y otras partículas sólidas se filtró y centrifugó el extracto a 5000 rpm durante 15 minutos y a 4°C. El precipitado fue descartado y se conservó el sobrenadante a 4°C para los experimentos posteriores.

### 3.2.1.2 Eliminación de pigmentos

La eliminación de algunos pigmentos presentes en el extracto enzimático se realizó por medio de un sistema bifásico compuesto por sulfato de amonio 10% (p/v) y polietilenglicol (PEG 12000-15000 Da) 14% (p/v) que fueron adicionados lentamente y con agitación constante al extracto

crudo hasta su completa homogenización. La mezcla fue dejada en reposo en un embudo de separación y a temperatura ambiente hasta observar la formación de dos capas insolubles. Se recolectó la capa inferior de color más claro que es la fase en donde quedó contenida la enzima. El extracto fue conservado a 4°C para los experimentos posteriores.

#### ***3.2.1.3 Cromatografía por exclusión de tamaño***

Para el desarrollo de esta etapa se utilizó Sephadex G-50 como fase estacionaria, la columna se equilibró con buffer TRIS-HCl 3 mM pH 8.3 con un flujo de 1 mL/min. Las fracciones fueron recolectadas en tubos de ensayo cada 6 minutos. A cada una de las fracciones se les midió la actividad enzimática, aquellas que presentaron mayor actividad fueron mezcladas y se conservaron a 4°C para los experimentos posteriores.

#### ***3.2.1.4 Ultrafiltración***

Para concentrar el extracto enzimático, este fue depositado en amicones de 10000 kDa y centrifugado a 5000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El extracto concentrado se conservó a 4°C para los experimentos posteriores.

#### ***3.2.1.5 Determinación de actividad enzimática***

La actividad catalítica de la enzima se cuantificó durante cada una de las etapas de extracción y semipurificación del extracto a través de la determinación de las velocidades iniciales de reacción. Utilizando un espectrofotómetro de doble haz y guayacol como sustrato, que en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da lugar a la reducción del centro activo de la enzima, de naturaleza no proteica y forma el un compuesto coloreado tretraguayacol.

Para ello se utilizaron celdas desechables de poliestireno en donde se depositaron 2.5 mL de PBS 30 mM pH 8.0, 4.4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguido de 5 µL de guayacol y 10 µL de extracto. La actividad volumétrica se determinó según la ecuación [1] presentada a continuación:

$$m \left( \frac{10^3}{5200} \right) \left( \frac{V_T}{V_{Ext}} \right) \cdot FD = \frac{U}{mL} \quad [1]$$

Donde m es la pendiente obtenida a 470 nm, V<sub>T</sub> es el volumen total de la solución en la celda, V<sub>Ext</sub> corresponde al volumen del extracto, 5200 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> es el coeficiente de extinción molar del guayacol y FD es el factor de dilución. La actividad se expresa en unidad de actividad enzimática, U, que es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de substrato por minuto. Se utiliza también en combinación con otras unidades, U/mg de proteína o U/mL, para señalar, respectivamente, la actividad enzimática específica o la concentración de actividad enzimática.

### ***3.2.1.6 Determinación de proteínas por el método de Bradford.***

La determinación de la concentración de proteínas presentes en cada una de las etapas de semipurificación del extracto se hizo por medio del método colorimétrico de Bradford, en el cual se usa albúmina de suero bovino (BSA) como patrón estándar para hacer una curva de calibración y así hallar la concentración de proteínas con una absorbancia de 595 nm.

### **3.2.2 Modificación de la superficie de los electrodos de oro.**

Para la modificación de los electrodos se preparó una solución de cisteína 10mM y el extracto de PPG en relación 1:1 (v/v), la solución se dejó incubar a temperatura ambiente por 1h antes de su uso. Se tomaron 10 µL del bioconjugado y se depositaron en la superficie del electrodo (figura 6).

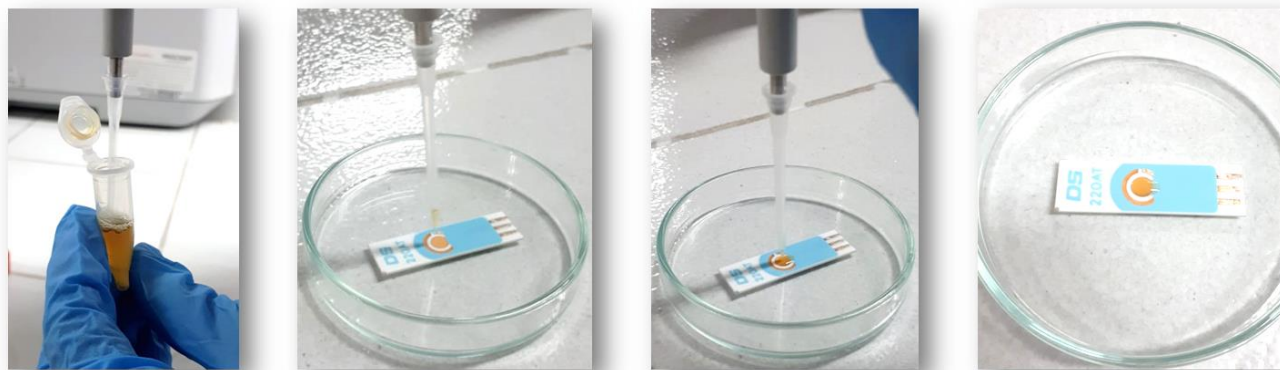


Figura 8. Modificación de los electrodos serigrafados de oro con el bioconjugado Cys-PPG.

Los electrodos fueron almacenados a 4°C durante 12 horas, después se lavaron con buffer fosfato 30mM pH 7 para eliminar el exceso de enzima y cisteína no adsorbida por la superficie del electrodo.

### 3.2.3 Caracterización electroquímica de los electrodos modificados.

#### *3.2.3.1 Caracterización electroquímica de los electrodos por voltamperometría cíclica usando ferrocianuro de potasio como electrolito.*

Se agregó una solución de ferrocianuro de potasio  $K_4 [Fe (CN)_6]$  10mM con exceso de KCl 0.1 M a la celda de metacrilato donde los electrodos fueron sumergidos y la medición se realizó a una velocidad de barrido 50mV/s en una ventana de potencial – 1.0 a 1.0 V.

#### *3.2.3.2 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la respuesta enzimática del electrodo por voltamperometría cíclica.*

Se tomaron voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno (3mM) con el fin de evaluar la reacción de reducción bioelectrocatalítica de  $H_2O_2$ . Para ello, los electrodos fueron sumergidos en la celda de metacrilato la cual contenía 7

mL de solución buffer fosfato 30 mM pH 7.0 y la medición se realizó en una ventana de potencial de 1,0 V a -1,0 V a una velocidad de barrido de 50 mV/s.

### ***3.2.3.3 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno por voltamperometría cíclica.***

Para examinar la reversibilidad de la reacción de reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno por la PPG, se tomaron voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados en una solución buffer fosfato 30 mM pH7, adicionando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3mM a diferentes velocidades de barrido entre 50 mV/s y 400 mV/s.

## **3.2.4 Evaluación analítica del biosensor en soluciones de *S.aureus* y en muestras de alimentos contaminados.**

### ***3.2.4.1 Preparación de los cultivos de la Staphylococcus aureus.***

La preparación de las diluciones de la bacteria para su posterior análisis por voltamperometría cíclica, se realizó mediante el método de conteo en placa (Benintende *et al.*, 2009) con cepas de *S. aureus* ATCC 29213 como se describe a continuación.

#### ***3.2.4.1.1 Caja de repique de Staphylococcus Aureus ATCC 29213.***

La caja de repique de *Staphylococcus Aureus* se preparó con una relación de 21g/L de medio BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar solido sobre una caja de Petri. Se tomó una colonia de la cepa de referencia que fue inoculada por agotamiento sobre el medio de cultivo, para posteriormente incubar a 37°C por un tiempo no máximo de 24h.

#### 3.2.4.1.2 Preinoculo

El inoculo se preparó en medio líquido usando caldo mueller hinton (MH) 35g/L, para esto se tomó una UFC de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 del repicado del día anterior y se agregó a un tubo de ensayo con 3mL de caldo MH a una temperatura de 37°C por 12h.

#### 3.2.4.1.3 Diluciones seriadas

Se tomó 1mL de pre-inoculo y se depositó en un tubo de ensayo con 9mL de solución buffer fosfato pH7. El primer tubo obtenido en la dilución se tomó como la solución de trabajo  $10^{-1}$  con la cual se iniciaron las diluciones seriadas hasta llegar a la dilución de  $10^{-7}$ , haciendo vortex en cada una de ellas, estas diluciones se hacen con el objeto de distribuir de forma uniforme la cantidad aproximada de microorganismo presente en el inoculo inicial en razón de UFC/mL de la muestra. Las soluciones disminuirán su concentración a medida que estas bajan en dilución, siendo la primera más concentrada y la última más diluida.

#### 3.2.4.1.4 Siembra por micro dilución.

Luego de obtener las diluciones seriadas, se tomaron 10µL de cada tubo preparado, este volumen se dispersó en cajas de medio de cultivo de BHI, cada caja dividida en cuatro partes iguales y cada cuadrante de la caja fue marcado con diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ , estas se dispensaron tres veces por cada cuadrante.

Las cajas inoculadas fueron incubadas a 37°C por un tiempo de 12h, posteriormente se contaron las colonias observadas en la superficie del agar, los conteos de las cajas que se tuvieron en cuenta en esta metodología fueron aquellas con recuentos totales en un rango de 3 UFC a 30 UFC, estos conteos se multiplicaron por el inverso de la dilución a la cual se sembraron y así se obtuvo el número aproximado de UFC/mL presentes en el pre-inoculo preparado.

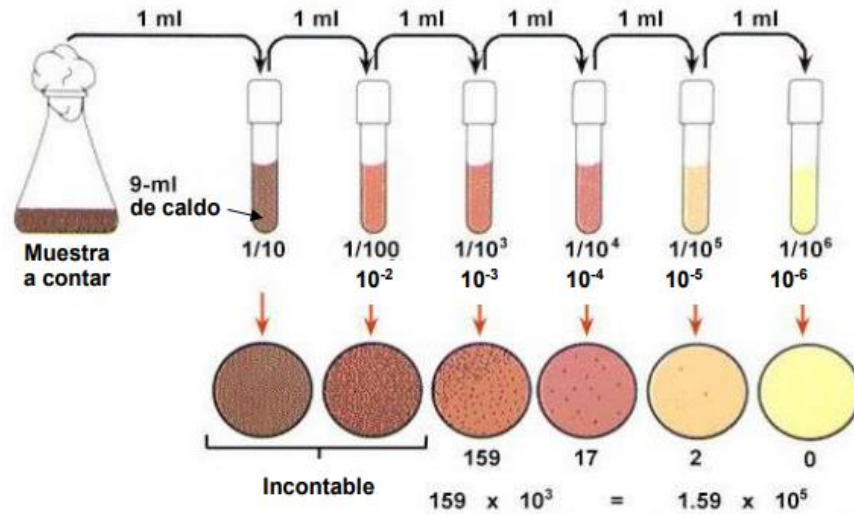


Figura 9. Selección de placas para recuentos de unidades formadoras de colonia.

### 3.2.4.2 Monitoreo electroquímico del consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por el *Staphylococcus aureus* en cultivos y muestras de alimentos contaminados.

#### 3.2.4.2.1 Monitoreo electroquímico del consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en soluciones de *Staphylococcus aureus*.

Se tomaron VCs de los electrodos modificados con PPG y cisteína, los cuales fueron sumergidos en una solución conteniendo el *S. aureus* a la cual se adicionaron 10µL de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM y se dejó reaccionar durante 5 minutos. Este procedimiento se realizó para concentraciones de *S. aureus* entre 3x10<sup>2</sup> y 3x10<sup>8</sup> ufc/mL.

##### 3.2.4.2.1.1 Determinación de los parámetros analíticos.

**Rango de linealidad:** Se refiere al intervalo de concentraciones sobre las cuales un analito puede ser determinado utilizando una curva de calibración lineal de la forma:

$$I(\mu A) = mC\left(\frac{UFC}{mL}\right) + b(\mu A) \quad [2]$$

Donde  $I$  representa la corriente respuesta,  $m$  la pendiente de la gráfica,  $C$  la concentración de *S. aureus* y  $b$  el intercepto con el eje  $y$ .

**Sensibilidad:** La sensibilidad de calibrado es igual a la pendiente de la ecuación de regresión lineal y la sensibilidad analítica se obtiene de la relación entre la pendiente y la desviación estándar de las mediciones según la siguiente ecuación:

$$\gamma = \frac{m}{S_s} \quad [3]$$

Donde  $m$  es la pendiente de la curva de calibración y  $S_s$  la desviación estándar de las medidas (Hernández y Gonzáles, 2002).

**Límite de detección:** Se refiere a aquella concentración mínima de bacterias que proporciona una señal instrumental significativamente diferente de la señal del blanco (Vargas *et al.*, 2018).

#### 3.2.4.2.2 Monitoreo electroquímico del consumo de $H_2O_2$ por la bacteria *Escherichia coli* como experimento de control.

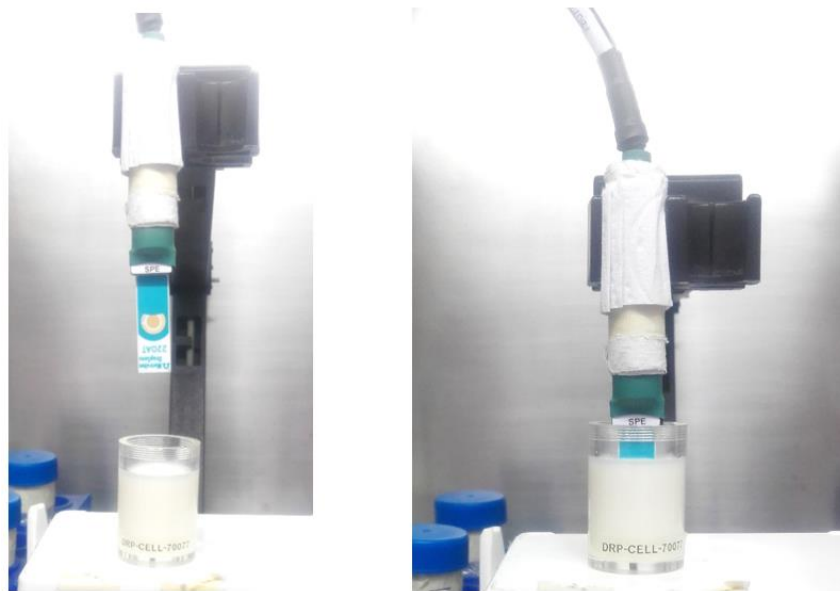
Para ensayar la respuesta del biosensor en una bacteria Gram-negativa se preparó una solución de la bacteria en PBS pH 7.0 a una concentración intermedia de  $3 \times 10^4$  UFC/mL tanto para *S. aureus* y como para *E. coli*, siguiendo el mismo proceso descrito en el apartado 3.2.4.1.

Se tomaron los VCs de los electrodos modificados con PPG y cisteína (Au/CysPPG) sumergiéndolos en la solución preparada de la bacteria a la cual se adicionaron 10  $\mu$ L de una solución de  $H_2O_2$  1mM y se dejó reaccionar durante 5 minutos.

3.2.4.2.3 *Monitoreo electroquímico del consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por el Staphylococcus aureus en una muestra de leche comercial.*

Para esta prueba se preparó una muestra de leche entera contaminada con el *S. aureus* a una concentración intermedia de  $3 \times 10^4$  UFC/mL siguiendo el mismo proceso descrito en el apartado 3.2.4.1.

Se tomaron los VCs de los electrodos modificados con PPG y cisteína (Au/CysPPG) sumergiéndolos en la solución preparada de la bacteria a la cual se adicionaron 10 $\mu$ L de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM y se dejó reaccionar durante 5 minutos.



*Figura 10. Montaje de las mediciones electroquímicas en las muestras de leche contaminadas con S. aureus y sin contaminar.*

### 3.3 Análisis y discusión de resultados

#### 3.3.1 Extracción y semipurificación de PPG

Siguiendo lo descrito en el apartado 3.2.1 sobre el proceso de extracción y semipurificación de la peroxidasa de pasto guinea.

Durante la etapa de cromatografía por exclusión de tamaño, la fase acuosa con la enzima se aplicó directamente a una columna Sephadex G-75, en donde se recolectaron fracciones del extracto cada 6 min. Teniendo en cuenta la actividad volumétrica en función de la fracción recolectada, como se observa en la figura 12, las fracciones 10 a 14 fueron las que presentaron los valores de mayor actividad de la enzima.

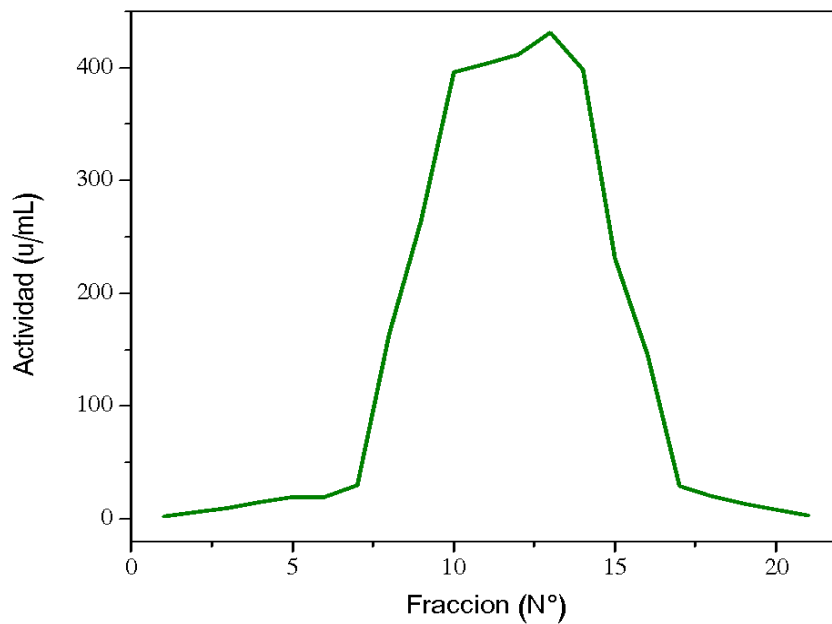


Figura 11. Actividad volumétrica de las fracciones recolectadas en la etapa de cromatografía por exclusión de tamaño.

A los extractos obtenidos al final de cada etapa se les midió la actividad enzimática y concentración de proteínas, con el fin de hallar los parámetros enzimáticos representados en la tabla 4. En donde se observa que se obtuvo un extracto con actividad volumétrica final de 470.8 U/mL y rendimiento de 53.54%.

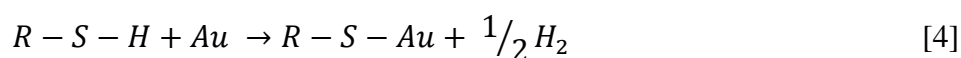
*Tabla 4.*  
*Etapas de semipurificación de la PPG.*

Etapa	Volumen (ml)	Actividad Volumétrica (U/ml)	Actividad total (U)	Proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	199	185,5	36930,0	1478	24,9	1,0	100
Eliminación de pigmentos	119	217,7	25911,1	504,5	51,3	2,0	70,1
Cromatografía	68	351,7	23916,2	190,2	125,7	5,0	64,7
Ultrafiltración	42	470,8	19773,8	89,1	221,9	8,8	53,5

*Unidad de actividad de peroxidasa (U) = Cantidad de enzima necesaria para catalizar la oxidación de 1 μmol de sustrato por minuto, bajo condiciones definidas.*

### 3.3.2 Modificación de la superficie de los electrodos

Para la construcción del biosensor se siguieron los pasos establecidos en el apartado 3.2.2 donde, la superficie del electrodo serigrafado de oro fue modificada mediante un proceso de quimisorción del grupo tiol de la cisteína sobre la superficie del electrodo de oro, mediante la siguiente ecuación:



El mecanismo de reacción no es del todo comprendido, la misma se considera formalmente como una adición oxidativa del enlace S-H sobre la superficie de oro, seguida de una eliminación reductiva del hidrógeno (Che *et al.*, 2009).

En cuanto a la unión de la enzima con la SAM de cisteína formada en la superficie del electrodo. Se sugiere que la PPG podría estar permanentemente confinada a la superficie del electrodo a través de la SAM por medio de diversas interacciones electrostáticas e hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno (Liu *et al.*, 2008 y Xiao *et al.*, 1999).

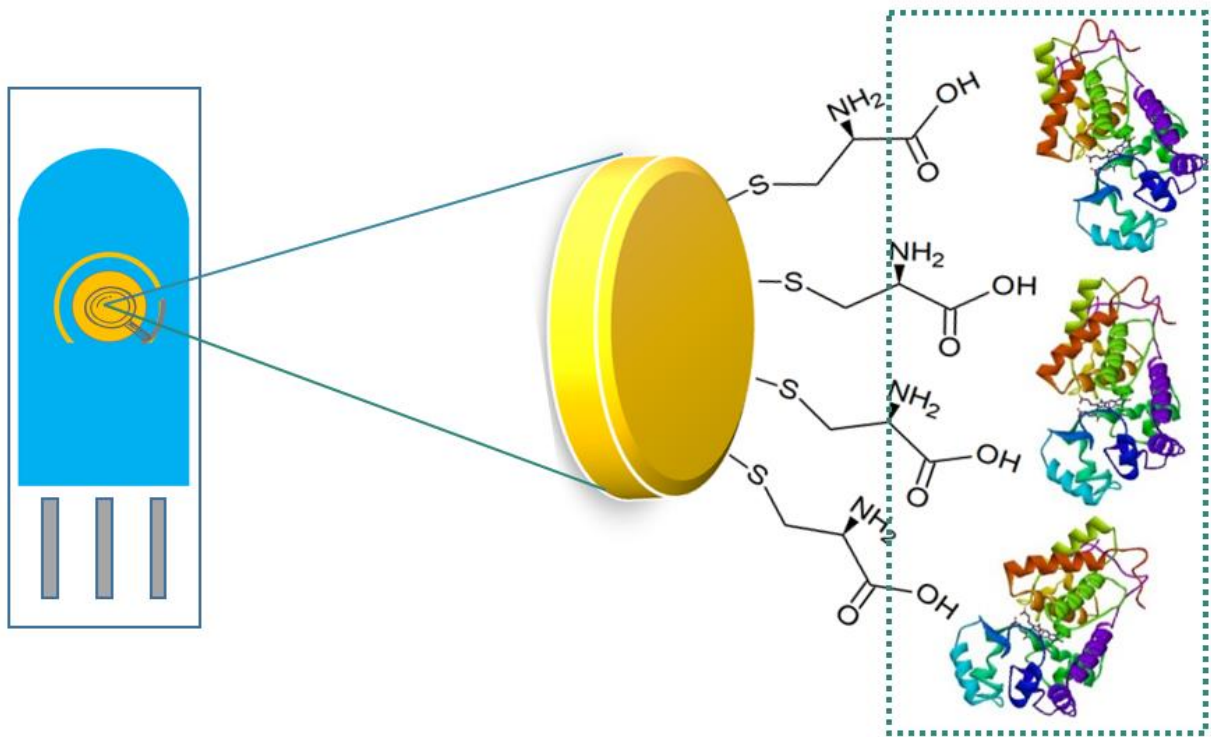


Figura 12. Modificación de la superficie del electrodo serigrafado de oro por el bioconjugado Cys/PPG.

### 3.3.3 Caracterización por métodos electroquímicos

El registro de las mediciones electroquímicas se hizo utilizando el equipo AUTOLAB POTENTIOSTAT/GALVANOSTAT y el software NOVA 1.10.1.9 para realizar el procesamiento de los datos como se ve el montaje de la figura 14.



*Figura 13. Montaje experimental de las mediciones electroquímicas realizadas.*

### ***3.3.3.1 Caracterización de los electrodos por voltamperometría cíclica usando ferrocianuro de potasio como electrolito.***

En la figura 15 se puede observar los voltamperogramas obtenidos al evaluar la modificación de la superficie del electrodo con una solución 10mM de  $K_4[Fe(CN)_6]$  con exceso de KCl 0.1 M. Inicialmente se puede observar que tanto el electrodo sin modificar como el electrodo modificado únicamente con cisteína tienen un valor de corriente y área bajo la curva tanto de oxidación como de reducción menor que el electrodo modificado con el bioconjugado (Cys-PPG), lo que demuestra que al adicionar la enzima aumenta la velocidad de la transferencia de electrones de la superficie del electrodo y aumenta la carga total. De estos VCs también se pueden extraer los valores característicos  $\Delta E$  y  $I_{pc}/I_{pa}$ .

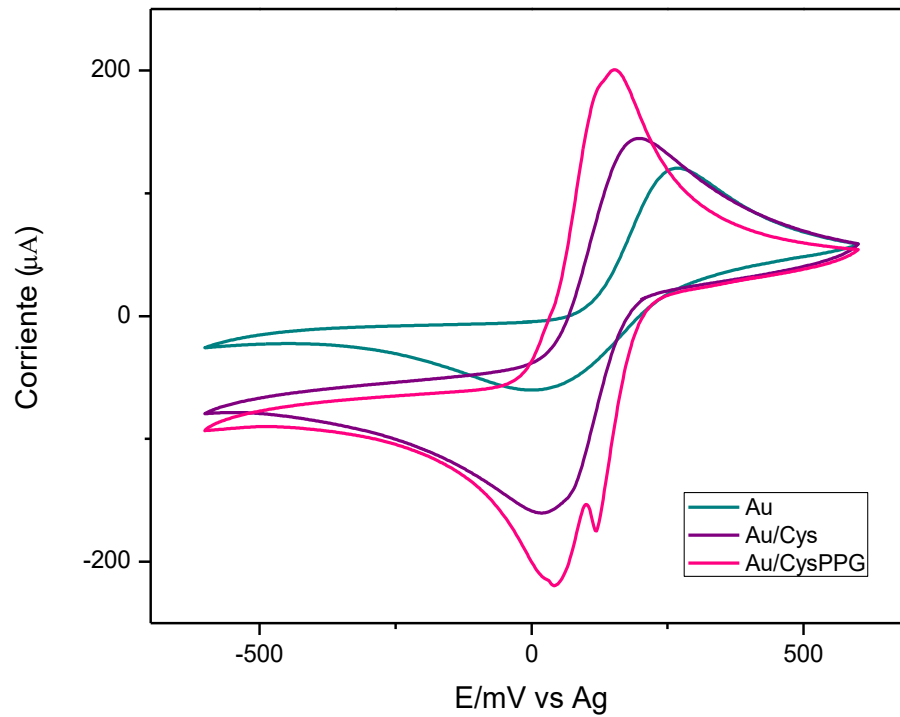


Figura 14. Electrodo sin modificar (Au), modificado con cisteína (Au/Cys) y modificado con el bioconjugado cisteína – peroxidasa (Au/Cys/PPG).

La diferencia de potencial absoluto entre los picos catódico y anódico es fruto de una combinación entre los diferentes coeficientes de difusión del par y el sobrepotencial necesario para transferir electrones entre la superficie del electrodo y el analito. Esta diferencia de potencial está relacionada directamente con el número de electrones que interviene en la reacción, según la ecuación:

$$|E_{pa} - E_{pc}| = 2.218 * \frac{RT}{nF} \quad [5]$$

De este modo, a temperatura de 25°C, la separación teórica debería ser aproximadamente de 59mV para parejas redox en que la transferencia sea de un único electrón, independientemente de

la concentración o la velocidad de barrido. A mayor separación de picos se tendrá un proceso cada vez más irreversible (Abab, 2010).

*Tabla 5.*

*Diferencia de potencial y relación de corriente entre los picos de oxidación y reducción de los electrodos estudiados.*

<b>Electrodo</b>	<b>Epa</b>	<b>Ipa</b>	<b>Epc</b>	<b>Ipc</b>	<b>ΔE</b>	<b>Ipc/Ipa</b>
Au	13,46	-60,26	268,24	119,92	254,78	1,99
Au/Cys	19,33	-160,85	195,68	149,67	176,35	0,93
Au/CysPPG	40,66	-219,75	152,04	200,53	111,38	0,91

En la tabla 5 se detallan los resultados obtenidos de los VCs de intensidad de pico catódico (Ipc), intensidad de pico anódico (Ipa), su cociente y la separación entre los picos de oxidación y reducción (ΔE) obtenidos experimentalmente. En el caso del electrodo sin modificar se puede deducir que el proceso no se comporta de forma reversible ya que el valor de ΔE es mayor a 59 mV lo que indica que el proceso se comporta de forma cuasi-reversible y se corrobora al calcular el cociente Ipc/Ipa que da un valor de aproximadamente 2 debido a que la corriente de reducción (Ipc) es mayor que la corriente de oxidación (Ipa) lo que indica que la transferencia de electrones en la reacción catódica es mayor que en la reacción anódica.

Por otro lado, los resultados obtenidos para los electrodos modificados muestran que el valor de ΔE, aunque sigue siendo mayor a 59 mV, disminuye de 176,35 mV para el electrodo modificado únicamente con cisteína a 111,38 mV para el electrodo modificado con el bioconjugado de cisteína y peroxidasa. Esto indica que a medida que se modifica el electrodo la reversibilidad del proceso redox aumenta, también se puede corroborar al calcular el cociente Ipc/Ipa que para ambos casos

da un valor cercano a 1 concordando con lo que dice la teoría con respecto a los procesos reversibles (Alaa *et al.*, 2009).

### ***3.3.3.2 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la respuesta enzimática del electrodo por voltamperometría cíclica.***

En la figura 16 se puede ver la respuesta de corriente generada por los electrodos sin modificar y modificados con cisteína y peroxidasa de pasto guinea en presencia de  $H_2O_2$ .

El VC del electrodo sin modificar (curva azul) no muestra ninguna señal como respuesta a la adición de peróxido de hidrógeno a la solución, mientras que, el VC del electrodo modificado (curva morada) muestra un aumento significativo en las corrientes anódica y catódica, con un pico máximo de reducción a un potencial de -800 mV y un pico máximo de oxidación de 609 mV, que corresponde a la reducción bioelectrocatalítica del  $H_2O_2$  catalizada por la enzima PPG. Este hecho demuestra que hay una transferencia directa de electrones desde el centro activo de la enzima hacia la superficie del electrodo, con una orientación favorecida del cofactor hacia la superficie del electrodo gracias al túnel conductor de electrones formado por la cisteína (Yi *et al.*, 2000). En general, el ciclo catalítico de las peroxidases se asemeja al descrito para la HRP. De acuerdo con Ferri y col. la POD en este caso reacciona con  $H_2O_2$  para formar un primer compuesto intermedio (Compuesto I), que es una forma oxidada de dos equivalentes que contiene oxiferril hemo ( $Fe^{4+}=O$ ) y un radical catión porfirina. El compuesto I tiene actividad catalítica y su radical porfirina extrae un electrón del electrodo de oro para formar un segundo intermediario (Compuesto II), que posteriormente se reduce de nuevo a la POD nativa al aceptar el electrón del electrodo. El

mecanismo catalítico de la reducción de POD inmovilizada a  $H_2O_2$  se ejemplifica mediante las siguientes ecuaciones (Ferri *et al.*, 1998).

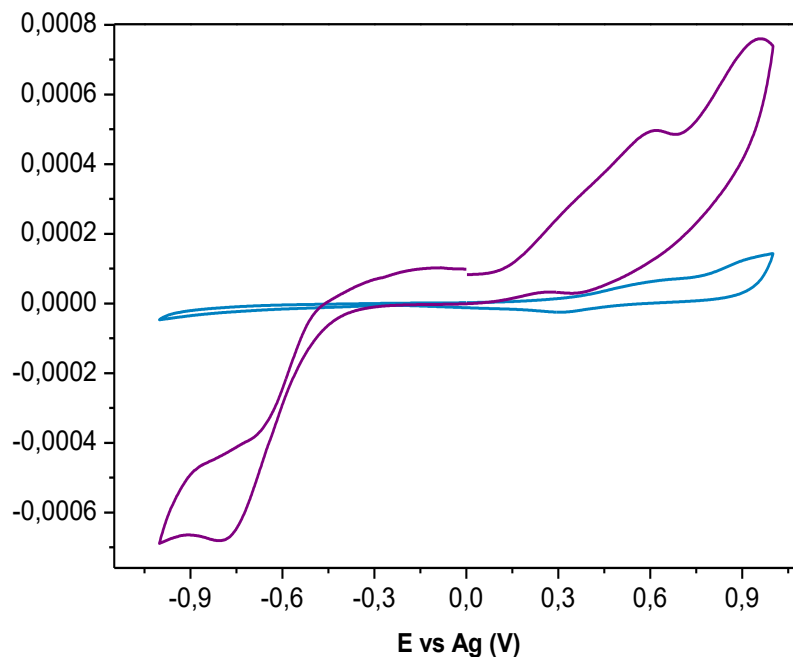
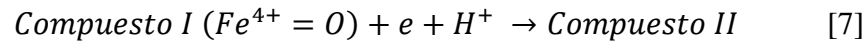


Figura 15. CVs de los electrodos modificados con cisteína y peroxidasa (Au/Cys/PPG) sin  $H_2O_2$  (azul) y con  $H_2O_2$  5mM (morado).

### 3.3.3.3 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno por voltamperometría cíclica.

En la figura 17 se ve que al variar la velocidad de barrido en el rango de 50 a 400 mV/s, los VCs de los electrodos modificados con el bioconjugado Cys/PPG permanecen esencialmente sin cambios en los ciclos lo que indica que la PPG está confinada de forma estable en la SAM de

cisteína. Además, se ve las corrientes tanto de reducción como de oxidación aumentan linealmente a medida que se aumenta la velocidad de barrido lo que sugiere que la reacción electroquímica en la superficie del electrodo de oro está controlada por un proceso de difusión. Este comportamiento se evidencia en la figura 18 donde se grafican ambas corrientes en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido desde 50 mV/s hasta 400 mV/s, donde se obtuvieron las ecuaciones de regresión lineal de las corrientes catódica y anódica.

$$I_{Pc}(\mu A) = 0,3v + 0,5 \quad (R^2 = 0.9961) \quad [9]$$

$$I_{Pa}(\mu A) = -0.4v - 0,3 \quad (R^2 = 0.9928) \quad [10]$$

Anteriores autores han reportado este mismo comportamiento para electrodos de oro modificados con otras enzimas para electrodos de oro modificados con cisteína y peroxidasa de rábano picante (HRP) en un rango de 20 a 1000 mV/s (Yi *et al.*, 2000), electrodos de oro con peroxidasa de palma real (PPR) en un rango de 25 a 500 mV/s (Vargas y Castillo, 2016) y para electrodos de oro modificados con cisteína y la enzima superóxido dismutasa (SOD) en el rango de 10 a 1000 mV/s (Tian *et al.*, 2002).

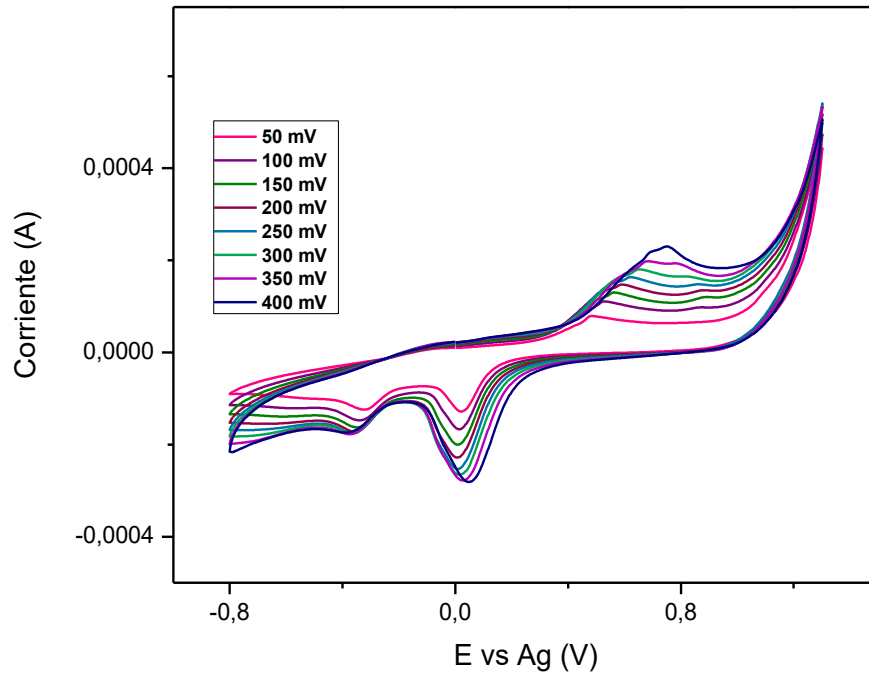


Figura 16. CVs de los electrodos modificados con cisteína y PPG en solución PBS 30mM con  $H_2O_2$  3mM a diferentes velocidades de barrido.

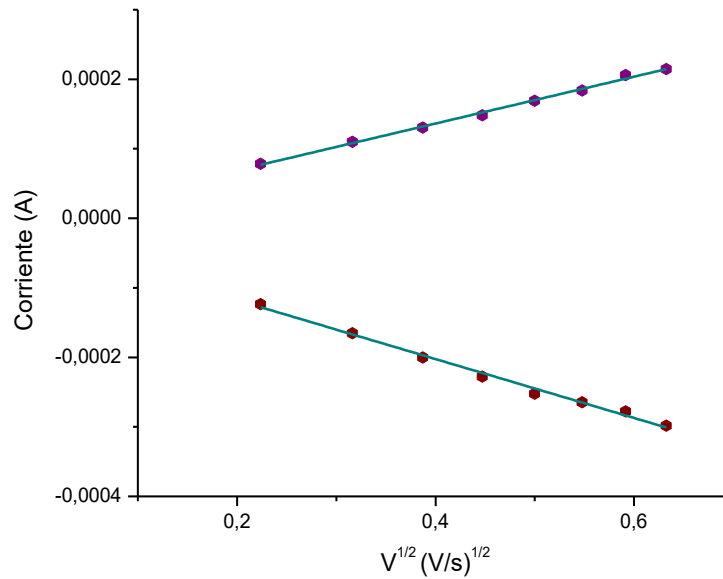


Figura 17. Diagrama de picos de corrientes catódicas y anódicas versus la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

### **3.3.4 Evaluación analítica del biosensor en soluciones de *S. aureus* y en muestras de alimentos contaminados.**

Para esta parte del trabajo, el montaje para tomar las medidas electroquímicas de la figura 19 fue adecuado para realizarse dentro de una cabina de flujo laminar para mantener la zona de trabajo con las bacterias, limpia y estéril con el fin de evitar la contaminación de las muestras que causaran interferencias en los resultados.

#### ***3.3.4.1 Monitoreo electroquímico del consumo de $H_2O_2$ en soluciones de *Staphylococcus aureus*.***

En la figura 19 se ve la respuesta electroquímica del electrodo modificado Au/CysPPG al consumo de  $H_2O_2$  de diferentes concentraciones de *S. aureus* a un potencial de trabajo de -810 mV. Estos resultados muestran que hay una disminución en la señal de la corriente bioelectrocatalítica de reducción del peróxido de hidrógeno, lo que indica un consumo de  $H_2O_2$  por parte de la catalasa, enzima antioxidante presente en *S. aureus*.

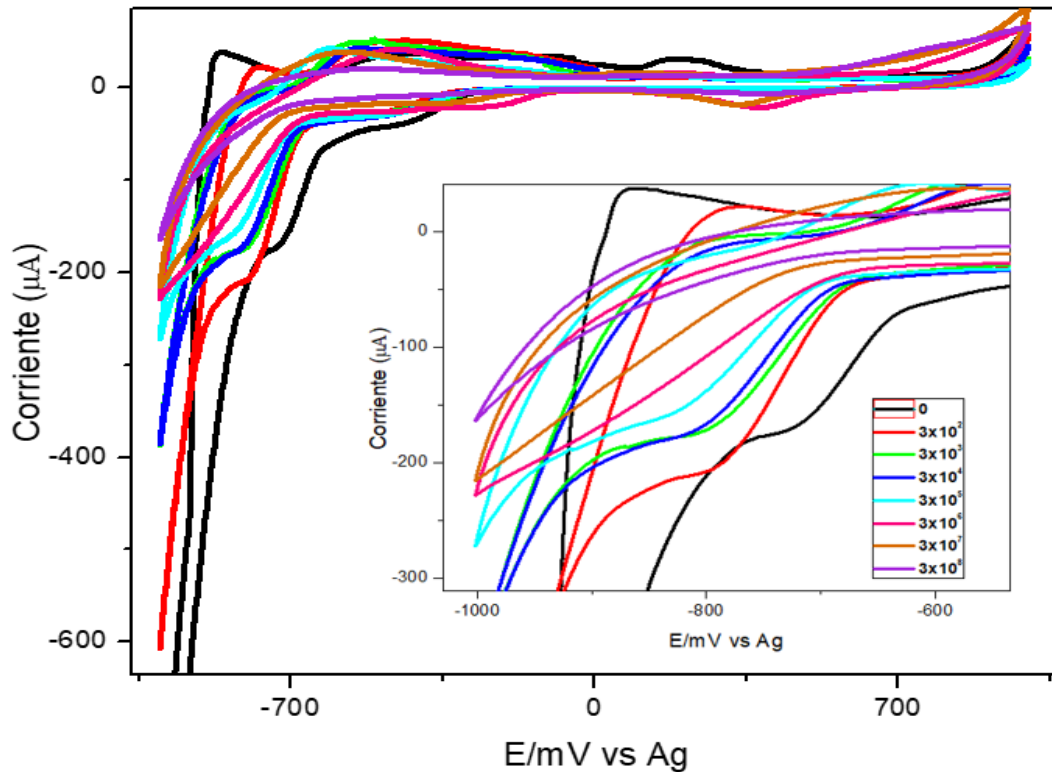
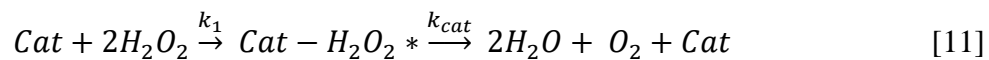


Figura 18. Voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados (Au/CysPPG) en buffer fosfato 30mM pH 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM para concentraciones de *S. aureus* de 0 hasta 3x10<sup>8</sup> UFC/mL.

La catalasa como parte del sistema antioxidante de *S. aureus* está involucrada en la destrucción del peróxido de hidrógeno generado durante el metabolismo de la bacteria, el cual es transformado en agua y oxígeno, obedeciendo el mecanismo general de la interacción entre un sustrato (S) y la enzima (E) (Arguello, 2000) según la reacción 11:



En la figura 20 se ve la dependencia directa entre la disminución en la corriente de reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producto del consumo de este por parte de la enzima catalasa al aumentar la concentración de *S. aureus* a un potencial de trabajo fijo de -810 mV con un rango lineal en un intervalo de 3x10<sup>2</sup>-3x10<sup>8</sup> UFC/mL, presentando un valor de coeficiente de correlación R<sup>2</sup>=0.9806 según la ecuación 12:

$$I(\mu A) = 0,2696X (UFC/mL) - 213,27 \quad (R^2 = 0,9806) \quad [12]$$

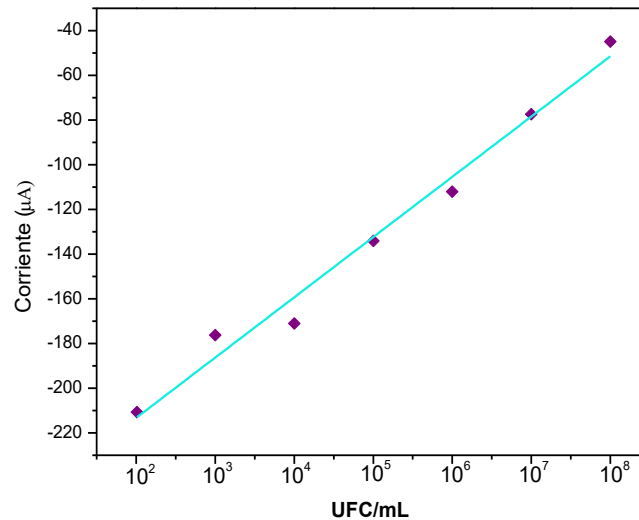


Figura 19. Respuesta del electrodo modificado a las soluciones de *S. aureus* a diferentes concentraciones (UFC/mL) a un potencial fijo de -810 mV.

### 3.3.4.1.1 Determinación de los parámetros analíticos

A partir de la curva de calibración (ecuación 12) obtenida de los resultados del monitoreo del consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por *S. aureus*, presentados en la figura 20, se determinaron los parámetros analíticos: Rango de linealidad, sensibilidad y límite de detección.

De acuerdo con esto, el método propuesto tiene un rango de linealidad de  $3 \times 10^2$  a  $3 \times 10^8$  UFC/ml y la sensibilidad del calibrado es igual al valor de la pendiente de la recta, es decir 0.2696. Adicionalmente se calculó la sensibilidad analítica por medio de la ecuación 3, cuyo valor es 0.0046.

El límite de detección para esta técnica analítica es de  $3 \times 10^2$  UFC/ml, que es la concentración más baja de *S. aureus* obtenida por el método de conteo en placa cuya señal puede ser distinguida del blanco.

**3.3.4.2 Monitoreo electroquímico del consumo de  $H_2O_2$  por la bacteria *Escherichia coli* como experimento de control.**

Para ensayar la respuesta del biosensor frente a una bacteria Gram-negativa, se preparó una prueba con la bacteria *Escherichia coli*, que es una bacteria habitante normal en el intestino de los seres humanos y de los animales, principalmente los de sangre caliente. Debido a su alta presencia en el intestino, *E. coli* se utiliza como el indicador principal para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad del agua y de los alimentos (Tobón, 2017).

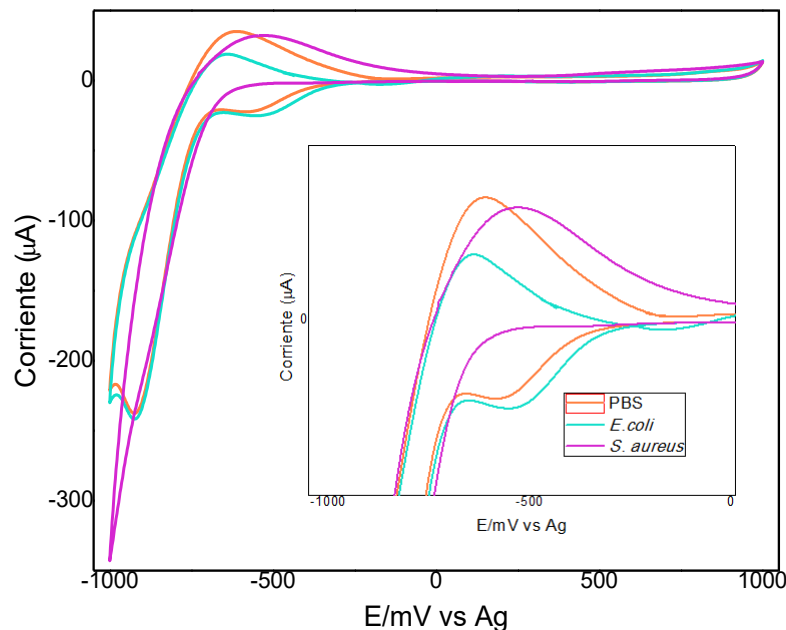


Figura 20. VCs de los electrodos serigrafados de oro modificados en presencia de  $H_2O_2$  1 mM. Velocidad de barrido 50mV/s.

Los VCs que se representan en la figura 21 son los resultados obtenidos al sumergir el electrodo modificado en una solución de PBS sin bacterias, donde se ve la señal correspondiente a la reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno por parte de la enzima PPG con valor de corriente  $-21.49 \mu\text{A}$ . En el VC correspondiente al electrodo sumergido en solución de *S. aureus*  $3 \times 10^4$  UFC/mL bajo la misma concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se ve la disminución significativa de la señal de corriente de reducción del peróxido de hidrógeno debido al consumo del mismo por parte de la enzima catalasa, como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.3.4.1. Por otro lado, el VC del electrodo sumergido en la solución de *E. Coli*  $3 \times 10^4$  UFC/ml muestra un pico definido correspondiente a la reducción del peróxido de hidrógeno a  $-25,26 \mu\text{A}$ , lo que sugiere que no hubo consumo de peróxido de hidrógeno por parte de la bacteria.

Aunque *E. coli* también es una especie catalasa positiva, La baja capacidad de degradación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que presenta en este ensayo puede deberse a que la actividad catalasa de *E. coli* es menor que la de *S. aureus* (Schwartz *et al.*, 1983). Además, la permeabilidad de la pared celular a  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede ser ligeramente menor que en *S. aureus* debido a que la membrana externa de las bacterias Gram negativas actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes antibacterianos sin relación química (Abdelhamid y Wu, 2017).

#### ***3.3.4.3 Monitoreo Electroquímico del consumo de $\text{H}_2\text{O}_2$ por el *Staphylococcus aureus* en una muestra de leche comercial.***

El mercado de la leche cruda en Colombia es objeto de regulación por parte del Estado, ya que, es uno de los productos de mayor impacto en salud pública (Minsalud, 2011). Esto, debido a que su calidad e inocuidad, se ven comprometidas desde su ordeño hasta que llega al consumidor final por peligros biológicos y químicos. La inadecuada manipulación de la leche cruda y las malas prácticas de ordeño en la producción primaria, así como la carencia o insuficiencia de enfriamiento

de la leche cruda, conlleva al crecimiento microbiano en menor tiempo, poniendo en riesgo a la población que lo consume. Así mismo, la leche cruda puede contaminarse en cualquiera de las etapas durante su obtención, almacenamiento y comercialización con microorganismos patógenos como, por ejemplo, *Escherichia coli* patógenas, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus* y *Yersinia enterocolitica* (Oliver *et al.*, 2005, Oliver *et al.*, 2009, Jayarao, 1999, Rohrbach *et al.*, 1992 y Murinda *et al.*, 2002).

En la figura 22 se encuentran los resultados de los VCs tomados a una muestra de leche entera comercial sin contaminar y una muestra de leche de la misma bolsa contaminada con *S. aureus*  $3 \times 10^4$  UFC/mL, ambas mediciones en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1mM. El VC de la muestra donde no hay presencia de la bacteria presenta un pico de reducción máximo a un potencial de -566 mV a una corriente de -22,06  $\mu\text{A}$  correspondiente a la reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno, mientras, que en el VC de la muestra con la bacteria esta señal se reduce considerablemente al mismo potencial de -566 mV presentando un valor de intensidad de corriente igual a -3,26  $\mu\text{A}$ .

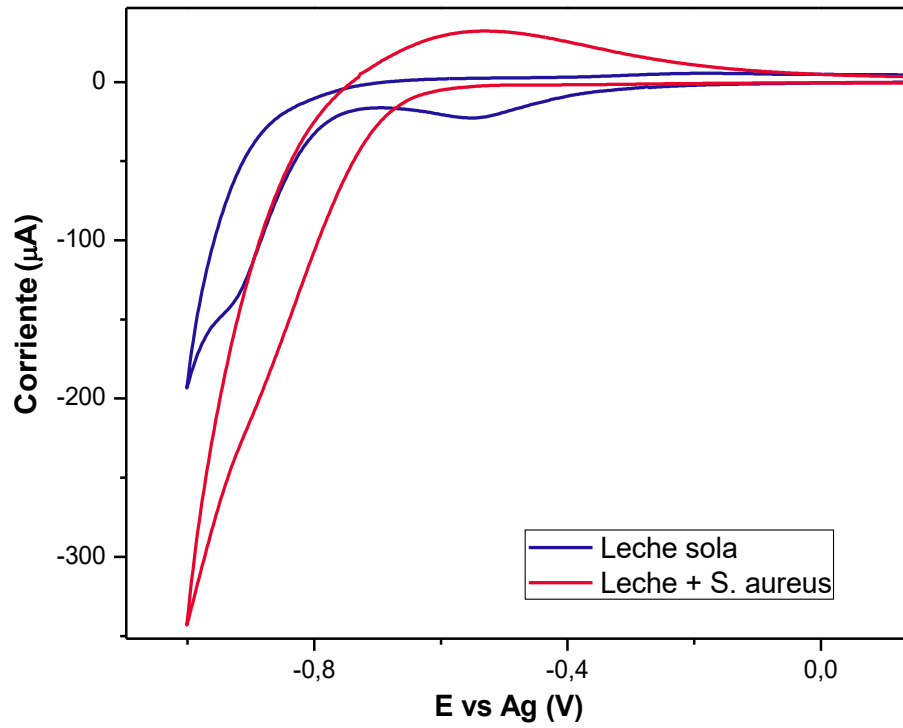


Figura 21. Voltamperogramas cíclicos del electrodo modificado Cys/PPG en muestras de leche comercial. Los análisis se llevaron a cabo a una concentración de *S. aureus*  $3 \times 10^4$  UFC/mL.

#### 4. Conclusiones

- Se diseñó un biosensor amperométrico con electrodos serigrafados de oro modificados mediante quimisorción de cisteína unida covalentemente con la peroxidasa de pasto guinea extraída y semipurificada con actividad volumétrica de 470 U/mL y 53,5% de rendimiento.
- Por medio de voltamperometría cíclica se demostró que el bioconjugado de cisteína y peroxidasa de pasto guinea (CysPPG) presenta actividad electroquímica ya que el electrodo modificado presenta mayor conductividad eléctrica, indicando que la cisteína favorece la transferencia de electrones desde el sitio activo de la enzima hasta la superficie del electrodo.
- El biosensor enzimático presentó una respuesta en corriente a diferentes concentraciones de *S. aureus* a un potencial de trabajo de -810mV con un rango lineal en un intervalo de  $3 \times 10^2$ - $3 \times 10^8$  UFC/mL, presentando un valor de coeficiente de correlación  $R^2=0.9816$ , nivel mínimo de detección de  $3 \times 10^2$  UFC/mL, y sensibilidad de calibrado  $0.2696 \text{ A/UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ .
- Fue posible detectar la presencia de la bacteria en muestras de leche contaminadas con el microorganismo. Esto indica que el biosensor fabricado puede convertirse en una potencial herramienta analítica para la detección rápida de bacterias en alimentos.

### 5. Recomendaciones

- Hacer un estudio de comparación de los resultados del método propuesto en este trabajo con otras bacterias del género *Staphylococcus* como *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus* y *S. aureus* resistente a meticilina.
- Usar el método propuesto en este trabajo del electrodo modificado con PPG para la detección de *S. aureus* en otras muestras de alimentos propensos a transmitir ETA como carnes rojas, carnes de aves, otros lácteos.

### Referencias bibliográficas

- Abab, J. (2010) Desarrollo de microsensores de oxígeno disuelto para la caracterización de biopelículas. (Tesis de pregrado). Universidad autónoma de Barcelona. España.
- Abbaspou, A., Norouz, F., Nooria, A., Soltani, N. (2015) Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of *Staphylococcus aureus*. *Biosensors and Bioelectronics*.15 (68), 149-155.
- Abd-El-Aziz, A., Carraher, C., Pittman, C., Zeldin, M. (2009) Macromolecules Containing Metal and Metal-Like Elements, Volume 9: Supramolecular and Self-Assembled Metal-Containing Materials. New Jersey: John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-470-52708-5.
- Abdelhamid, H., Wu, H. (2017) Selective biosensing of *Staphylococcus aureus* using chitosan quantum dots. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 188, 50-56.
- Abushelaibi, A., Sofos, J., Samelis, J., Kendall, P. (2003) Survival and growth of Salmonella in reconstituted infant cereal hydrated with water, milk or apple juice and stored at 4°C, 15°C and 25°C. *Food Microbiol*, 20: 17-25.
- Aganga, A., Tshwenyane, S. (2004). Potentials of Guinea Grass (*Panicum maximum*) as forage crop in livestock production. *Pakistan Journal of Nutrition* 3 (1): 1 – 4.
- Argudín, M., Mendoza, M., Rodicio, M. (2010) Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*. 2, 1751-1774.
- Arguello, I., Roustan, I. (2000) Purificación y determinación de actividad enzimática de la catalasa en *Staphylococcus aureus*. *Encuentro*, 52. 54-66.

- Arora, P., Sindhu, A., Dilbaghi, N., Chaudhury, A. (2011). Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosensors & Bioelectronics*, 28(1), 1-12.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S. (2003) An Extensive Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Due to Low-Fat Milk in Japan: Estimation of Enterotoxin A in the Incriminated Milk and Powdered Skim Milk. *Epidemiol Infect*, 130 (1): 33-40.
- Bard, A., Faulkner, L. (1980) Electrochemical methods: fundamentals and applications, 2nd ed. United States, John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 13:978-0-471-04372-0.
- Bautista, L., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M. (1998) A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Appl Environ Microbiol*, 54:566-569.
- Benintende, S., Sánchez, C., Sterren, M., musante, C., Chajud, A. (2009) Cátedra microbiología agrícola. Guía de trabajos prácticos. Facultad de ciencias agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos. Argentina.
- Bhardwaj, J., Devarakonda, S., Kumar, S., Jang, J. (2017) Development of a Paper-based Electrochemical Immunosensor using an Antibody-Single Walled Carbon Nanotubes Bioconjugate Modified Electrode for Label-free Detection of Foodborne Pathogens. *Sensors and Actuators B*. 253, 115-123.
- Boynukara, B., Gulhan, T., Alisarli, M., Gurturk, K., Solmaz, H. (2008) Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *Int. J Food Microbiol*, 125(2):209-211.

- Braiek, M., Rokbani, K., Chrouda, A., Mrabet, B., Bakhrouf, A., Maaref, A., Jaffrezic, N. (2012) An Electrochemical Immunosensor for Detection of *Staphylococcus aureus* Bacteria Based on Immobilization of Antibodies on Self-Assembled Monolayers-Functionalized Gold Electrode. *Biosensors*. 2(4), 417-426.
- Brooks, J., Mirhabibollahi, B., Kroll, R. (1990) Sensitive enzyme-amplified electrical immunoassay for protein A-bearing *Staphylococcus aureus* in foods. *Applied and environmental microbiology*, 56(11), 3278-3284.
- Castañón, C. (2012) Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evid Med Invest Salud*. 5 (3): 79-84.
- Centeno, D. (2017) Semi-purificación y caracterización parcial de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*). Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander, Facultad de ciencias básicas, Escuela de química.
- Centeno, D., Solano, X., Castillo, J. (2017) a new peroxidase from leaves of guinea grass (*Panicum maximum*): A potential biocatalyst to build amperometric biosensors. *Bioelectrochemistry*. 116, 33-38.
- Che, X., Yuan, R., Chai, Y., Ma, L., Li, W., Li, J. (2009) Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on an electrode modified with DNA-L-cysteine-gold-platinum nanoparticles in polypyrrole film. *Microchim Acta* 167:159–165.
- Dirección de vigilancia y análisis de riesgo en salud pública, Instituto Nacional de Salud. (2018) Boletín epidemiológico semanal (BES) las enfermedades transmitidas por alimentos – ETA. Publicación en línea: ISSN 2357-6189.

- Do Carmo, L., Cummings, C., Linardi, V., Souza, R., Souza, J., De Sena, M., Shupp, J., Peres, K., Pereira, R., Jett, M. (2004). A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. *Foodborne Pathog Dis*, 1(4):241-246.
- Duquenne, M., Fleurot, I., Aigle, M., Darrigo, C. (2010) Tool for quantification of staphylococcal enterotoxin gene expression in cheese. *Appl. Environ Microbiol.* 76(5), 1367-1374.
- Elgrishi, N., Rountree, K., McCarthy, B., Rountree, E., Eisenhart, T., Dempsey, L. (2018) A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* 95, 197–206.
- Escamilla, V., Campuzano, S., Pedrero, M., Pingarrón, J. (2007) Development of an amperometric immunosensor for the quantification of *Staphylococcus aureus* using self-assembled monolayer-modified electrodes as immobilization platforms. *Electroanal* 19, 1476–1482.
- Escamilla, V., Campuzano, S., Pedrero, M., Pingarrón, J. (2008) Immunosensor for the determination of *Staphylococcus aureus* using a tyrosinase–mercaptopropionic acid modified electrode as an amperometric transducer. *Anal Bioanal Chem.* 391, 837–845.
- Evenson, M., Ward, M., Bernstein, R., Bergdoll, M. (1988) Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol.* 7 (4): 311-6.
- Ferri, T., Poscia, A., Santucci, R. (1998) Direct electrochemistry of membrane-entrapped horseradish. A voltammetric and spectroscopic study. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 44, 177–181.
- Flores, M., Rojas, R. (2005) Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México* 47(5) 388-390.

- García, P., Fernández, M., Paredes, F. (1996). Microbiología clínica aplicada. Madrid, España, Ediciones Díaz de Santos. ISBN: 9788479782818
- Genarina, V., Hanssen, H., Uribe, G. (1982) Técnicas de inmuno-peroxidasa en la detección de marcadores tumorales y antígenos virales. *Biomedica*, 2(3), 140-157.
- González, M. (2010) Actividades biocatalíticas dependientes de peróxido de hidrógeno. Estudio cinético de los mecanismos y diseño de biosensores específicos. Cuenca. Tesis doctoral. Universidad de castilla-la mancha, facultad de ciencias químicas, departamento de química-física. (56-58p).
- González, V., García, E., Ruiz, O., Cabezas, G. (2005). Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. CEIM/Dirección General de Universidades e Investigación. Madrid, España.
- Hennekinne, J., de Buyser, M., Dragacci, S. (2012) *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 815–836.
- Hernández, L., González, C. (2002). Introducción al análisis instrumental. Barcelona, España: Ariel S.A.
- Hidalgo, N. (2011) Caracterización químico-física de la peroxidasa de palma *Chamaerops excelsa*. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca, Departamento de química-física.
- Hong, J., Ghourchian, H. (2007) Direct electron transfer of horseradish peroxidase on Nafion-cysteine modified gold electrode *Electrochimica Acta* 52, 6261–6267.

Huayhuas, B. (2015) Electrodo impresos modificados con monocapas autoensambladas para la determinación de metronidazol en muestras reales. (Tesis de pregrado), Universidad Nacional de Ingeniería. Lima, Perú.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) I. Microorganismos de los Alimentos: Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria. Editorial Acribia. 2004; Zaragoza (España): p367.

Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., Makino, S. (2005) Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H. *Appl Environ Microbiol.* 71:2793–5.

Jayaroo B. (1999) A study on the prevalence of pathogens in bulk tank milk. *En: Natl Mastitis Counc.* 148-149.

Jimenez, C., León, D. (2009) Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *VITAE*, 1(16), 144-154.

Joaquín, B., Hernandez, A., Perez, J., Herrera, J., García, G., Trejo, C. Fertilización nitrogenada y momento de cosecha en la producción de semilla de pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.): Parámetros y componentes de rendimiento. *Pasturas tropicales*, 23 (2), 10-15.

Kérouanton, A., Hennekinne, J., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., De Buyser, M. (2007) Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol.* 115 (3): 369-75.

Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning, *Genetics and Molecular Research*, 2(1), 63–76.

- Le, H., He, F., Jiang, T., Nie, L., Yao, S. (1995) A goat-anti-human IgG modified piezoimmunosensor for *Staphylococcus aureus* detection. *Journal of Microbiological Methods*, 23, 229-234.
- Liu, Y., Geng, T., Gao, J. (2008) Layer-by-layer immobilization of horseradish peroxidase on a gold electrode modified with colloidal gold nanoparticles. *Microchim Acta* 161: 241–248.
- López, S. (2017) Transferencia electrónica directa a citocromo c inmovilizado sobre electrodos modificados. Aplicación en sensores amperométricos. Tesis doctoral. Universidad de Alicante, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Física.
- Love, J. C. Estroff, L. A.; Kriebel, J. Nuzzo, R. G. (2005) Whithesides, G. M. Selfassembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chem. Rev.* 105, 1103.
- Majumdar, T., Chakraborty, R., Raychaudhuri, U. (2013) Rapid Electrochemical Quantification of Food Borne Pathogen *Staphylococcus aureus* Based on Hydrogen Peroxide Degradation by Catalase. *Journal of The Electrochemical Society*, 160(4), G75-G78.
- Ministerio de Salud y Protección Social, Unidad de evaluación de riesgos para la inocuidad de los alimentos UERIA. Instituto Nacional de Salud INS. (2011) Identificación de riesgos biológicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia. Bogota D.C., Colombia.
- Morales, P., (2001) Síntesis y caracterización de óxidos cobalto-níquel para la reacción de formación de oxígeno. (Tesis de pregrado), Universidad autónoma del estado de México. Facultad de Química, Toluca, México.

- Moreno, A. Biosensores electroquímicos para la detección de aminas biógenas. (5-9p) Trabajo de grado, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de farmacia.
- Murinda, S., Nguyen, L., Ivey, S., Gillespie, B., Almeida, R., Draughon, F., Oliver, S. (2002) Molecular characterization of *Salmonella spp.* isolated from bulk tank milk and cull dairy cow fecal samples. *J Food Prot.* 65(7):1100-5.
- Novick, R. (2003) Mobile genetic elements and bacterial toxins: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* 49(2):93-105.
- Oliver, S., Boor, K., Murphy, S., Murinda, S. (2009) Food Safety Hazards Associated with Consumption of Raw Milk. *Foodborne Pathog Dis.* 6(7).
- Oliver, S., Jayarao, B., Almeida, R. (2005) Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis.* 2(2):115-29.
- Ordúz, A., Gutiérrez, J., Blanco, S., Castillo, J. (2019). Amperometric detection of triclosan with screen-printed carbon nanotube electrodes modified with Guinea Grass (*Panicum maximum*) peroxidase. *Universitas Scientiarum*, 24(2), 363-379.
- Padilla, C., Febles, G. (1980) Efecto del corte en la época seca y la distribución del fertilizante nitrogenado en la producción de semilla de pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 14, 295-304.
- Pinchuk, I., Beswick, E., Reyes, V. (2011) Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins.* 2(8), 2177-2197.
- Plata, K., Rosato, A., Wegrzym, G. (2009) *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Act Bioch Pol.* 56(4) 597-612.

- Radke, S., Alocilja, E. (2005) A high density microelectrode array biosensor for detection of *E. coli* O157:H7. *Biosens Bioelectron.* 20 (8): 1662–1667.
- Rishpon, J., Ivnitski, D. (1997) An amperometric enzyme-channeling immunosensor. *Biosens Bioelectron* 121, 195–204.
- Rohrbach, B., Draughon, F., Davidson, P., Oliver, S. (1992) Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. *J Food Prot.* 52(2):9397.
- Sakharov, I., Bautista, G., Sakharova, I., Rojas, A., Pletjuschkina, O. (1999) Peroxidasa de plantas tropicales. *Revista Colombiana de química*, 28(1), 97-106.
- Schwartz, C., Krall, J., Norton, L., Mckay, K., Kay, D., Lynch, R. (1983) Catalase and superoxide dismutase in *Escherichia coli*. Roles in resistance to killing by neutrophils. *The journal of biological chemistry.* 258(10), 6277-6281.
- Seo, K., Brackett, R., Hartman, N., Campbell, D. (1999) Development of a rapid response biosensor for detection of *Salmonella typhimurium*. *J Food Prot.* 62 (5): 431-437.
- Solano, X. (2016) Electrodo serigrafiado de grafeno modificado con peroxidasa de pasto guinea (*Panicum máximum*) para la detección enzimática de peróxido de hidrógeno. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander, Facultad de ciencias básicas, Escuela de química.
- Soto Varela, Z., Pérez Lavalle, L., Estrada Alvarado, D. (2016) Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Salud Uninorte.* 32 (1), 105-122.

Temas de Bacteriología y Virología Médica. Universidad de la Republica. Facultad de Medicina.

Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de higiene. (2006) 2nd edición.

Tian, Y., Mao, L., Okajima, T., Ohsaka, T. (2002) Superoxide Dismutase-Based Third-Generation Biosensor for Superoxide Anion, *Anal. Chem.* 74, 2428-2434

Tobón, S. (2017) Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Fac. Nac. Salud Pública*, 35(2).

Vargas, J., Castillo, J. (2016) Desarrollo de un prototipo de biosensor basado en peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) y nanotubos de péptidos inmovilizados sobre electrodos de oro para detección de peróxido de hidrógeno. *Avances en Química*, 11 (3).

Vargas, K., Vidal J., Olivera, M. (2018) Validación de método cualitativo para detección de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche para diagnóstico de mastitis bovina. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 21(1): 271-275

Welinder KG (1992) Plant peroxidases: structure, function relationships. In C Penel, T Gaspar, H Greppin, eds, *Plant Peroxidases. Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical and Physiological Aspects.* Université de Genève, Geneva, Switzerland, pp 1–24.

Wertheim, H., Melles, D. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*, 5: 751–62.

Xiao, Y., Ju, H., Chen, H. (1999) Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase-labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cysteamine monolayer. *Anal Chim Acta* 391: 73.

Yi, X., Huang-Xian, J., Hong-Yuan, C. (2000) Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase Immobilized on a Colloid/Cysteamine-Modified Gold Electrode. *Analytical Biochemistry*, 278, 22–28

Zelada, G., Avila, J., Blondeau, P., Riu, J., Rius, F. (2011) Label-free detection of *Staphylococcus aureus* in skin using real-time potentiometric biosensors based on carbon nanotubes and aptamers. *Biosensors and Bioelectronics* 31, 226– 232.