

# INMOVILIZACIÓN ORIENTADA DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella spp* EN ELECTRODOS DE ORO MODIFICADOS CON TIOUREA

## ORIENTED IMMOBILIZATION OF ANTIBODIES AGAINST *Brucella spp* IN THIOUREA-MODIFIED GOLD ELECTRODES

Pedro Matheus Romero,<sup>1</sup> Pedro Navarro Díaz.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Análisis Instrumental. Departamento de Análisis y Control.

Facultad de Farmacia y Bioanálisis. <sup>2</sup>Laboratorio de Electroquímica.

Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

Email: prmateus23@gmail.com

**Recibido:** 07-01-2022

**Aceptado:** 10-02-2022

### RESUMEN

Se realizó la inmovilización del bioreceptor inmunológico (anticuerpo específico contra *Brucella spp*) en la superficie del electrodo modificado mediante la formación de monocapas autoensambladas sobre la superficie de oro, con el fin de realizar la detección de *Brucella spp* en soluciones acuosas contaminadas in vitro. Para formar las monocapas orientadas y ordenadas sobre la superficie del metal, se planteó el uso de compuestos anfifílicos con átomos de azufre en uno de sus extremos y grupos aminos en el otro. Al unir los átomos de azufre a la superficie de oro, el extremo con los grupos aminos de la molécula anfifílica queda libre para fijar el fragmento constante (Fc) de los anticuerpos conformados por grupos carboxílicos. De esta forma, se planteó inmovilizar el elemento de reconocimiento mediante la preparación de monocapas autoensambladas de tioles sobre superficies de oro. Esta metodología permite exponer al medio ligandos con afinidad específica (anticuerpos) por un analito particular (antígeno), proporcionando una estructura molecular ordenada bidimensional que se obtiene tras la quimisorción oxidativa de tioles sobre superficies de oro, la cual permitió la inmovilización de los anticuerpos ( $Ac^+$ ) que interaccionaron con el antígeno. Los resultados obtenidos mediante voltametrías cíclicas (VC), mostraron que una vez establecidos algunos parámetros relacionados con la efectividad de la unión antígeno-anticuerpo (pH, velocidad de barrido y tiempo de incubación del  $Ac^+$ ), se obtiene una mayor estabilidad en dicha unión.

**Palabras Claves:** inmunosensores, electrodos modificados, inmovilización orientada, *Brucella spp*, anticuerpo, especificidad, selectividad.

**Pedro Matheus Romero:** Licenciatura en Química: Universidad de Los Andes (ULA), Mérida. Venezuela. Magister Scientiae (MSC. en Química Aplicada, Mención Electroquímica): Universidad de Los Andes (Venezuela). Doctorado (Dr. en Tendencias Actuales en Química Inorgánica y Avanzada): Universidad Autónoma de Madrid (España). Profesor Titular a Dedicación Exclusiva en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Departamento de Análisis y Control. Universidad de Los Andes (ULA), Mérida - Venezuela. Su interés académico está dirigido a: Electroquímica fundamental, Sensores y Biosensores y Análisis Instrumental. **Pedro Navarro Díaz:** Es profesor de la Facultad de Ciencias, departamento de Química de la Universidad de Los Andes (ULA). Obtuvo la licenciatura en Química en la ULA. Obtuvo su doctorado en la Universidad de Lyon, Francia. Su interés en investigación se ha enfocado en electroanalítica, en la preparación de electrodos de pasta de carbón, modificados. Realiza investigación en equilibrios en solución, utilizando técnicas electroquímicas. En el área de ciencias de la salud, realiza estudios de determinación de elementos trazas en muestras clínicas.

## ABSTRACT

Immobilization of the immunological bioreceptor (specific antibody against *Brucella* spp) was performed on the surface of the modified electrode by forming self-assembling monolayers on the gold surface, in order to perform the detection of *Brucella* spp in contaminated aqueous solutions in vitro. To form the monolayers oriented and ordered on the metal surface, the use of amphiphilic compounds with sulfur atoms at one end and amino groups at the other one, is proposed. By joining the sulfur atoms to the gold surface, the end with the amino groups of the amphiphilic molecule is free to fix the constant fragment (Fc) of the antibodies made up of carboxylic groups. In this way, it has been proposed to immobilize the recognition element by preparing self-assembled monolayers of thiols on a gold surface. This methodology allows exposing to the medium, ligand with specific affinity (antibodies) for a particular analyte (antigen), providing an ordered two-dimensional molecular structure that is obtained after oxidative chemisorption of thiols on gold surfaces, which allowed the immobilization of antibodies (Ac+) that interacted with the antigen. The results obtained by cyclic voltammetry (CV) showed that some the parameters related to the effectiveness of the antigen-antibody binding have been established (pH, scanning speed and Ac+ incubation time), greater stability is obtained in said binding.

**Key words:** immunosensors, modified electrodes, targeted immobilization, *Brucella* spp, antibody, specificity, selectivity.

## Introducción

Los microorganismos se encuentran presentes inevitablemente en el ambiente y en todo tipo de alimentos y materiales biológicos. Por ello es muy importante su detección temprana para la prevención y control de las enfermedades. Son diversos los agentes patógenos para el ser humano que pueden encontrarse en alimentos, tales como en la leche o en los productos lácteos, tanto químicos como biológicos.

En la mayoría de los alimentos, los más frecuentes son los agentes biológicos, principalmente las bacterias, entre las que se encuentra *Brucella* spp que son bacterias intracelulares, inmóviles y de crecimiento lento. Este microorganismo es el causante de la brucelosis, enfermedad infectocontagiosa de curso crónico que afecta tanto al hombre como a los animales domésticos, la fauna silvestre y los mamíferos marinos.<sup>1,2</sup>

La brucelosis es una de las infecciones más fáciles de contraer en un laboratorio, aunque las personas que no trabajan con animales o tejidos, se suelen infectar al ingerir productos lácteos no pasteurizados. La detección inmunológica de bacterias, virus, parásitos y toxinas ha demostrado ser más sensible, específica y reproducible, debido en gran parte a la producción de anticuerpos específicos de manera rápida y económica. Debido a la gran competencia de la resistencia bacteriana, se tiene la necesidad de implementar una estrategia que detecte la presencia de *Brucella* spp en soluciones acuosas contaminadas in vitro con técnicas más sensibles y rápidas, cuyos resultados sean utilizados como alarma para la detección de diferentes microorganismos. En este aspecto, el desarrollo de biosensores, específicamente inmunosensores, ha favorecido la detección de diversos microorganismos en el área alimentaria, bioanalítica y medioambiental.<sup>3-5</sup>

Por consiguiente, el diseño de inmunosensores se ha basado en una serie de pasos que permitan la detección del microorganismo de interés; estos pasos son: selección y preparación del transductor, selección del bioreceptor

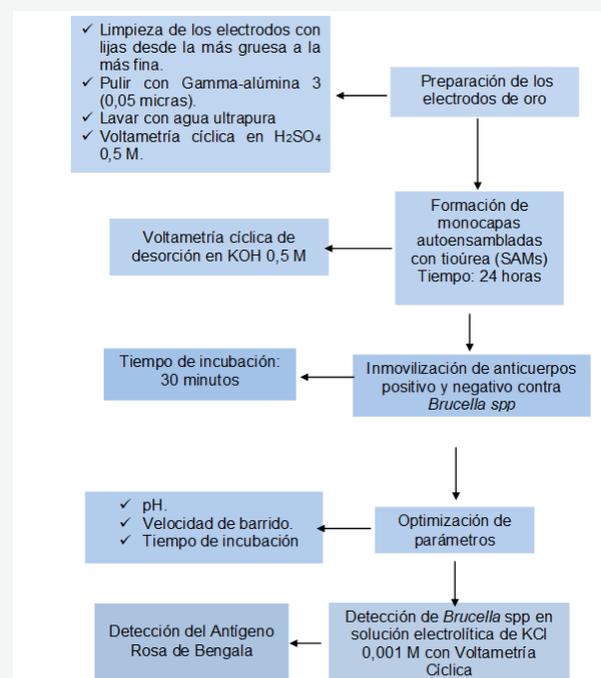
inmunológico (anticuerpo), inmovilización del bioreceptor inmunológico en la superficie del transductor y transducción del evento de bioreconocimiento (unión antígeno-anticuerpo).<sup>6-8</sup>

Entre las ventajas de los biosensores se destacan: alta sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, ampliación de la vida media del dispositivo utilizando materiales estables y resistentes, son de fácil manejo, bajo costo y corto tiempo de análisis, lo que los hace versátiles en el control de procesos, son muy eficientes, fáciles de operar y transportar, automatizables, incorporables en sistemas microscópicos y con su uso se pueden realizar análisis múltiples, además de que los resultados se pueden obtener en tiempo real.<sup>9</sup>

En esta investigación se realizó la inmovilización del bioreceptor inmunológico en la superficie del electrodo modificado con monocapas autoensambladas sobre la superficie de oro, con el fin de realizar la detección de *Brucella* spp en soluciones acuosas contaminadas in vitro.

## Desarrollo

El estudio se realizó según el diagrama que se presenta a continuación:



## Materiales y Métodos

1. La preparación de las superficies de oro, así como la caracterización y determinación del área efectiva del electrodo y la formación de monocapas autoensambladas de tiourea (SAM/TOU), fueron realizadas según protocolos realizados por Matheus y colaboradores.<sup>10-13</sup>

Una vez que se modificaron los electrodos y antes de medir la respuesta de *Brucella* spp en las soluciones acuosas contaminadas in vitro, se revisaron las condiciones de trabajo con respecto a pH, velocidad de barrido y tiempo de incubación, utilizando para ello el anticuerpo como control positivo ( $Ac^+$ ) y el antígeno Rosa de Bengala (antígeno Brucelar Amortiguado) del kit MICSA/MÉXICO. Luego de la optimización de los parámetros antes mencionados, se realizaron VC para comprobar la inmovilización del anticuerpo positivo anti-*Brucella* y la posterior detección del antígeno Brucelar Amortiguado.

Para las medidas electroquímicas, se utilizó un celda construida en vidrio que consta de un sólo compartimiento, con una tapa también de vidrio, con tres orificios para introducir los electrodos, y otros dos orificios para la entrada y salida de gases; esta celda está conectada a un cilindro de Nitrógeno y al potencióstato analizador Autolab-USB modelo PGSTAT12/30 conectado a un PC Pentium 4. Como electrodos de trabajo se usaron hilos de oro con 99,99 % de pureza, de 0,50 mm de diámetro y una longitud aproximada de 15 mm e hilos de oro modificados con tiourea 5 mM (Au/SAM/TOU) con las mismas características. Como electrodo auxiliar se utilizó un hilo de platino con 99,9 % de pureza y como electrodo de referencia Ag/AgCl, en solución saturada de KCl 3M. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente, presión atmosférica y atmósfera saturada de Nitrógeno.

El material de vidrio fue previamente lavado con solución sulfocrómica (10 gramos de  $K_2Cr_2O_7$  disueltos en 90 mL de agua y 360 mL de ácido sulfúrico); debe tenerse extremo cuidado al manipular esta solución. Posteriormente el material fue lavado con

abundante agua destilada y finalmente con agua ultrapura (18 M $\Omega$ ).

### 2. Optimización del pH.

Se realizaron VC utilizando electrodos de oro modificados con tiourea 5 mM a diferentes valores de pH. Los electrodos utilizados fueron incubados durante 30 minutos en una solución de 500  $\mu$ l de buffer fosfato con 50  $\mu$ l de  $Ac^+$  a temperatura ambiente.

### 3. Optimización de la Velocidad de Barrido.

Con el fin de seleccionar la velocidad de barrido apropiada para observar la respuesta electroquímica de la unión entre la monocapa de tiourea y  $Ac^+$  contra *Brucella* spp, a los electrodos de oro modificados (Au/TOU) se les realizaron VC en KCl 0,001 M siendo estos previamente incubados durante 30 minutos en una solución de 500  $\mu$ l de buffer fosfato (a pH 6,42) con 50  $\mu$ l de  $Ac^+$ . Estas voltametrías fueron realizadas a velocidades de: 5, 20, 50 y 100 mV/s.

### 4. Optimización del tiempo de incubación en el anticuerpo positivo ( $Ac^+$ ) contra *Brucella* spp.

Posterior a la formación de la monocapa de tiourea se procedió a seleccionar el tiempo de incubación de los electrodos de oro modificados en el  $Ac^+$  contra *Brucella* spp. Las VC se realizaron en solución de KCl 0,001 M a ventana de potencial desde 0 a +800 mV vs Ag/AgCl.

### 5. Inmovilización del $Ac^+$ contra *Brucella* spp y posterior adición de diferentes volúmenes del Antígeno Rosa de Bengala.

Los electrodos de oro modificados con tiourea fueron incubados durante 30 minutos en una solución de 500  $\mu$ l de buffer fosfato (a pH 6,42) conteniendo 200  $\mu$ l de  $Ac^+$ .

Seguidamente se agregaron a la solución de KCl 0,001 M presente en la celda, volúmenes del Antígeno Rosa de Bengala (antígeno Brucelar amortiguado) proveniente del kit MICSA / MÉXICO. Estos volúmenes fueron: 20, 40, 80 y 100  $\mu$ l.

## Resultados

### 1. Preparación y caracterización electroquímica de los electrodos de oro.

La preparación de los electrodos de oro se llevó a cabo según el procedimiento descrito. En la figura 1, se presenta la VC en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M de un electrodo de hilo de oro 11, a 100 mV/s y ventana de potencial desde +0,6 V hasta +1,6 V, donde se observan los picos anódico y catódico del óxido. Estos picos se encuentran próximos a +1,32 V y +0,81 V respectivamente, característicos de una superficie de oro policristalina limpia.

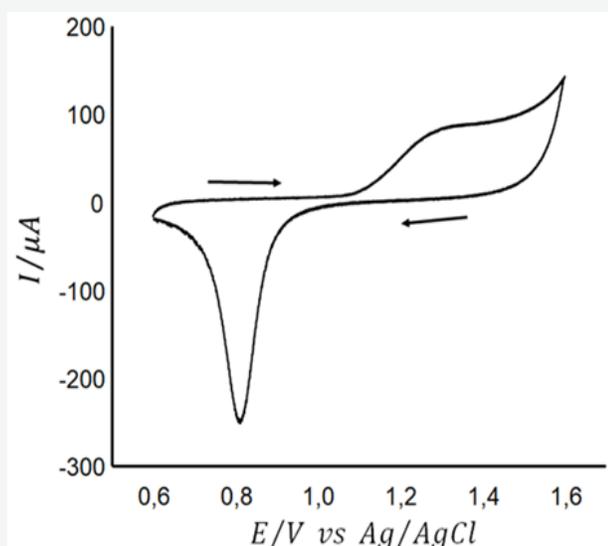


Figura 1. Voltametría cíclica en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M de un electrodo de hilo de oro. Velocidad de barrido: 100 mV/s.

### 2. Formación de monocapa de tioles (SAMs) y la estabilidad de unión Au/TOU.

Con el fin de comprobar la presencia de la monocapa y la estabilidad de la unión Au/TOU, se incubaron los electrodos de oro en tiourea 5 mM durante 24 horas. En la figura 2 se observan las VC en KOH 0,5 M, a ventana de potencial que va desde -1,2 hasta -0,2 V vs Ag/AgCl a 100 mV/s. En la voltametría (A) se evidencia la desorción reductiva de la monocapa de tiourea a potencial de aproximadamente -0,93 V, observándose una buena definición de la señal, característica del desprendimiento de la monocapa de tiourea sobre el oro. Al realizar cuatro barridos consecutivos

(voltametría B) observamos que la señal a -0,93 V, aún permanece bien definida, aunque como es lógico pensar, con menor intensidad que en el primer barrido. En conclusión, las monocapas de tiourea sobre oro presentan una gran estabilidad y se mantienen incluso cuando los electrodos son sometidos a diferentes ensayos electroquímicos (sucesivas VC). Cuando se realizó la desorción de la monocapa 3 meses después de haber modificado el electrodo, aún se aprecia la señal a -0,93 V con una menor intensidad, confirmando la gran estabilidad que presentan dichas monocapas (experimentos no reportados).

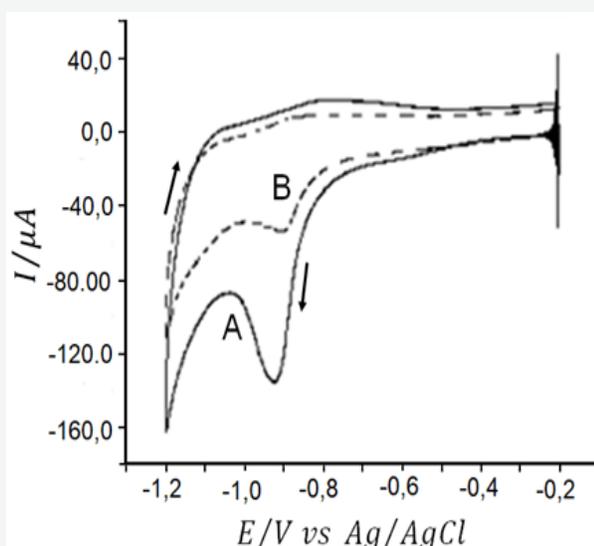


Figura 2. Voltametrías cíclicas de desorción en KOH 0,5 M de un electrodo de hilo de oro modificado con tiourea (Au/TOU). Velocidad de barrido 100 mV/s. (A) primer barrido y (B) cuarto barrido.

### Optimización del pH

En la figura 3 se observan las variaciones de la intensidad de corriente con respecto a los diferentes pH en estudio (3,65; 6,42; 7,00 y 9,40), datos obtenidos de las VC realizadas a los electrodos de oro modificados con tiourea 5 mM en solución de KCl 0,001 M, con ventana de potencial entre 0 y +800 mV vs Ag/AgCl, con velocidad de barrido de 100 mV/s. Antes de realizar las VC y por un tiempo de 30 minutos los electrodos fueron incubados en una solución de 500  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato con 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{Ac}^+$ .

El análisis de la VC realizada a pH 6,42

muestra una señal de oxidación a 645 mV correspondiente a la corriente de pico anódica ( $I_{pa} = 22,2 \mu A$ ). Así mismo, se aprecia una señal de reducción a 110 mV que corresponde a la corriente de pico catódica ( $I_{pc} = 13,3 \mu A$ ). A pH 3,65, 7,00 y 9,40 las señales de oxidación y reducción se observan levemente desplazadas a potenciales más positivos con una  $I_{pa}$  y un  $I_{pc}$  de menor intensidad (gráficas no presentadas).

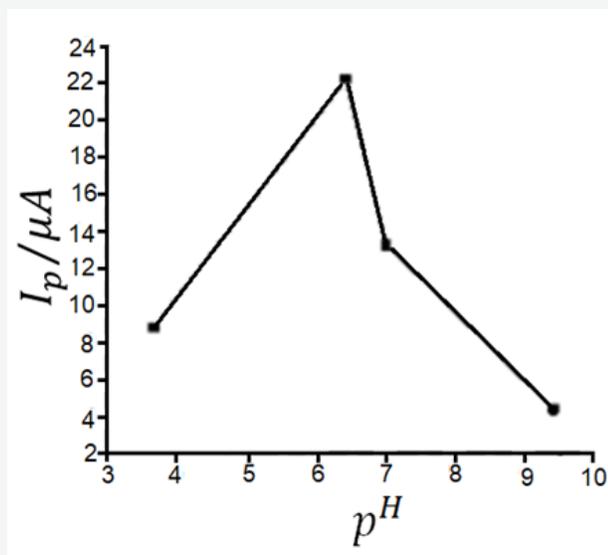


Figura 3. Intensidad de corriente de pico anódica ( $\mu A$ ) vs pH en electrodo de Au/TOU incubado durante 30 minutos en  $Ac^+$ .

#### 4. Optimización de la velocidad de barrido.

Con el fin de seleccionar la velocidad de barrido apropiada para que ocurra la respuesta electroquímica de la unión entre la monocapa de tioúrea y  $Ac^+$  contra *Brucella* spp, a los electrodos de oro modificados se les realizaron VC en KCl 0,001 M con ventana de potencial entre 0 y +800 mV vs Ag/AgCl, siendo estos electrodos incubados durante 30 minutos en una solución de 500  $\mu l$  de buffer fosfato (a pH 6,42) con 50  $\mu l$  de  $Ac^+$ .

Estas voltametrías fueron realizadas a velocidades de: 5, 20, 50 y 100 mV/s (resultados no presentados) y mostraron que a medida que aumenta la velocidad de barrido, se obtienen corrientes de pico, tanto anódica como catódica, con mayor intensidad y mejor definición. En la figura 4 se observan las variaciones de la intensidad de corriente de pico anódica con respecto a

las diferentes velocidades de barrido.

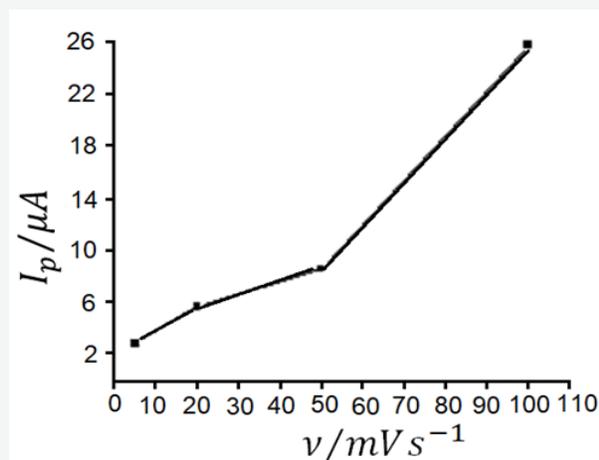


Figura 4. Intensidad de corriente de pico anódica ( $\mu A$ ) vs velocidades de barrido, sobre electrodos de oro modificados con TOU incubados durante 30 minutos en  $Ac^+$  a pH 6,42.

#### 5. Optimización del tiempo de incubación de los electrodos de oro modificados con tioúrea en el anticuerpo positivo ( $Ac^+$ ) contra *Brucella* spp.

Posterior a la formación de la monocapa de tioúrea se procedió a seleccionar el tiempo de incubación de los electrodos de oro modificados en el  $Ac^+$  contra *Brucella* spp. Las VC se realizaron en solución de KCl 0,001 M a ventana de potencial desde 0 a +800 mV vs Ag/AgCl. En la figura 5 se observan las variaciones de la intensidad de corriente con respecto a los diferentes tiempos de incubación en el  $Ac^+$  (datos obtenidos de las VC realizadas).

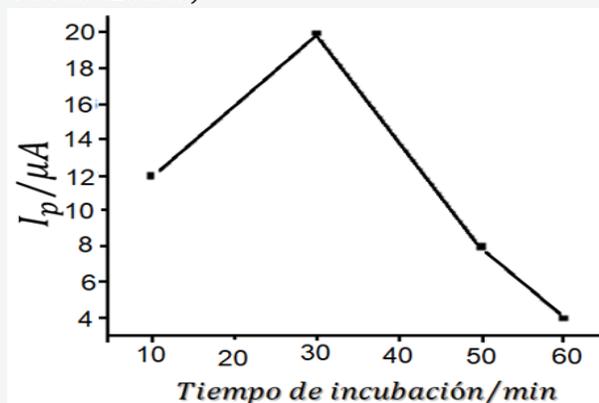


Figura 5. Intensidad de corriente de pico anódica ( $\mu A$ ) en función de los diferentes tiempos de incubación (minutos) en  $Ac^+$  para un electrodo Au/TOU a pH 6,42.

## 6. Inmovilización del Ac<sup>+</sup> contra *Brucella* spp y posterior adición de diferentes volúmenes del Antígeno Rosa de Bengala.

Una vez realizada la preparación de los electrodos y su posterior incubación en Ac<sup>+</sup> durante 30 minutos, se procedió a realizar VC agregando a la solución de KCl 0,001 M diferentes volúmenes del antígeno Rosa de Bengala.

Estas VC se realizaron a ventana de potencial de 0 a +850 mV vs Ag/AgCl y velocidad de barrido de 100 mV/s. En la Tabla 1 se observan los resultados obtenidos en las VC realizadas, donde: (A) con 20  $\mu$ l de antígeno Rosa de Bengala, (B) con 40  $\mu$ l de antígeno Rosa de Bengala, (C) con 80  $\mu$ l de antígeno Rosa de Bengala y (D) con 100  $\mu$ l de antígeno Rosa de Bengala.

La figura 6 muestra los resultados obtenidos cuando se representan las corrientes de pico anódicas en función de los volúmenes de antígeno Rosa de Bengala agregados a la solución electrolítica de KCl 0,001 M, en electrodo de Au/TOU incubado durante 30 minutos en Ac<sup>+</sup> a pH 6,42.

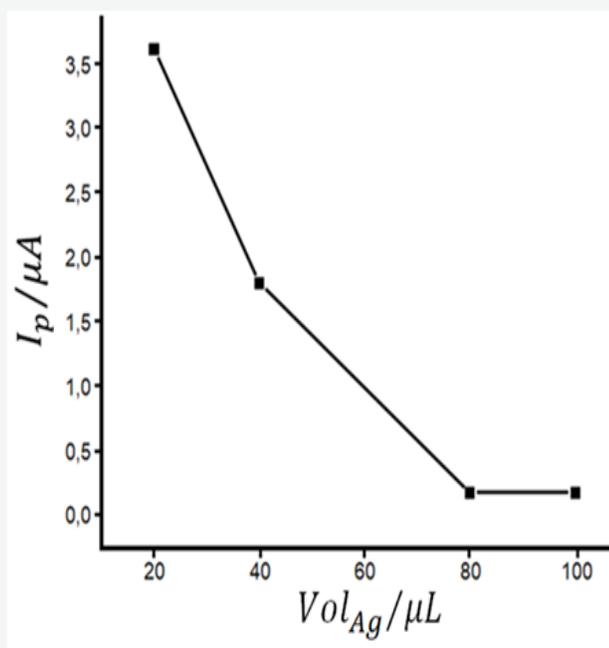


Figura 6. Intensidad de corriente de pico anódica, en función de los diferentes volúmenes del antígeno Rosa de Bengala agregados a la solución electrolítica de KCl 0,001 M, en electrodo de Au/TOU incubado durante 30 minutos en Ac<sup>+</sup> a pH 6,42.

## Discusión

### Optimización del pH

Con respecto a lo observado en la figura 3, se puede decir que el pH de 6,42 es el más apropiado para la inmovilización del Ac<sup>+</sup> dado que se obtiene una mayor intensidad de corriente (22,2  $\mu$ A), indicativo de que existe transferencia de e<sup>-</sup> cuando se realiza la inmovilización del Ac<sup>+</sup>. A pH 3,65, 7,00 y 9,40 se aprecian valores de intensidad de corriente más bajos; 8,8, 13,3 y 4,4  $\mu$ A, respectivamente. Esto confirma los resultados obtenidos por diferentes autores en cuanto al valor de pH más apropiado para las condiciones de vida óptima de *Brucella* spp en diferentes medios<sup>2,14-16</sup> En este sentido, podríamos decir que a medida que el pH se hace más ácido o más básico, disminuye la posibilidad de unión del Ac<sup>+</sup> al electrodo modificado.

### Optimización de la velocidad de barrido

Los resultados obtenidos en la figura 4 indican que la velocidad de barrido más apropiada es de 100 mV/s., por ser a esta velocidad donde se obtiene la máxima corriente de pico (25,7  $\mu$ A), debido a que es importante establecer un compromiso entre una buena definición de la señal y un máximo valor de corriente (resultados obtenidos de las VC).

Cuando se realizaron ensayos a velocidades de barrido superiores a 100 mV/s., no se observaron picos de corriente, lo que indica que probablemente la superficie del electrodo modificado se saturó con el Ac<sup>+</sup>, lo que impidió el transporte de los electrones desde el electrodo al analito.

### Optimización del tiempo de incubación de los electrodos de oro modificados con tioúrea en el anticuerpo positivo (Ac<sup>+</sup>) contra *Brucella* spp.

Los resultados obtenidos indican que cuando el tiempo de incubación alcanza los 30 minutos la corriente de pico anódica (I<sub>pa</sub>) alcanza 20  $\mu$ A, lo que indica la detección y posible inmovilización del Ac<sup>+</sup>, siendo el tiempo mínimo necesario para obtener una

buena definición de la señal de corriente de pico con buena intensidad de corriente. Al hacer la incubación en el Ac<sup>+</sup> durante 10 minutos, 50 minutos y 1 hora, las corrientes de pico disminuyen.

Al incubar durante 1 hora, pareciera que se alcanza la saturación del medio y comienza a desprenderse parte del Ac<sup>+</sup> inmovilizado.

### Inmovilización del Ac<sup>+</sup> contra *Brucella spp* y posterior adición de diferentes volúmenes del Antígeno Rosa de Bengala.

Los resultados obtenidos en la tabla 1 muestran que a medida que aumenta el volumen del antígeno en solución, disminuye la corriente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) y el potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) se desplaza a valores menos positivos. De igual forma cuando se

analizó la figura 6, se pudo observar que a medida que se aumentan los volúmenes del antígeno Rosa de Bengala agregados a la solución electrolítica, disminuyen los valores de intensidad de corriente hasta llegar a la saturación del electrodo (a partir de los 80  $\mu$ l). Por tanto, a medida que ocurre la adsorción del inmunocomplejo en el electrodo de trabajo, este se bloquea impidiendo el flujo de electrones con facilidad, produciendo una disminución en la corriente de pico. Como se pudo observar el volumen mínimo necesario para obtener la corriente de pico más alta fue de 20  $\mu$ L. Sería interesante medir las corrientes de pico a volúmenes de Rosa de Bengala menores a 20  $\mu$ L y así poder obtener con exactitud el límite de detección y el límite de cuantificación.

**Tabla 1.** Valores de  $E_{pa}$ ,  $I_{pa}$ ,  $E_{pc}$  e  $I_{pc}$  para cada voltametría cíclica conteniendo diferentes volúmenes del antígeno Rosa de Bengala.

Electrodo	$E_{pa}$ (mV)	$I_{pa}$ ( $\mu$ A)	$E_{pc}$ (mV)	$I_{pc}$ ( $\mu$ A)
A	+583,30	+3,63	+165,58	-9,09
B	+532,76	+1,81	+200,35	-1,81
C	+523,09	+0,18	+200,35	-0,18
D	+326,19	+0,18	+200,35	-0,18

### Conclusión

Los estudios de pH, velocidad de barrido y tiempo de incubación del Ac<sup>+</sup>, mostraron que para alcanzar una mayor estabilidad de la unión antígeno-anticuerpo, se debe utilizar un pH de 6,42, una velocidad de barrido de 100 mV/s y un tiempo mínimo de incubación de 30 minutos.

Se encontró que el volumen mínimo necesario del antígeno Rosa de Bengala fue de 20  $\mu$ L, ya que con este volumen se obtuvo la corriente de pico más alta. Una vez que se agregó mayor cantidad del antígeno, disminuyen los valores de intensidad de corriente hasta llegar a la saturación del electrodo. Sería interesante medir las corrientes de pico a volúmenes de Rosa de Bengala menores a 20  $\mu$ L y así poder obtener con exactitud el límite de detección y el límite de cuantificación.

La voltametría cíclica mostró ser una herramienta muy útil para el diagnóstico de *Brucella spp* ya que se pudo inmovilizar y detectar la presencia del Ac<sup>+</sup> y comprobar la unión antígeno-anticuerpo.

El tiempo requerido para el análisis de muestras utilizando el biosensor diseñado en

esta investigación (Au/TOU/Ac+) es de aproximadamente 30 minutos, lo que representa una ventaja frente a las técnicas microbiológicas clásicas, donde son necesarias aproximadamente 48 horas.

► Las monocapas de tiourea autoensambladas por quimisorción sobre oro, constituyen una herramienta versátil para la modificación de superficies y continúan siendo un medio ideal para la inmovilización de Ac<sup>+</sup>. Esta monocapa es estable por tiempo prolongado a pesar de someterse a sucesivos ensayos electroquímicos y puede ser utilizada 24 horas después de ser preparada.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Laboratorio de Electroquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes y a su Grupo de Investigación por facilitar sus instalaciones y equipos para la realización de este trabajo.

## Referencias

- 1.- Prescott L, Harley J, Klein D. 2002. Microbiology. 5ta. Ed. Madrid (España). Editorial McGraw Hill. Pp. 189.
- 2- Cloeckert A, Verger J, Grayon M, Paquet J, Garin B, Foster G. 2001. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp 2 locus. *Microbes Infect.* 3 (9): 729-38.
- 3- Hu R, Luan J, Kharasch E, Singamaneni S, Morrissey J. 2017. Aromatic functionality of target proteins influences monomer selection for creating artificial antibodies on plasmonic biosensors. *ACS Appl. Mater Interfac.* 9 (1): 145-151.
- 4- Xu M, Wang R, Li Y. 2017. Electrochemical biosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Talanta.* 162: 511-522.
- 5- Wang Ch, Kim J, Zhu Y, Yang J, Lee G-H, Lee S et al. 2015. An aptameric graphene nanosensor for label-free detection of small-molecule biomarkers. *Biosens. and Bioelec.* 71:222-229.
- 6- Zacco E. 2006. Diseño de nuevos materiales de afinidad universal. Aplicación en sensores. Grupo de Sensores y Biosensores. Barcelona, España, Departamento de Química, Universidad Autónoma de Barcelona.
- 7- Matheus P, Hernández N, Navarro P, Pacheco E. 2017. Estudio voltamétrico de la inmovilización de anticuerpos anti-*Escherichia coli* ATCC 25922 en electrodos de oro desnudos y modificados con tiourea. *Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*. 48 (1-2): 51-66.
- 8- Matheus P, Abad J, Navarro P, Belandria O, Hernández N, Fernández VM. 2009. Efecto de la polietilenimina en la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase) inmovilizada en electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de tioles (SAMs). *Avances en Química.* 4 (1): 37-43.
- 9- Jiménez C, León D. (2009) Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *Vitae.* 16 (1), 144-154.
- 10- Matheus P. 2003. Diseño y preparación de electrodos enzimáticos basados en

interacciones específicas: Desarrollo de estrategias para su estabilización [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental. Madrid (España).

- 11- Matheus P, Abad J, Fernández VM. 2007. Modificación de superficies de oro para la inmovilización orientada de peroxidasa de rábano recombinante. *Rev. Técn. Fac. Ing. Univ. Zulia.*; 30 (3): 225-35.
- 12- Matheus P, Abad J, Belandria O, Fernández L, Fernández VM. 2008. Influencia del Estado de Oxidación del ion cobalto en la estabilidad de electrodos modificados con monocapas SAM-TOA-ANTA-Con+-HRP-NHis. *Avances en Química.* 3 (2): 69-77.
- 13- Matheus P, Sánchez J, Navarro P, Pacheco E, Belandria O. 2018. Modificación de Superficies de Oro con tiourea como herramienta para la Inmovilización y Detección de Vitamina K3. *Acta Bioclínica.* 8 (16): 102-122.
- 14- Heidenreich B. 2010. Detection of Brucella in meat with an electrochemical biochip. *Journal of Food Protection.* 73 (11): 20-33.
- 15- Seco P, Verger J, Grayon M, Cloeckeaert A, Marin C, Zygmunt M. 2003. Epitope mapping of the Brucella melitensis BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 10 (4): 647-51.
- 16- Valdés Y, Hernández A. 2001. Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 17 (2): 98-107.