

**Detección electroquímica de *Escherichia coli* O157:H7 en agua utilizando biosensores
peptídicos modificados**

Juliana Paola Rodríguez Caicedo

Trabajo de grado para optar el título de Magíster en Ciencias y Tecnologías Ambientales

Director

Jose Luis Roperó Vega

Doctorado en Química

Codirectora

Johanna Marcela Flórez Castillo

Doctorado en Química

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

División de Ingenierías y Arquitectura

Maestría en Ciencias y Tecnologías Ambientales

2022

A Dios por permitirme alcanzar un logro más,

A mi mamá y mi hermana por apoyarme y acompañarme siempre,

A todas las personas que hicieron parte de este proceso,

Mil gracias.

Contenido

Introducción	10
1 Detección electroquímica de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en agua utilizando biosensores peptídicos modificados	13
1.1 Objetivos	13
1.1.1 Objetivo general.....	13
1.1.2 Objetivos específicos	13
2 Marco referencial.....	13
2.1 Marco teórico	13
2.1.1 Biosensor.....	14
2.1.1.1 Componente biológico.....	14
2.1.1.2 Componente transductor.....	14
2.1.2 Clasificación de los biosensores	15
2.1.2.1 Clasificación de acuerdo con el elemento de reconocimiento biológico. ..	15
.....	15
2.1.2.2 Clasificación de acuerdo con el tipo de transductor.....	17
2.1.3 Métodos de inmovilización.....	19
2.1.4 Técnicas electroquímicas	20
2.1.4.1 Voltamperometría cíclica (CV).....	20
2.1.4.2 Voltametría de Onda cuadrada (SWV).	21
2.1.4.3 Espectroscopía de Impedancia electroquímica (EIS).....	22
2.1.5 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	24

2.2	Marco conceptual	25
2.3	Marco legal.....	28
3	Método.....	29
3.1	Comportamiento electroquímico de los biosensores.....	30
3.2	Inmovilización de péptidos PEPTIR.....	32
3.3	Análisis para la detección de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	33
3.4	Análisis de selectividad de los biosensores sobre diferentes microorganismos.....	35
3.5	modificaciones del transductor.....	36
3.5.1	Modificación mediante nanopartículas de oro	36
3.5.2	Modificación mediante nanotubos de carbono	37
4	Resultados.....	38
4.1	Calibración de concentración de péptidos PEPTIR 1.0 y 2.0	38
4.2	Comportamiento electroquímico de los biosensores.....	43
4.3	Análisis estadístico de los biosensores.....	45
4.4	Análisis de la influencia de concentración de microorganismos en el biosensor	50
4.5	Análisis de selectividad de los biosensores sobre diferentes microorganismos.....	51
5	Conclusiones.....	53
6	Recomendaciones	54
	Referencias.....	55

Lista de tablas

Tabla 1. <i>Listado de antecedentes</i>	28
--	----

Tabla 2. <i>Características de los electrodos serigrafiados ItalSens (IS)</i>	30
--	----

Lista de figuras

Figura 1. Componentes y tipos de biosensores	15
Figura 2. Métodos de inmovilización en el diseño de biosensores	20
Figura 3. Magnitudes de un voltamperograma cíclico de acuerdo a la IUPAC	21
Figura 4. Técnicas de voltametría de onda cuadrada.....	22
Figura 5. Diagrama de Nyquist y circuito de Randles.....	23
Figura 6. Diagrama de construcción del Biosensor y Caracterización mediante EIS y SWV	31
Figura 7. Inmovilización péptidos PEPTIR	33
Figura 8. Detección de Escherichia coli O157:H7.....	34
Figura 9. Ensayo de selectividad	36
Figura 10. Curva de calibración PEPTIR 1.0	39
Figura 11. Curva de calibración PEPTIR 2.0	41
Figura 12. Comportamiento electroquímico de la detección de Escherichia coli con PEPTIR 1.0 (10 nM) y PEPTIR 2.0 (5 nM).	43
Figura 13. Diagrama de Pareto PEPTIR 1.0 para la resistencia.....	46
Figura 14. Gráfica de efectos principales para la resistencia.....	47
Figura 15. Diagrama de Pareto para la resistencia PEPTIR 2.0.....	48
Figura 16. Gráfica de efectos principales PEPTIR 2.0	49
Figura 17. Evaluación de la concentración de microorganismo para PEPTIR 1.0 y 2.0.....	50
Figura 18. Selectividad del PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0.....	52

Resumen

La contaminación generada por la presencia de microorganismos como *Escherichia coli* O157:H7 representa un problema ambiental y social, debido a las graves enfermedades presentadas por este patógeno. La detección oportuna de este microorganismo presenta algunas desventajas respecto a las técnicas tradicionales, por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas tecnologías para la detección de este microorganismo en agua con tiempos de detección más cortos, por lo anterior en este trabajo se presenta una alternativa para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 mediante el uso de biosensores electroquímicos a base de péptidos PEPTIR. La determinación de las características analíticas del biosensor electroquímico a base de péptidos PEPTIR se realizó mediante la inmovilización del PEPTIR 1 y PEPTIR 2 a diferentes concentraciones de 5, 10, 50 y 100 nM, buscando garantizar la inmovilización y la detección de *Escherichia coli* O157:H7. Para esto se evaluaron las *características analíticas de los biosensores electroquímicos* mediante técnicas electroquímicas como voltametría cíclica (CV), voltametría de onda cuadrada (SWV) y Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), evaluando así el efecto de las modificaciones realizadas sobre el electrodo de trabajo del biosensor electroquímico. Obteniendo como resultado las *concentraciones óptimas del PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0* estableciendo los límites de detección y límite de cuantificación a diferentes concentraciones de microorganismo 10, 20, 50, 100, 300 UFC / mL. Por otro lado, se evaluó la *selectividad* del biosensor basado en péptidos para el PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0 frente a *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* dando como resultado una alta selectividad respecto a los demás microorganismos.

Palabras clave: Microorganismo patógeno, biosensor amperométrico, selectividad.

Abstract

The contamination generated by the presence of microorganisms such as *Escherichia coli* O157:H7 represents an environmental and social problem, due to the serious diseases presented by this pathogen. The timely detection of this microorganism presents some disadvantages with respect to traditional techniques, therefore, it is necessary to develop new technologies for the detection of this microorganism in water with shorter detection times, therefore, in this work it is presented an alternative for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 through the use of electrochemical biosensors based on PEPTIR peptides. The determination of the analytical characteristics of the peptide-based electrochemical biosensor PEPTIR was carried out by immobilizing PEPTIR 1 and PEPETIR 2 at different concentrations of 5, 10, 50 and 100 nM, seeking to guarantee the immobilization and detection of *Escherichia coli* O157: H7. For this, the analytical characteristics of the electrochemical biosensors were evaluated using electrochemical techniques such as cyclic voltammetry (CV), square wave voltammetry (SWV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS), thus evaluating the effect of the modifications made on the working electrode. of the electrochemical biosensor. Obtaining as a result the optimal concentrations of PEPTIR 1.0 and PEPTIR 2.0, improving the detection limits and quantification limit at different concentrations of microorganism 10, 20, 50, 100, 300 CFU/mL. On the other hand, the selectivity of the peptide-based biosensor for PEPTIR 1.0 and PEPTIR 2.0 against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was evaluated, resulting in a high selectivity with respect to other microorganisms.

Keywords: pathogenic microorganism, amperometric biosensor, selectivity.

Glosario

Biosensor: Dispositivo usado para la medición de parámetros químicos y biológicos.

Transductor: Dispositivos que tienen la capacidad de transformar una señal.

SWV: Voltametría de Onda cuadrada, técnica electroquímica en la donde la corriente es medida durante intervalos de tiempo muy cortos en la parte final de la onda positiva y la onda negativa.

CV: Voltamperometría cíclica, es una técnica electroquímica que se caracteriza por la aplicación de un potencial al electrodo de trabajo y de referencia para medir la corriente durante una variación controlada de potencial.

EIS: Espectroscopia de impedancia electroquímica, consiste en la medida de la impedancia que presenta un sistema electroquímico a diferentes frecuencias.

Introducción

Una de las principales problemáticas a nivel ambiental, económico y social es la escasez del recurso hídrico para el consumo humano la cual afecta a más del 40 % de la población mundial y según las proyecciones esta cifra crecerá debido al aumento de las temperaturas globales a causa del cambio climático (PNUD, 2019) y en gran parte a la contaminación generada por la presencia de microorganismo como *Escherichia coli*, un bacilo Gramnegativo, facultativamente anaeróbico que habita en la flora intestinal normal de los mamíferos (Feliatra et al., 2022), la mayoría de estas cepas no afecta la salud de las personas, sin embargo, *Escherichia coli* O157: H7, productora de la toxina Shiga, es el serotipo de *Escherichia coli* más importante por su impacto en la salud pública, según la OMS *Escherichia coli* O157:H7 se transmite al hombre principalmente por la ingesta de alimentos contaminados o consumo de agua. La contaminación fecal del agua y de los alimentos ocurre ya que este patógeno se encuentra en estanques, pozos y abrevaderos y tiene la capacidad de sobrevivir durante meses en el estiércol y en los sedimentos de agua, reportando así casos de transmisión y convirtiéndose en las principales causas de enfermedades y mortalidad en el mundo (OMS, 2018).

Debido a lo anterior, detectar la presencia de estos microorganismos patógenos en los efluentes de agua es fundamental para la prevención de brotes transmitidos por *Escherichia coli* O157:H7. Actualmente los métodos de detección y cuantificación empleados son: cultivo en medios selectivos, kits bioquímicos, ensayos inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y ensayos en cadena de la polimerasa (PCR), sin embargo, estos métodos requieren mucho tiempo, tecnologías costosas y no tienen la capacidad de detección en tiempo real (Rosado-Porto et al., 2021). Teniendo en cuenta lo anterior, es importante el desarrollo de nuevas alternativas con tiempos de respuesta más cortos y económicos. En la última década se han venido desarrollando

nuevas tecnologías como son los biosensores, ya que estos dispositivos han demostrado una gran utilidad en áreas vitales como la salud, seguridad alimentaria, monitoreo ambiental y el sector farmacéutico, convirtiéndolos actualmente líderes en el mercado para las tecnologías de diagnóstico respaldando el 70% de las decisiones médicas (Altug et al., 2022). Los biosensores se clasifican según el tipo de transductor empleado, dentro de los cuales se encuentran los biosensores ópticos, calorimétricos, piezoeléctricos y electroquímicos. Los biosensores electroquímicos están conformados por un soporte sólido, esta superficie es diseñada y modificada con el fin de llevar a cabo interacciones como amina y carboxilo, aldehído y tiol dependiendo de los grupos químicos del electrodo y del elemento biológico de reconocimiento, estas interacciones se llevan a cabo con el objetivo de producir una señal que sea medible por el transductor (Cho et al., 2020).

Existen diferentes tipos de biosensores dependiendo de su elemento biológico de reconocimiento, las moléculas biológicas de reconocimiento pueden ser enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos y aptámeros, además, la síntesis de aptámeros, proteínas y virus ha venido en aumento ya que el diseño de estas moléculas proporciona un aumento en la selectividad de los biosensores (Gupta et al., 2021). El interés en el uso de péptidos como elementos de reconocimiento para la detección de microorganismos en biosensores, se debe a que son moléculas más versátiles debido a sus propiedades fisicoquímicas. Los péptidos se componen normalmente de 10 a 100 aminoácidos y adoptan estructuras tridimensionales, teniendo la capacidad de interactuar con iones, moléculas y membranas de microorganismos. La interacción péptido-analito se lleva a cabo mediante interacciones intermoleculares no covalentes de tipo electrostáticas, enlaces de hidrógeno, hidrófobos y van der Waals, lo cual permite que puedan ser diseñados manteniendo su estructura y características bioquímicas. Redondo en 2021, realizaron el diseño bioinformático de dos péptidos análogos a la proteína TIR (Translocated Intimin Receptor) como

molécula de reconocimiento en biosensores electroquímicos para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 en matrices acuosas, estos péptidos fueron denominados PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0 los cuales presentan características específicas para ser evaluados (Redondo, 2021).

Una de los principales retos en el uso de biosensores es la modificación de la superficie del transductor para el reconocimiento del analito y que la actividad bioquímica que es transformada en señal sea cuantificable (Cesewski & Johnson, 2020b). Dentro de las modificaciones que pueden realizarse se encuentran el uso de las nanoestructuras y las nanopartículas de oro, cada uno de estos materiales tienen propiedades únicas, y poseen una alta área superficial y reactividad, convirtiéndolos así en una alternativa interesante para aplicación en la modificación de biosensores electroquímicos. Las modificaciones realizadas con nanoestructuras se destacan los nanotubos de carbono (CNT) que poseen un amplio rango de aplicaciones debido a sus propiedades tales como conductividad térmica y eléctrica, estabilidad, resistencia mecánica y la capacidad para interactuar con una variedad de analitos debido a su gran área superficial por medio de la adsorción de moléculas y biomoléculas sobre superficies modificadas. Otro de los compuestos usados en la modificación de la superficie del electrodo es el uso de nanopartículas de oro, estas se caracterizan por presentar propiedades ópticas, eléctricas, catalíticas y biocompatibles. La electrodeposición química es uno de los métodos más empleados en la obtención de nanopartículas de oro sobre sustratos conductores principalmente porque permite el control del tamaño y distribución de las nanopartículas por medio del potencial, tiempo de electrodeposición o concentración de la solución (González, 2015). Por lo anterior, en este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la detección electroquímica de *Escherichia coli* O157:H7 en matrices acuosas utilizando biosensores a base de péptidos PEPTIR modificados con nanopartículas de oro y nanotubos de carbono.

1 Detección electroquímica de *Escherichia coli* O157:H7 en agua utilizando biosensores peptídicos modificados

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Evaluar biosensores electroquímicos a base de péptidos PEPTIR 1.0 y 2.0 modificados con nanopartículas de oro para la detección de *Escherichia coli* O157:H7

1.1.2 Objetivos específicos

Determinar las características analíticas de los biosensores electroquímicos a base de péptidos PEPTIR 1.0 y 2.0 para la detección de *Escherichia coli* O157:H7.

Modificar el transductor electroquímico de biosensores peptídicos con nanopartículas de oro.

Evaluar el efecto de las modificaciones del transductor sobre las características analíticas del biosensor hacia la detección de *Escherichia coli* O157:H7.

2 Marco referencial

2.1 Marco teórico

En el presente capítulo se describen los fundamentos teóricos que describen la clasificación de los biosensores, los métodos de inmovilización y las técnicas electroquímicas para la detección.

2.1.1 *Biosensor*

De acuerdo con la International Union of Pure and Applied Chemistry (2020), un biosensor “es un dispositivo, el cual es capaz de proveer información analítica cuantitativa o semicuantitativa empleando un elemento de reconocimiento biológico conocido como receptor bioquímico, el cual está en contacto con el elemento de transducción electroquímico”. Según Torres (2019), un biosensor está formado por un componente biológico que actúa como elemento de reconocimiento interaccionando específicamente con una sustancia determinada, y un componente transductor que es capaz de interpretar la interacción y transformarla en una señal medible (Torres, 2019).

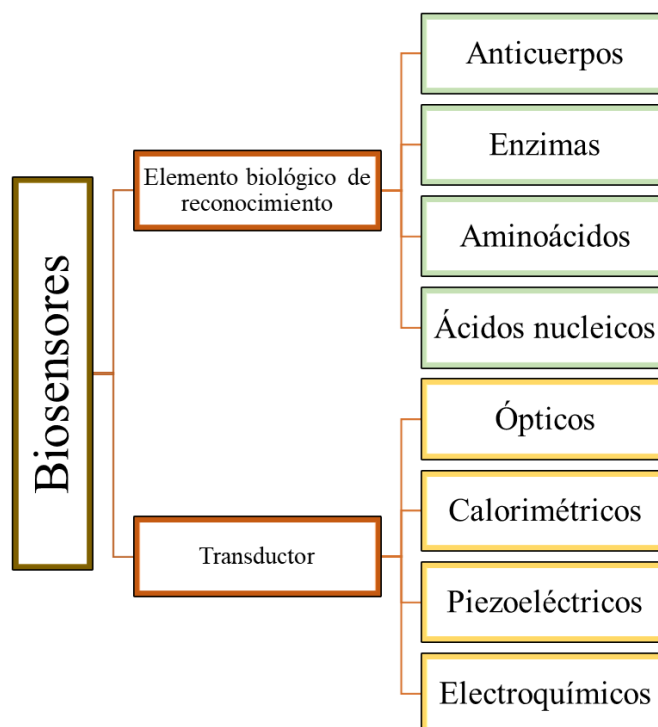
2.1.1.1 Componente biológico. El componente de reconocimiento biológico que forman parte de los biosensores, según Ramón (2017) está constituido por biomoléculas como enzimas, anticuerpos o ácidos nucleicos, o por sistemas biológicos como células, tejidos y orgánulos. Estos elementos se caracterizan por presentar un elevado grado de selectividad hacia un sustrato o analito determinado, lo que permite que los biosensores puedan ser utilizados en matrices complejas sin necesidad de etapas de purificación de la muestra (Ramón, 2017).

2.1.1.2 Componente transductor. El componente de transducción no debe interferir en la reacción de reconocimiento biológico y la respuesta a los cambios producidos por la reacción debe ser lo más rápido posible. Según Ramón (2017), el transductor es el encargado de transformar la reacción entre el analito y el bioreceptor mediante una señal. Los elementos de transducción que se pueden utilizar en el diseño de un biosensor incluyen una gran variedad de materiales, sustancias y compuestos; por ejemplo, electrodos modificados (Ramón, 2017).

2.1.2 Clasificación de los biosensores

La clasificación de los biosensores considera diferentes criterios, tanto el mecanismo de reconocimiento y el sistema de transducción, como se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Componentes y tipos de biosensores



A continuación, se describe la clasificación de los biosensores de acuerdo al elemento biológico de reconocimiento y el transductor.

2.1.2.1 Clasificación de acuerdo con el elemento de reconocimiento biológico. Los biosensores se clasifican según el elemento de reconocimiento, ya que el bioreceptor aumenta la sensibilidad y la selectividad del biosensor para determinar un analito específico y prevenir las

interferencias al analizar la muestra. La señal biológica de los biosensores puede dividirse en cuatro mecanismos: Biosensores enzimáticos, inmunosensores, sensores de ADN/ácido nucleico y sensores basados en células. A continuación, se describen cada uno de estos mecanismos.

- *Biosensores enzimáticos*: Estos biosensores se basan en la biocatálisis ya que, las enzimas tienen la característica de reconocer específicamente a un sustrato y transformarlo mediante procesos catalíticos. La inmovilización de la enzima se realiza mediante interacciones dentro de las cuales se encuentran los enlaces iónicos, Van der Waals y enlaces covalentes (Alhadrami, 2018; Torres, 2019).

- *Inmunosensores*: Los inmunosensores aplican el concepto de inmunoensayos en fase sólida, los antígenos y anticuerpos se inmovilizan sobre un soporte sólido, la interacción antígeno-anticuerpo ocurre en la interfaz sólido-líquido. Cesewski & Johnson argumentan que el anticuerpo se enlaza con el patógeno o toxina con el componente que se encuentra en el sistema inmune. Este biosensor representa características atractivas debido a la sensibilidad, selectividad y rápida respuesta (Alhadrami, 2018; Cesewski & Johnson, 2020a).

- *Sensores de ADN/ácido nucleico*: Este biosensor se basa en el reconocimiento de un fragmento de una hélice del ácido nucleico y el enlace con la hélice complementaria, según Torres (2019), la formación de la doble hélice está regida por puentes de hidrógeno, estos biosensores son usados en el área clínica para el diagnóstico de virus y enfermedades (Torres, 2019).

- *Sensores basados en células*: Las células vivas son el elemento de reconocimiento biológico y se basan en la detección del analito en interés en condiciones intracelulares o extracelulares, son usados en el diagnóstico clínico, análisis ambiental, control de calidad en alimentos, industria farmacéutica y detección de drogas (Torres, 2019).

- *Péptidos antimicrobianos*: Son moléculas que contienen 12 y 60 aminoácidos, forman parte de la respuesta de defensa de diferentes organismos mediante la mediación de la respuesta hacia patógenos, parásitos y hongos. El mecanismo general que los péptidos ejercen consiste en dañar la membrana celular del patógeno, esta interacción con el microorganismo esta mediada por fuerzas electrostáticas entre los residuos amino positivos y la carga negativa de la membrana del patógeno (Angel et al., 2018).

2.1.2.2 Clasificación de acuerdo con el tipo de transductor. El transductor hace parte del biosensor el cual hace parte del proceso de detección de la señal. El transductor es un dispositivo que convierte un intervalo físico, químico o biológico en una señal eléctrica con alta sensibilidad y el mínimo de interferencias en la medición. Existen diferentes métodos para la detección de la señal, los biosensores más empleados son: Biosensores electroquímicos, biosensores ópticos, biosensores piezoeléctricos y biosensores calorimétricos.

- *Biosensores electroquímicos*: Los transductores electroquímicos son los más empleados, debido a sus diseños simples, fácil manejo y miniaturización. Según Royano (2020), la señal transformada ocurre debido a la interacción electroquímica entre el analito y el electrodo. El biosensor electroquímico consta de una serie de electrodos y en función de la información que detecten pueden actuar como biosensores amperométricos, potenciométricos o conductimétricos (Royano, 2020).

- *Biosensores amperométricos*: Los biosensores amperométricos miden un potencial constante, la intensidad de corriente se produce en la superficie del electrodo por una reacción de oxidación-reducción. Según Kaur (2018), la interacción es directamente proporcional a la cantidad de sustancia electroactiva y puede estar relacionada con la concentración del analito.

Los biosensores amperométricos son más selectivos que otros transductores debido al potencial de oxidación o reducción es característico de cada analito. Los biosensores amperométricos constan de un sistema de tres electrodos: electrodo de referencia, auxiliar y de trabajo. El potencial se aplica sobre el electrodo de trabajo, que se mantiene constante debido al electrodo de referencia, el electrodo de trabajo registra el cambio de corriente cuando se produce la reacción electroquímica y la intensidad es medida por un amperímetro. El electrodo auxiliar cierra el circuito permitiendo de esta manera la transferencia de carga (Kaur et al., 2018).

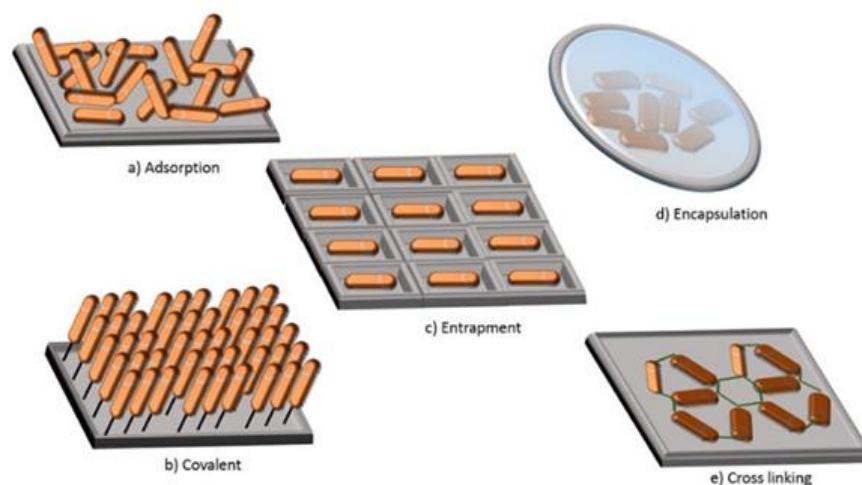
- *Biosensores potenciométricos*: Los biosensores potenciométricos miden la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el de referencia manteniendo la corriente constante. La diferencia de potencial es causada por una reacción química que cambia la concentración de iones presentes. La concentración del analito sobre electrodo obliga a variar el potencial para mantener la corriente constante. Los transductores potenciométricos fueron los transductores más empleados en los años 80 y 90, sin embargo, la posibilidad de miniaturización y mejoras en la sensibilidad ha hecho que los transductores amperométricos aumenten sus aplicaciones (Royano, 2020).

- *Biosensores conductimétricos*: Los biosensores conductimétricos miden los cambios en la conductividad del medio, una reacción química o la formación de diversos complejos según Kaur et al (2018) pueden variar la concentración de iones en el medio, cambiando la movilidad de estos hacia el ánodo y el cátodo, alterando de esta manera las propiedades conductoras del medio, cambiando la transferencia de cargas por el sistema. Los cambios en la transferencia de cargas se pueden medir con detectores impedimétricos, los cuales miden la oposición que presenta el dispositivo al transporte de electrones, generalmente mediante una corriente alterna registra cambios de la impedancia en función de la frecuencia de la corriente alternada que es aplicada. De manera sencilla, la medida de la conductividad o la impedancia es explicada con la ley de Ohm, la

cual relaciona de manera inversamente proporcional la corriente que circula por un circuito y la resistencia que presenta (Kaur et al., 2018).

2.1.3 Métodos de inmovilización

El proceso de inmovilización es una de las etapas más importantes en el diseño de los biosensores ya que es la base para lograr la interfaz entre el material biológico y el sistema de transducción. Los biosensores generalmente son diseñados con una alta carga de enzimas para asegurar suficientes actividades de biocatalizador y para obtener una actividad estable durante el tiempo, las enzimas se fijan sobre soportes sólidos. La inmovilización implica asociar los biocatalizadores con una matriz insoluble y el método de inmovilización depende del elemento biológico de reconocimiento, el tipo de transductor, las propiedades fisicoquímicas del analito y las condiciones operativas. Dentro de los métodos de inmovilización incluyen adsorción, unión covalente, entrecruzamiento, encapsulación y atrapamiento que muestran en la Figura 2.

Figura 2. *Métodos de inmovilización en el diseño de biosensores*

Adaptado de (Sandoval & Herrera, 2018).

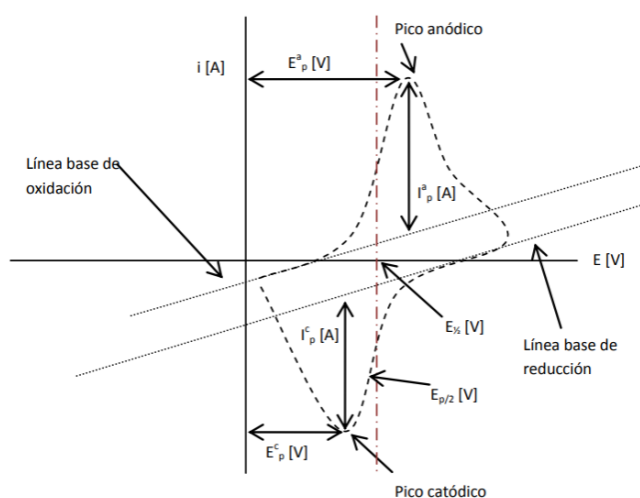
2.1.4 Técnicas electroquímicas

La voltamperometría comprende un grupo de técnicas electroquímicas en los cuales los procesos de transferencia de carga no espontáneos son impulsados por la diferencia de potencial eléctrico que es aplicado externamente. La finalidad de la voltamperometría es la caracterización de la reacción redox y su determinación analítica, en la voltamperometría son importantes los parámetros físicos como el potencial eléctrico y la corriente. A continuación, se describen algunas de estas técnicas.

2.1.4.1 Voltamperometría cíclica (CV). La voltametría cíclica es una técnica electroquímica que consiste en ciclar el potencial de un electrodo, que se encuentra sumergido en una solución y mide la corriente resultante. El potencial del electrodo de trabajo se controla frente al electrodo de referencia observándose un comportamiento redox. La señal de excitación para la

voltamperometría cíclica realiza un barrido de potencial lineal, esta señal hace que el potencial escanee negativa y posteriormente la dirección de barrido se invierte causando un barrido positivo, esta reacción se da con el fin de comprobar la formación de su par redox y de esta manera dilucidar los mecanismos de reacción (Roldán, 2019). En la Figura 3 se presentan los parámetros de un voltamperograma cíclico en el cual:

Figura 3. *Magnitudes de un voltamperograma cíclico de acuerdo a la IUPAC*



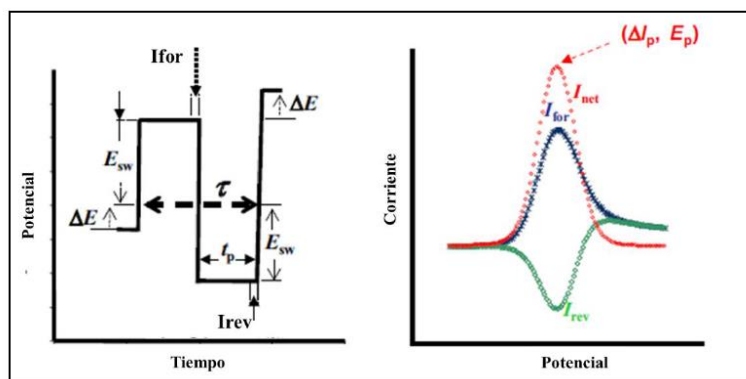
Adaptado de (Roldan, 2019).

Donde E_p^c es el potencial de pico catódico, E_p^a es el potencial de pico anódico, i_p^c es la intensidad de corriente de pico catódico, y i_p^a es la intensidad de corriente de pico anódico.

2.1.4.2 Voltametría de Onda cuadrada (SWV). La voltametría de onda cuadrada consiste en un avance de potencial y tiempo mediante escalones, midiendo una determinada frecuencia en s^{-1} . La onda cuadrada se caracteriza por una altura de pulso que es medida con respecto al escalón correspondiente de la escalera y el ancho del pulso, la corriente es medida durante intervalos de tiempo muy cortos en la parte final de la onda positiva, I_{for} , que está en la

dirección del barrido de la escalera a un tiempo determinado, y en la parte final de la onda negativa, I_{rev} , a otro tiempo con dirección opuesta. Por otro lado, se puede construir otra curva voltamperométrica restando los valores correspondientes de corriente (I_{for} y I_{rev}), denominados corriente neta (ΔI). En consecuencia, el resultado de una sola pasada de SWV son tres voltamperogramas (I_{for} , I_{rev} , ΔI), a continuación, se presenta un esquema de la voltamperometría de onda cuadrada (Mirceski et al., 2018).

Figura 4. Técnicas de voltametría de onda cuadrada



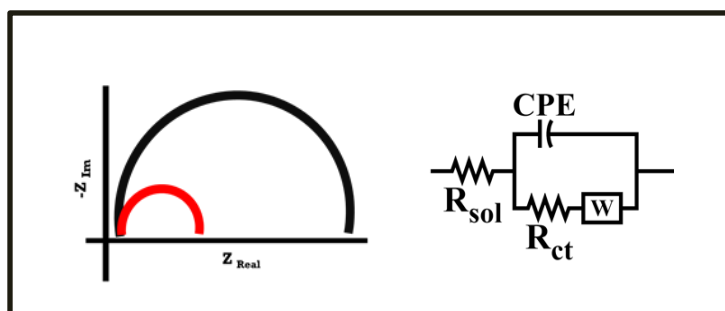
Adaptado de (Mirceski, 2018).

2.1.4.3 Espectroscopía de Impedancia electroquímica (EIS). La espectroscopia de impedancia electroquímica es una técnica de caracterización que se utilizan para obtener propiedades físicas, coeficientes de difusión y características microestructurales de sistemas electroquímicos. EIS se basa en perturbar un el electrodo de trabajo con una señal alterna que llevan al electrodo a condiciones alejadas del equilibrio.

La técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica mide la relación entre la corriente y la diferencia de potencial aplicando una frecuencia. Las reacciones se caracterizan mediante un circuito eléctrico que consta de resistencias, condensadores o elementos de fase constante que se conectan en paralelo o en serie para formar un circuito equivalente, el EIS tiene

la capacidad de estudiar las propiedades intrínsecas de los materiales o los procesos que influyen en la conductancia, resistencia o capacitancia de un sistema electroquímico. La resistencia que se evidencia en la espectroscopia de impedancia electroquímica obedece a la ley de Ohm (Magar et al., 2021). Cuando la superficie del electrodo es modificada por una monocapa que no es conductora altera la respuesta de la corriente alterna, por lo tanto la espectroscopia de impedancia electroquímica proporciona un modelo de circuito equivalente, el cual es usado para describir el comportamiento de las reacciones de transferencia de carga, la presencia de una monocapa afecta dos componentes, cuando se presentan altas frecuencias donde la reacción de los electrones está controlada cinéticamente, el comportamiento de la resistencia a la transferencia de carga heterogénea aumenta debido a la inhibición de la velocidad de transferencia electrónica, y esto se ve reflejado en el aumento en el radio del semicírculo. Por otro lado, a bajas frecuencias la impedancia de Warburg se desvía de su habitual dependencia lineal con la frecuencia (Chávez, 2017). Dentro de los circuitos más utilizados para modelizar los fenómenos interfaciales es el circuito de Randles el cual se presenta a continuación.

Figura 5. Diagrama de Nyquist y circuito de Randles



El circuito de Randles, está conformado por una resistencia en serie a un circuito que incluye un condensador (CPE) en paralelo con una resistencia (R_{ct}) más el término de Warburg. El espectro

inicia en R_{sol} representa la resistencia a la solución, y el punto final a la suma de R_{sol} y R_{ct} , donde R_{ct} es la resistencia a la transferencia de carga entre la solución y la superficie del electrodo. El valor de CPE es el valor de la capacitancia de la doble capa obtenido del valor máximo de impedancia imaginaria. En cuanto la impedancia de Warburg que depende de la difusión de los iones desde el seno de la disolución hacia la interfase del electrodo, representado en la pendiente que se origina al final del semicírculo (Chávez, 2017). En la Figura 4 se muestra un esquema que se compone de la parte real en el eje X y la parte imaginaria en el eje Y, representado en el Diagrama de Nyquist (Primo, 2016).

2.1.5 *Escherichia coli* O157:H7

Escherichia coli pertenece a la familia de Enterobacteriaceae, es un bacilo gran negativo, anaerobio facultativo y no presenta formación de esporas. Las cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* son la principal causa de diarrea ya que tiene la capacidad de causar infección mediante la adhesión bacteriana a las células epiteliales del intestino delgado, lo cual conlleva a la destrucción de las microvellosidades. Uno de los factores de virulencia de *Escherichia coli* O157:H7 es la proteína de membrana conocida como la intimina y el receptor específico conocido como TIR (Translocated Intimin Receptor).

El mecanismo de acción de esta cepa patógena se inicia con el receptor de la intimina translocada (Tir), una proteína que se une en la membrana epitelial. Este mecanismo está mediado por dos proteínas que son secretadas en la membrana, que actúan como receptor de una adhesina bacteriana en la membrana externa, que es la intimina. Las intiminas son producidas por patógenos que causan lesiones de tipo A/E (attaching and effacing), como *Escherichia coli* O157:H7 (Brosel-Oliu et al., 2017).

La proteína intimina está compuesta por un total de 934 aminoácidos. Esta molécula considerada como una proteína de membrana externa, cuenta con una porción extracelular que comprende una varilla articulada de dominios (D0, D1, D2 y D3) que se extiende desde la superficie de la bacteria transportando una "punta adhesiva" que se encuentra en los 190 aminoácidos C-terminales, accesible a su respectivo receptor TIR. La proteína TIR, es una molécula con un tamaño de 558 aminoácidos, cuya función principal es servir de receptor frente a la proteína intimina de *E. coli* y permitir la unión de la bacteria en la superficie de la célula huésped. Este receptor cuenta con una región N-terminal y C-terminal intracelular. Las interacciones más abundantes entre estas moléculas son las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas y el dominio de vinculación de la Tir tiene una carga negativa neta general (siete cargas negativas netas) y la intimina tiene una carga positiva general complementaria (seis cargas positivas netas) (López, 2021; Redondo, 2021).

2.2 Marco conceptual

Existen diferentes biosensores usados para la detección de microorganismos patógenos y contaminantes que afectan la calidad del agua. Existe una demanda creciente para la mejora en los protocolos de muestreo, la detección *in situ* y precisión en la detección de contaminantes. El primer biosensor fue un electrodo para medir oxígeno construido y desarrollado por Clark en 1962, fue el primer biosensor enzimático en el cuál combinaba la actuación de la enzima glucosa oxidasa con un detector electroquímico que era un electrodo de oxígeno. Este biosensor permitía relacionar directamente la concentración de glucosa con la disminución de la concentración de oxígeno. Posterior a esto, se desarrollaron electrodos potenciométricos inmovilizando otras enzimas como

ureasas sobre electrodos selectivos de amonio y analizadores de glucosa que estaban basados en detecciones amperométricas de peróxido de hidrógeno.

En la siguiente década, se empezaron a usar los mediadores electroquímicos para favorecer la transferencia de electrones desde el centro redox de una enzima a la superficie del electrodo, dándole paso a la nueva generación de los biosensores electroquímicos. Los primeros experimentos de AMP para aplicaciones de biosensores fueron realizados por Kulagina et al, dos ensayos de biosensor utilizando magainina I como la molécula de reconocimiento en la detección basada en fluorescencia de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* (Kulagina et al., 2005).

En un estudio realizado por Alcaraz, Fabiano & Cámara (2013), se desarrolló un biosensor amperométrico de tirosinasa para la determinación de contenido fenólico total en aguas superficiales. Para este estudio realizaron mediciones en una celda electroquímica con un sistema de tres electrodos compuestos por un electrodo de referencia Ag/AgCl, un electrodo auxiliar de hilo de platino y un electrodo de trabajo de composite grafito epoxi modificado con la enzima, la enzima tirosinasa se presentó de manera liofilizada. En este estudio se logró el diseño y desarrollo de un biosensor para la detección de fenoles sin pérdida de actividad de la enzima y con una precisión adecuada, además optimizaron la metodología cuantitativa sencilla, rápida y eficaz basada en amperometría para la detección de contaminantes simples con un tiempo total de ensayo de 5 minutos (Alcaraz et al., 2013).

En un estudio realizado por Hernández (2016), tuvo como objetivo desarrollar el biosensores para la detección de hidrocarburos aromáticos en aguas marinas, obteniendo biosensores bacterianos con la capacidad de detectar BTX (Hidrocarburos aromáticos excepto etilbenceno) y PAHs (Hidrocarburos aromáticos policíclicos) a diferentes concentraciones, resaltando que estos biosensores son versátiles y mediante diferentes optimizaciones obtener un

aumento en la sensibilidad y respuesta a contaminantes que se encuentren en el medio ambiente (Sánchez, 2016).

En un estudio realizado por Torres (2019) tenía como finalidad desarrollar un biosensor bioenzimático y biparamétrico para la detección simultánea de glucosa y colesterol en muestras alimenticias, para esto modeló un biosensor amperométrico construido a partir de un electrodo serigrafiado de carbón sobre el que depositó ferricianuro de potasio, actuando como mediador y una membrana enzimática formulada con glucosa oxidasa y colesterol oxidasa. En este estudio se obtuvo un dispositivo biparamétrico con el cual se obtuvieron porcentajes de error menores al 10 % (Torres, 2019).

En 2021 Ren., et al desarrolló un biosensor electroquímico para la detección de bacterias gram negativas logrando detección a través de la interacción carbohidrato-carbohidrato específica entre la gluconamida y el lipopolisacárido, destacando que la aplicación de voltaje mejora la eficiencia de reconocimiento y acorta el tiempo de detección a través de la deformación temporal de la superficie del electrodo, con un límite de detección de 1×10^0 UFC/mL con un rango lineal de 1×10^0 UFC/mL y 1×10^6 UFC/mL para *E coli* (Ren et al., 2021).

En un estudio realizado por Redondo en 2021, se realizó un diseño bioinformático de un nuevo péptido de denominado PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0. Este péptido fue utilizado como elemento de reconocimiento en un biosensor serigrafiado modificado con nanopartículas de oro para la detección de *Escherichia coli*. Este estudio muestra como resultado que el biosensor puede detectar la bacteria con límites de detección y cuantificación de 2 y 6 UFC/mL, respectivamente. Además, evaluaron la selectividad del sistema para la detección del patógeno en presencia de otros microorganismos como *P aeruginosa* y *S aureus*, lo cual permitió la detección rápida, sensible y selectiva de *Escherichia coli* en matrices acuosas (Redondo, 2021).

A continuación, se presenta un listado de algunos estudios en los cuales realizaron la detección de *Escherichia coli*.

Tabla 1. Listado de antecedentes

Agente Patógeno	Elemento de reconocimiento	Rango de detección	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	rGO-CysCu/Gold electrode	Linear range: 100–108 CFU/mL LOD: 3.8 CFU/mL Assay time: > 1 h	(Pandey et al., 2017)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	CdS@ZIF-8 particles	Linear range: 10–108 CFU/mL Assay time: < 3 h LOD: 3 CFU/mL (S/N=3)	(Zhong et al., 2018)
<i>Escherichia coli</i>	PPy y gluconamida	LOD: 1×10^0 UFC/MI Rango lineal de 1×10^0 y 1×10^6 UFC/mL.	(Ren et al., 2021)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	PEPTIR 1.0	Linear range: 0-500 CFU/mL LOD: 2 CFU/mL	(Ropero-vega et al., 2021)

2.3 Marco legal

Para la ejecución de este trabajo, los ensayos fueron realizados teniendo en cuenta las normas de bioseguridad y las buenas prácticas de laboratorio implementadas en el Laboratorio de Biotecnología de la UDES, con el fin de garantizar la seguridad de los individuos y el procesamiento de las muestras, además, esta investigación no fue realizada en seres humanos.

De acuerdo con la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia establecen normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación, en la cual establece la normativa para la manipulación de microorganismos patógenos que forman parte del riesgo II, es decir riesgo moderado individual y riesgo comunitario limitado, cumpliendo con todos los parámetros establecidos y normas de bioseguridad.

3 Método

A continuación, se indica la metodología desarrollada para la evaluación de los biosensores electroquímicos basados en los Péptidos PEPTIR 1.0 (secuencia QKVNIDELGNAIPSGVLKDD) y PEPTIR 2.0 (secuencia QKVNIAELGNAIPSGVLKDD) los cuales fueron sintetizado por Biomatik® (Wilmington, DE, EE.UU.) con una pureza superior a 95% para la detección de *Escherichia coli* O157:H7. En esta sección se muestra la determinación de las características analíticas de los biosensores electroquímicos en la cual se emplean las técnicas electroquímicas voltametría cíclica (CV), voltametría de onda cuadrada (SWV) y Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), así como la metodología desarrollada para la evaluación del efecto de las modificaciones realizadas sobre las características analíticas del biosensor.

A continuación, se presenta la descripción de las características de los electrodos serigrafiados los cuales fueron adquiridos comercialmente (Palmsens) del fabricante Italsens, que consta de un electrodo de trabajo (7,07 mm²), un electrodo de carbón auxiliar y un electrodo de referencia de plata / cloruro de plata (Ag / AgCl). Las mediciones electroquímicas y la evaluación del biosensor se realizaron en un potencióstato / galvanostato VersaSTAT 3 (Princeton Applied Research) controlado por el software Versastudio (v. 2.60.6.).

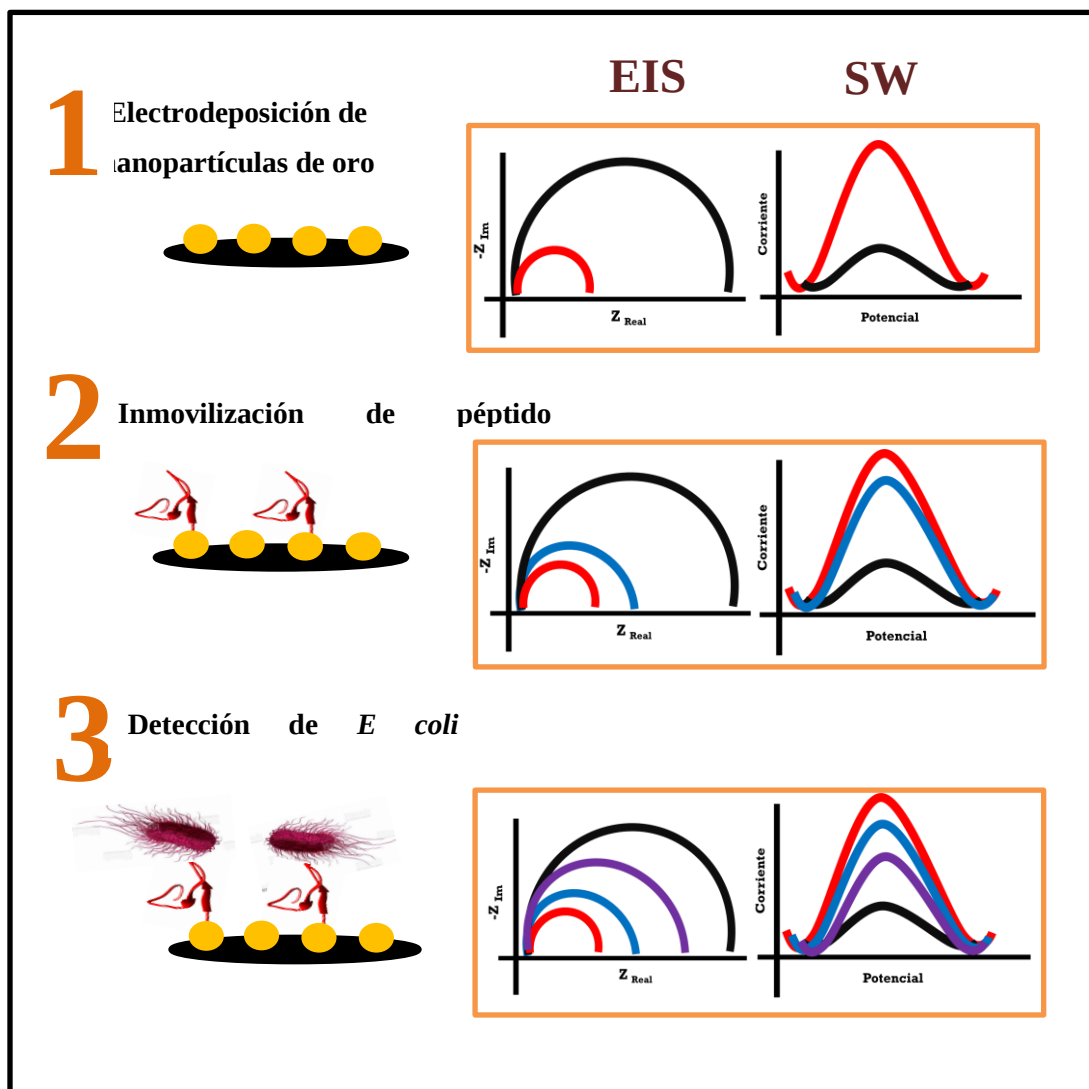
Tabla 2. Características de los electrodos serigrafiados ItalSens (IS)

Electrodo	Material
Electrodo de trabajo	Carbono
Electrodo de referencia	Plata cubierta por cloruro de plata
Electrodo auxiliar	Carbono



3.1 Comportamiento electroquímico de los biosensores

La determinación de las características analíticas del biosensor electroquímico a base de péptidos PEPTIR se realizó mediante la inmovilización del PEPTIR 1 y PEPETIR 2 a diferentes concentraciones, buscando garantizar la inmovilización y la detección de *Escherichia coli* O157:H7. Adicional a esto, se realizó un ajuste de la concentración de las soluciones de la cupla redox, a un tiempo determinado de inmovilización. En la Figura 6 se presenta el diagrama de construcción del biosensor y detección de *Escherichia coli* O157: H7.

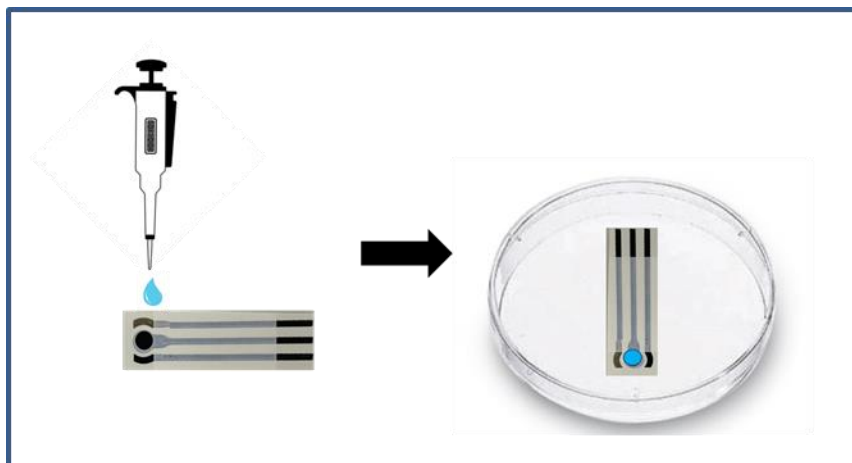
Figura 6. Diagrama de construcción del Biosensor y Caracterización mediante EIS y SWV

En la primera etapa se evidencia comportamiento electroquímico del electrodo sin modificar (SPE) representado con la línea negra y la electrodeposición de las nanopartículas de oro representados con la línea roja para las dos técnicas electroquímicas de EIS y SWV. En la segunda etapa, se evidencia la inmovilización del péptido PEPTIR y la tendencia en cada una de las técnicas es representada con la línea azul y por último, en la tercera etapa representa la detección y el cambio en la resistencia en la transferencia de carga es observada con la línea morada.

Las SWV se realizaron entre -0,4 a +0,8 V permitiendo 10 s de estabilización o equilibrio a -0,4 V, la amplitud o “Altura del pulso” fue de 50 mV, el paso de potencial (Estep) fue de 5,0 mV y una frecuencia de 10 Hz. Las mediciones de EIS se realizaron entre 50000 y 1 Hz a un potencial fijo de 10 mV RMS y +0,0 V frente a OCP (Cobos, 2019). La CV y SWV se realizaron utilizando una solución 10 mM de sonda redox, mientras que las mediciones de EIS se realizaron utilizando 5,0 mM de sonda redox. Para la técnica electroquímica de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) se realiza el modelamiento del circuito de Randles en el programa EIS Spectrum Analyser con el fin de extraer los resultados de la resistencia y calcular los valores normalizados para ser graficados en OriginPro.

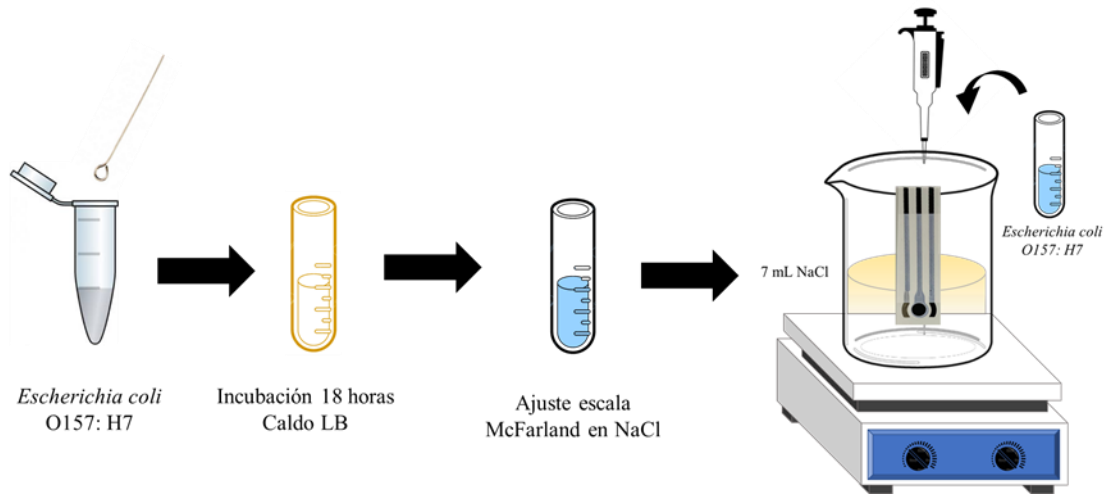
3.2 Inmovilización de péptidos PEPTIR

Los péptidos PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0 adquiridos comercialmente en concentraciones de 5mg/ml, se ajustaron a las concentraciones evaluadas mediante diluciones a partir de una concentración de 2000 nM de péptido PEPTIR en agua tipo I, el péptido se deposita sobre el electrodo de trabajo y se incuba durante 16 horas como tiempo de inmovilización determinado (Redondo, 2021). En este proceso, se evaluaron diferentes concentraciones, 100, 50, 10 y 5 nM para cada uno de los PEPTIR 1.0 y 2.0, por triplicado, y teniendo como referencia un blanco correspondiente al biosensor sin péptido inmovilizado. Las concentraciones de las soluciones de la cupla redox empleados, fueron de 10 y 5 nM de ferro-ferri.

Figura 7. Inmovilización péptidos PEPTIR

3.3 Análisis para la detección de *Escherichia coli* O157:H7

El proceso de detección de *Escherichia coli* O157: H7 se realiza partiendo de la reactivación del microorganismo, el cual se mantiene criopreservado a -80°C en caldo Luria Bertani (LB), en este proceso, se adicionan 50 μL de material criopreservado en 5 mL de caldo LB y se incuba a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de 18 a 24 horas antes de cada ensayo, ajustando la concentración a 1×10^8 UFCmL $^{-1}$ en solución de cloruro de sodio (NaCl) en una escala de MacFarland. Una vez reactivado el microorganismo e inmovilizado el péptido PEPTIR, se realiza la evaluación del biosensor en la detección de *Escherichia coli* (EC), empleando 7 mL de solución salina NaCl 0.9 % de concentración, variando la concentración de EC (10, 20, 50, 100, 3000 UFC / mL) en un vaso de precipitado e incubando el biosensor durante 30 minutos con agitación constante a 150 rpm. Posterior a este tiempo, se realizan las mediciones electroquímicas mediante CV, SWV y EIS con el fin de comparar el biosensor sin modificar con el biosensor modificado.

Figura 8. Detección de *Escherichia coli* O157:H7.

Los análisis de los datos para determinar la resistencia en la detección de *Escherichia coli* una vez calculada la resistencia ajustada en el circuito de Randles, se determinan mediante los valores normalizados ($\Delta R_{\text{Normalizado}}$) utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta R_{\text{Normalizado}} = \frac{R_{\text{PEP}} - R_{\text{PEP} + E. coli}}{R_{\text{PEP}}}$$

En donde,

R_{PEP} : Corresponde la resistencia a la transferencia de carga del electrodo modificado con péptido.

$R_{\text{PEP-E coli}}$: Resistencia a la transferencia de carga del electrodo en la detección del microorganismo.

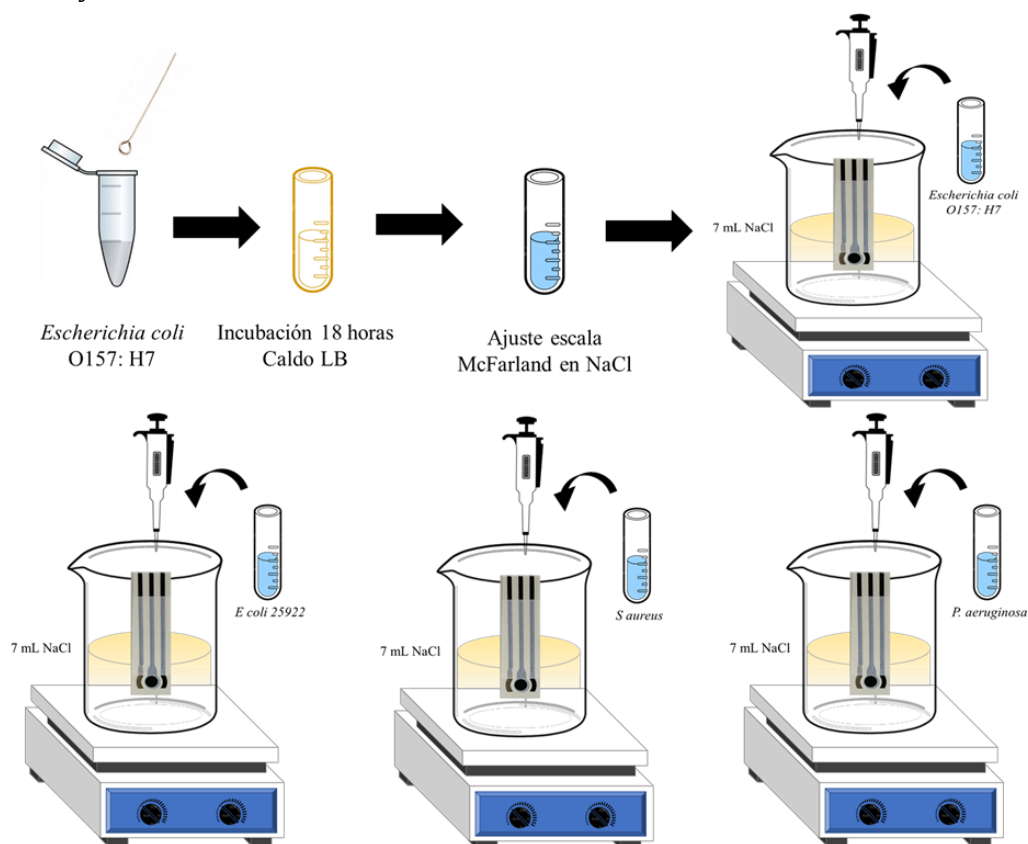
Posterior a la determinación de los valores normalizados de la resistencia, se calcula el límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) a partir de las siguientes ecuaciones:

$$C_m = \frac{S_m - \overline{S_{bl}}}{\overline{S_{bl}} + m_k S_{bl}}$$

Donde C_m es el límite de detección o cuantificación, S_m es la señal analítica distinguible mínima, $(\overline{S_{bl}})$ es la media de la respuesta de los blancos, m es la pendiente de la línea de calibración, S_{bl} es la desviación estándar de la respuesta de los espacios en blanco y k es una constante con un valor de 3 o 10 para LOD o LOQ, respectivamente.

3.4 Análisis de selectividad de los biosensores sobre diferentes microorganismos

Este proceso se realiza bajo la misma metodología descrita en el anterior apartado (3.2 Detección de *Escherichia coli* O157:H7) empleando diferentes microorganismos, *Escherichia coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, cada uno por triplicado para cada péptido, PEPTIR 1.0 y 2.0.

Figura 9. *Ensayo de selectividad*

3.5 modificaciones del transductor

Esta etapa está orientada a la modificación de transductores electroquímico mediante el uso de nanotubos de carbono y nanopartículas de oro.

3.5.1 Modificación mediante nanopartículas de oro

La electrodeposición de las nanopartículas de oro (AuNPs) se realizó sobre el electrodo de trabajo usando una solución de HAuCl_4 1.0 mM en H_2SO_4 0.5 mM por cronoamperometría aplicando un potencial a -0.05 V por 100 segundos. Los electrodos se limpiaron con H_2SO_4 y con KCl mediante voltametría cíclica aplicando 2 ciclos a un potencial de +0.7 a -0.2 V y una velocidad de barrido de 0.05 V/s antes de proceder con la quimiosorción de los péptidos. La metodología

empleada fue tomada del estudio titulado “Modificación de electrodos impresos con nanopartículas de oro y péptidos PEPTIR para la detección de *Escherichia coli* en matrices acuosas” del grupo de investigación CIBAS de la Universidad de Santander.

Las propiedades electroquímicas de los electrodos serigrafiados (SPEs) con las AuNPs se evaluaron mediante voltamperometría cíclica (CV), voltamperometría de onda cuadrada (SWV) y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), utilizando una solución acuosa de hexacianoferrato de potasio (II) / (III), como sonda redox y KCl (0,1 M) como electrolito de referencia. Las mediciones de CV se realizaron entre +0,8 y -0,4 V dejando 10 s de estabilización o equilibrio a +0,8 V y una velocidad de barrido de 50 mV / s.

3.5.2 Modificación mediante nanotubos de carbono

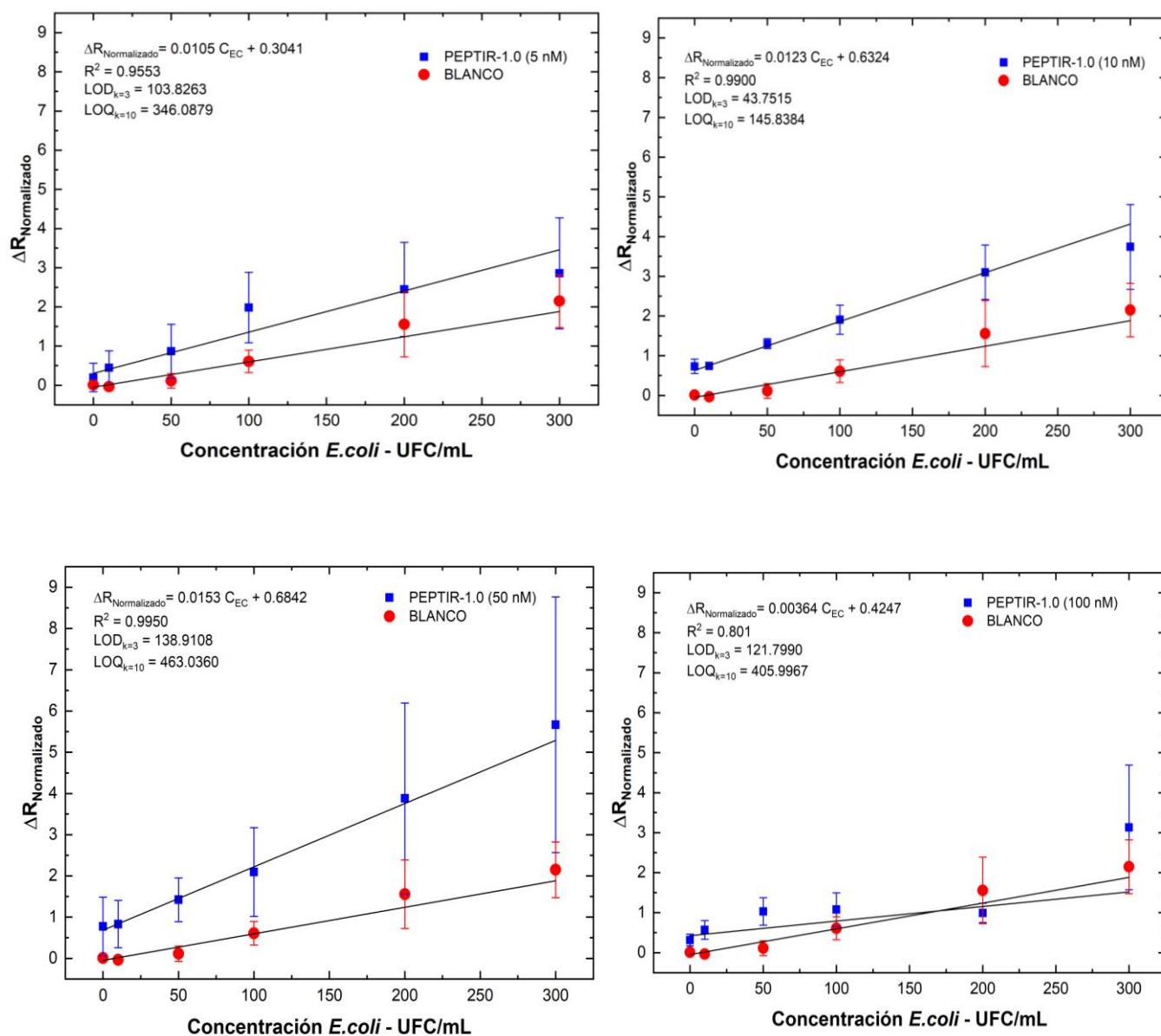
La modificación del transductor mediante nanotubos de carbono se realizó con el objetivo de determinar las concentraciones óptimas de nanotubos de carbono para mejorar la señal del biosensor, ya que el uso de estas estructuras carbonosas otorga al transductor mayores capacidades conductivas de nanotubos de carbono requieren una dispersión para su posterior deposición sobre los electrodos de trabajo. En este proceso, los nanotubos de carbono se dispersaron en agua tipo I en un sonicador. Una vez cumplida esta etapa, se depositó la dispersión sobre los electrodos mediante la técnica de drop casting durante 30 minutos y se realizó la caracterización mediante las técnicas electroquímicas SWV y EIS.

4 Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de los biosensores, basados en los péptidos PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0 para la detección de *E.coli* O157:H7 a diferentes concentraciones. La primera sección muestra las curvas de calibración obtenidas a medida que varían la concentración de los péptidos y la concentración de microorganismo. La segunda sección muestra los análisis del comportamiento electroquímico de los biosensores representados en los diagramas de Nyquist y voltametría de onda cuadrada. La tercera sección muestra los análisis estadísticos realizados para cada uno de los péptidos PEPTIR 1.0 y 2.0 en función de la resistencia de los biosensores. En la cuarta sección se muestra el análisis de la influencia de la concentración de microorganismos en la respuesta del biosensor. Y finalmente, se muestra el análisis de selectividad de los biosensores sobre diferentes microorganismos y la influencia en la detección de *Escherichia coli* O157:H7.

4.1 Calibración de concentración de péptidos PEPTIR 1.0 y 2.0

A continuación, se presenta la curva de calibración realizada para cada uno de los péptidos PEPTIR 1.0 y 2.0 a diferentes concentraciones, con el fin de establecer el campo analítico químico correlacionando la concentración del microorganismo en una escala logarítmica y los valores de la resistencia de transferencia de carga normalizados ($\Delta R_{\text{Normalizado}}$). En la Figura 8 se muestra la curva de calibración realizada para el PEPTIR 1.0 con diferentes concentraciones (5, 10, 50 y 100 nM), relacionando los valores del $\Delta R_{\text{Normalizado}}$ con las concentraciones de *Escherichia coli* O157:H7 (0, 50, 100, 200 y 300 UFC/mL), comparando cada una de ellas con el blanco que corresponde al biosensor electroquímico sin PEPTIR 1.0 inmovilizado.

Figura 10. Curva de calibración PEPTIR 1.0

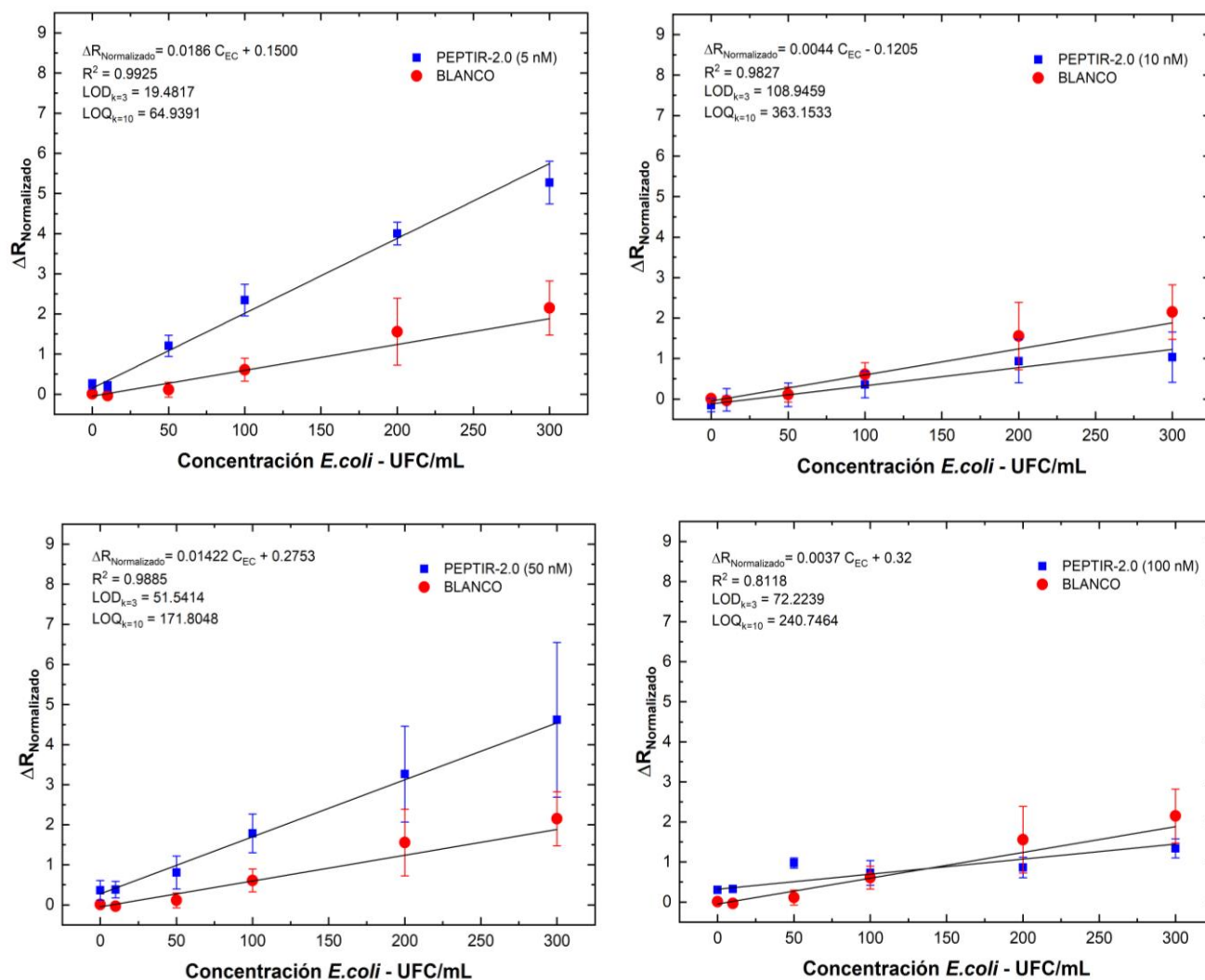
Como se puede observar, la concentración de 5 nM para el PEPTIR 1.0 evidenció un coeficiente de correlación R^2 de 0.95, un límite de detección de 103.8 UFC/mL y un límite de cuantificación de 346.0 UFC/mL. La siguiente curva de calibración corresponde a una

concentración de 10 nM, en la cual se evidencia que hay un aumento en la pendiente con respecto al blanco y en la respuesta del péptido, lo cual se ve reflejado en un R^2 de 0.99, un límite de detección de 43.75 y un límite de cuantificación de 145.8 UFC/mL. Por otro lado, a una concentración de 50 nM el PEPTIR 1.0 presenta una correlación R^2 la cual llega a ser de 0.99, un límite de detección de 138.9 UFC/mL y un límite de cuantificación de 463.4 UFC/mL. La concentración más alta de péptido PEPTIR 1.0 inmovilizado es 100 nM con un coeficiente de correlación R^2 de 0.81, un límite de detección de 121.7 UFC/mL y un límite de cuantificación de 405.9 UFC/mL, para esta concentración se pudo evidenciar que a medida que aumenta la concentración de microorganismo, no se observa un cambio en la resistencia en comparación con el blanco, esto puede ser atribuido al aglomeramiento del péptido en la superficie del electrodo, provocando una interferencia en la detección del microorganismo, además, a medida que aumenta la concentración de *Escherichia coli* O157:H7, el error crece, evidenciando un coeficiente R^2 inferior a las demás concentraciones. Por otro lado, las concentraciones de 10 y 50 nM presentan un rango lineal con un coeficiente de correlación R^2 de 0.99 mejorando la respuesta frente a *Escherichia coli* O157: H7 comparada con las concentraciones de 5 y 100 nM, sin embargo, se observa una menor variación en el error a medida que la concentración de *Escherichia coli* crece cuando se emplean 10 nM de PEPTIR 1.0, aunado a que en esta concentración se presenta un límite de detección inferior a las demás, por lo anterior se establece que la concentración péptido a emplear es 10 nM.

A continuación, en la Figura 9 se presenta la curva de calibración realizada para el PEPTIR 2.0 con diferentes concentraciones (5, 10, 50 y 100 nM) relacionando los valores del $\Delta R_{\text{Normalizado}}$ con las concentraciones de *Escherichia coli* O157: H7 (0, 50, 100, 200 y 300 UFC/mL),

comparando cada una de ellas con el blanco que corresponde al biosensor electroquímico sin PEPTIR 2.0 inmovilizado.

Figura 11. Curva de calibración PEPTIR 2.0



Como se puede observar en la curva de calibración de la concentración de 5 nM para el PEPTIR 2.0 el coeficiente de correlación R^2 es 0.99, presentando un límite de detección de 19.4 UFC/mL y un límite de cuantificación de 64.9 UFC/mL. Por otro lado, la curva de calibración a una concentración de 10 nM el coeficiente de correlación R^2 es 0.98, un límite de detección de

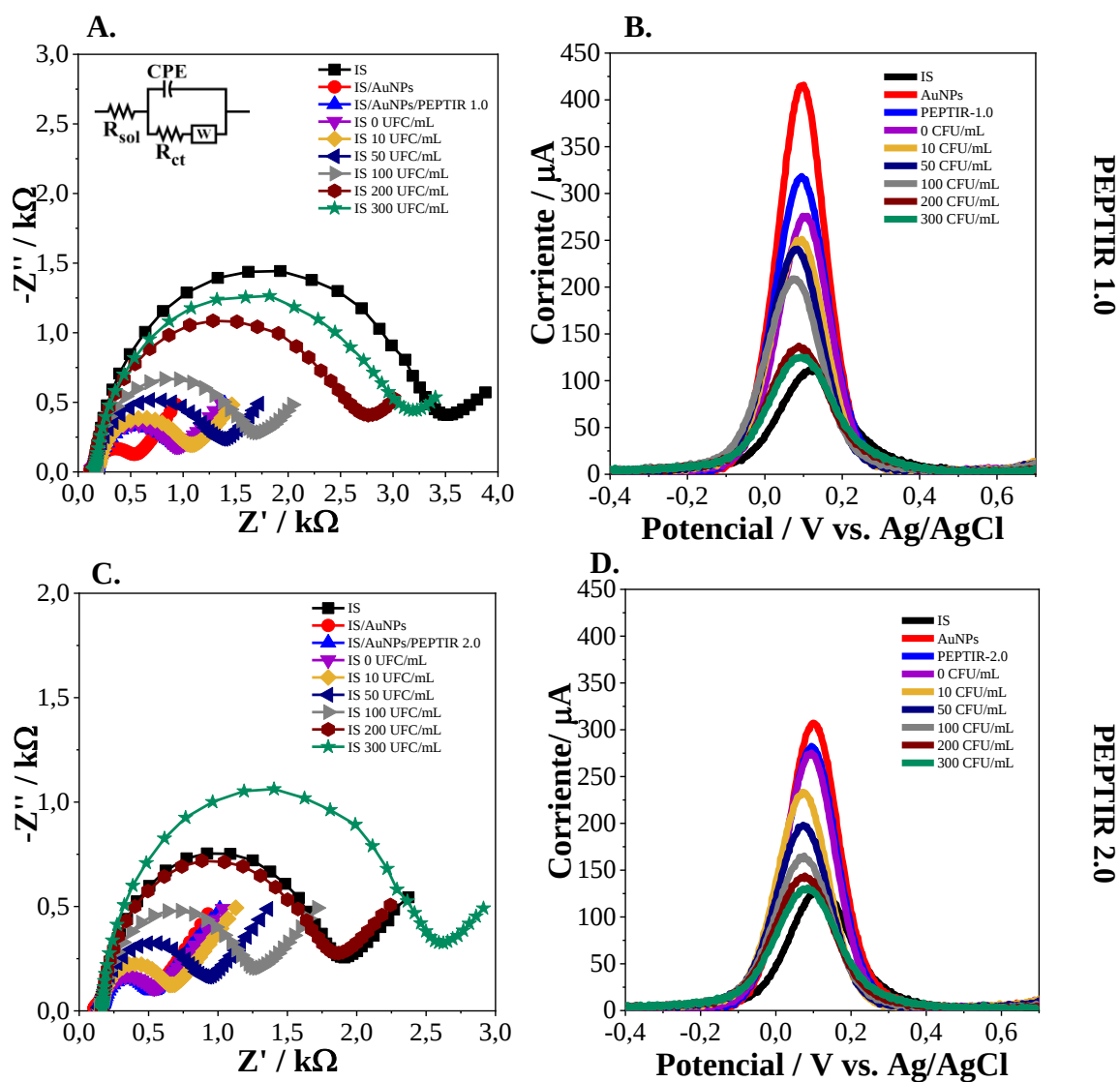
108.9 UFC/mL y un límite de cuantificación de 363.1 UFC/mL presentado una respuesta inferior frente a *Escherichia coli* O157: H7 comparada con la concentración de 50 nM, en la cual se evidencia que hay un aumento en la pendiente con respecto al blanco y en la respuesta del péptido presenta un coeficiente de correlación R^2 de 0.98, un límite de detección de 51.54 UFC/mL y un límite de cuantificación de 171.8 UFC/mL. La concentración más alta de péptido PEPTIR 2.0 usado es 100 nM, la cual presentó un coeficiente de correlación R^2 de 0.81, un límite de detección de 72.2 UFC/mL y un límite de cuantificación de 240.7 UFC/mL. En esta curva de calibración, se observa que a medida que aumenta la concentración de microorganismo no hay un cambio en la resistencia en comparación con el blanco, a diferencia del comportamiento mostrado en el ensayo a 5 nM, en el cual se evidencia un claro aumento en la detección del microorganismo reflejado en la resistencia respecto al biosensor sin péptido inmovilizado, además de presentar un límite de detección inferior a las demás concentraciones evaluadas. Este análisis puede relacionarse con el estudio realizado por Pandey et al 2017, quienes establecen un rango lineal de 100 a 108 UFC/mL y un límite de detección de 3.8 UFC/mL, sin embargo, los tiempos son superiores a 1 hora y la modificación de los electrodos fue realizada interconectando grafeno con microelectrodos interdigitados de condensadores biofuncionalizados con anticuerpos específicos para *Escherichia coli* O157: H7 (Pandey et al., 2017). Esto permite destacar la sensibilidad de los péptidos PEPTIR 2.0, ya que, con solo modificar la superficie del electrodo con nanopartículas de oro, permite detectar desde las 19.4 UFC/mL en apenas 30 minutos, con un rango lineal de 0 a 300 UFC/mL con un coeficiente de correlación de 99%.

Teniendo en cuenta lo anterior, a continuación, se presentan las técnicas electroquímicas para cada una de las concentraciones establecidas de los péptidos PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0 de 10 nM y 5 nM respectivamente.

4.2 Comportamiento electroquímico de los biosensores

A continuación, se presentan los resultados de las técnicas empleadas para analizar el comportamiento electroquímico de los biosensores mediante los diagramas de Nyquist con una concentración de la cupla redox de 5 mM y voltametría de onda cuadrada con una concentración de 10 mM para cada una de las concentraciones establecidas de los péptidos PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0 de 10 nM y 5 nM respectivamente.

Figura 12. Comportamiento electroquímico de la detección de *Escherichia coli* con PEPTIR 1.0 (10 nM) y PEPTIR 2.0 (5 nM).



Los diagramas de Nyquist para el PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0 se describen en la Figura 10A y 10C, los cuales fueron obtenidos mediante la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). En esta técnica se evidencian las modificaciones realizadas en el biosensor obtenidas en 5 mM de la cupla redox en un circuito de potencial abierto, para un rango de frecuencia desde 0.5 a 50000 Hz. En esta figura se puede observar la formación de los semicírculos que hacen referencia a la resistencia en la transferencia de electrones ajustados al circuito de Randles. La primera modificación realizada al electrodo de trabajo corresponde a la electrodeposición de las nanopartículas de oro mediante la técnica de cronoamperometría (CA), usando el oro como precursor en una solución HAuCl_4 0.5 M, parámetros establecidos por Cobos en 2021. En el diagrama de Nyquist se evidencia que después de la electrodeposición de las nanopartículas de oro (serie roja), la señal de la impedancia disminuye debido a que la cupla de hexacianoferrato II/ hexacianoferrato III presenta una oxidación y/o reducción en la interfaz del electrodo modificado con nanopartículas, lo que genera un aumento en la transferencia de electrones. Posterior a la electrodeposición de AuNPs se incuban los electrodos con los péptidos PEPTIR durante 16 horas. Transcurrido este tiempo se presenta un aumento en la resistencia debido a la inmovilización del péptido sobre los electrodos modificados con nanopartículas de oro (AuNPs), esto sucede ya que el péptido presenta un aminoácido cisteína en la región N-terminal de la cadena, lo cual permite la formación de un enlace estable S-Au con las nanopartículas de oro en la superficie del biosensor mediante la quimiosorción de tioles (Redondo, 2021). Una vez determinada la inmovilización de los péptidos PEPTIR se realizó la detección de *Escherichia coli* O157: H7 en un rango de concentraciones de 0, 10, 50, 100, 200 y 300 UFC/mL, en un tiempo de incubación de 30 minutos para cada concentración, evidenciando un aumento en la resistencia a

medida que se aumenta la concentración, esto se atribuye a la interacción del elemento biológico de reconocimiento y la diana de la batería que afecta la conductividad.

Por otra parte, en la Figura 10B y 10D se presenta la técnica electroquímica de voltametría de onda cuadrada, en la cual la corriente se relaciona con el potencial de redox, en estos voltamogramas se evidencia que a medida que se realizan las modificaciones en los electrodos la corriente disminuye afirmando los resultados presentados mediante la espectroscopia de impedancia electroquímica. Estos resultados describen el comportamiento electroquímico para la detección destacando que el PEPTIR 2.0 presenta una mayor sensibilidad respecto al péptido PEPTIR 1.0, debido a que en el trabajo realizado por Redondo en 2021, el PEPTIR 2.0 según los estudios *in silico* de docking molecular presenta una mayor afinidad con la molécula diana intima y por esta razón a menor concentración tiene un menor límite de detección y límite de cuantificación respecto al PEPTIR 1.0 con una concentración de 10 nM.

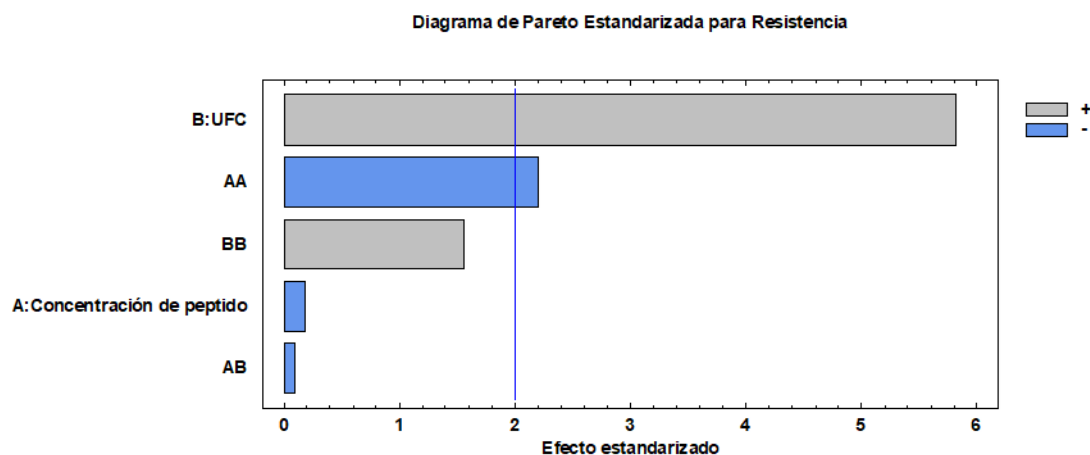
Con el objetivo de verificar las anteriores aseveraciones, se realizan los análisis estadísticos de la influencia de la concentración para cada uno de los PEPTIR 1.0 y 2.0 en la respuesta biosensor en la detección de *E.coli O157:H7*, el cual se aborda en la siguiente sección.

4.3 Análisis estadístico de los biosensores.

En este apartado, se presentan los resultados obtenidos en los análisis estadísticos desarrollados mediante un diseño multifactorial en el software Statgraphics. En este diseño se analizó la influencia de los péptidos PEPTIR 1.0 y 2.0 a las concentraciones de (5, 10, 50 y 100 nM) en el comportamiento de la resistencia obtenida mediante el circuito de Randles.

El análisis de varianza realizado para el PEPTIR 1.0 y descrito en el diagrama de Pareto muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados, desde efecto de mayor significancia estadística al efecto de menor, como se muestra en la Figura 11.

Figura 13. Diagrama de Pareto PEPTIR 1.0 para la resistencia

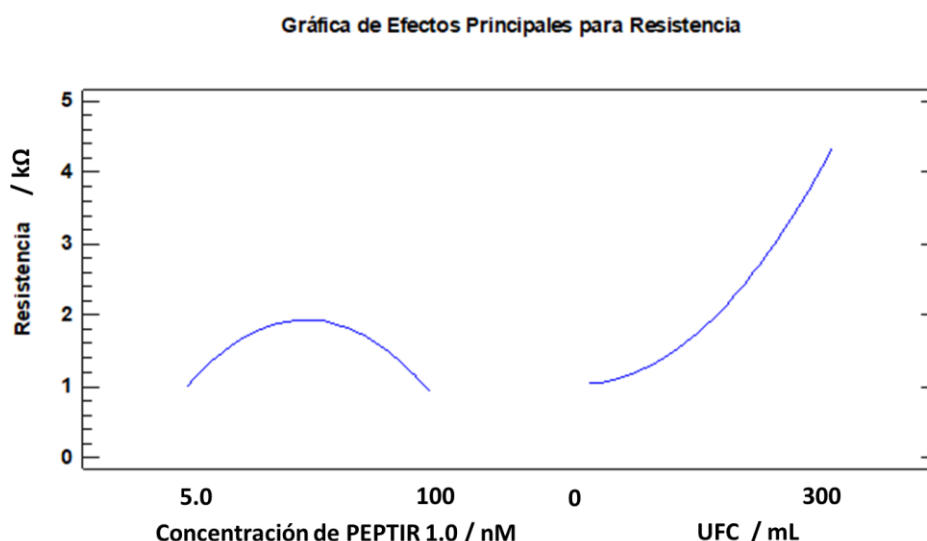


Donde, A corresponde a la concentración de péptido usado para la inmovilización en el biosensor, B corresponde a las concentraciones de microorganismo en unidades formadoras de colonia (UFC) empleadas para la detección, AA corresponde al efecto de segundo orden (cuadrático) generado por la concentración de péptido, BB corresponde al efecto cuadrático de la concentración de microorganismo en UFC y AB corresponde al efecto generado por la interacción de la variación de ambos factores sobre la detección del microorganismo reflejado en la resistencia obtenida mediante la técnica de impedancia electroquímica.

Lo anterior permite afirmar que la concentración de microorganismo (UFC) genera un efecto positivo reflejado en un aumento en la resistencia en el biosensor, sobrepasando el límite de significancia estadística (línea azul), de igual manera la concentración del péptido PEPTIR 1.0 presenta un efecto negativo de segundo orden sobre la resistencia del biosensor. Con el objetivo

de verificar lo anterior, a continuación, en la Figura 12 se presentan los efectos principales de las concentraciones del péptido y el microorganismo sobre la resistencia del biosensor.

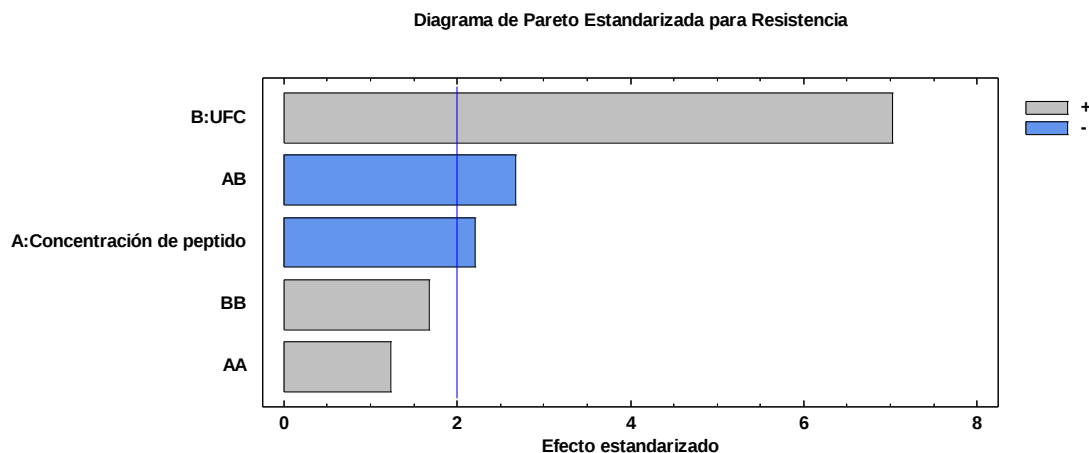
Figura 14. Gráfica de efectos principales para la resistencia



La Figura 12 describe el comportamiento de los efectos principales, concentración de PEPTIR 1.0 y concentración de microorganismo en la resistencia del biosensor. En esta figura se evidencia que a medida que la concentración de péptido aumenta, genera un efecto negativo de orden cuadrático, presentado un valor máximo en la resistencia cuando la concentración de PEPTIR 1.0 es 10 nM, lo anterior, se complementa con lo descrito en el diagrama de Pareto de la Figura 11 y afirma los resultados obtenidos del análisis de calibración de la concentración de péptido mostrado en la primera sección de este capítulo. Por otro lado, se observa que a medida que aumenta la concentración de microorganismo (UFC), el valor de la resistencia presenta un comportamiento ascendente que confirma que el biosensor tiene la capacidad de detectar *E.coli* O157:H7 a diferentes concentraciones.

El análisis de varianza realizado para el PEPTIR 2.0 y descrito en el diagrama de Pareto muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados, desde efecto de mayor significancia estadística al efecto de menor, como se muestra en la Figura 13.

Figura 15. Diagrama de Pareto para la resistencia PEPTIR 2.0

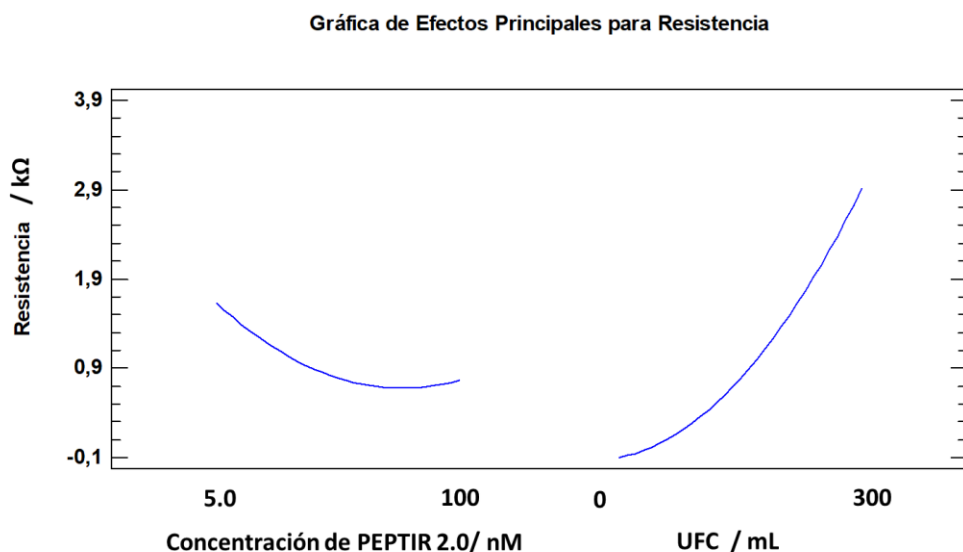


Donde, A corresponde a la concentración de péptido usado para la inmovilización en el biosensor, B corresponde a las concentraciones de microorganismo en unidades formadoras de colonia (UFC) empleadas para la detección, AA corresponde al efecto de segundo orden (cuadrático) generado por la concentración de péptido, BB corresponde al efecto cuadrático de la concentración de microorganismo en UFC y AB corresponde al efecto generado por la interacción de la variación de ambos factores sobre la detección del microorganismo reflejado en la resistencia obtenida mediante la técnica de impedancia electroquímica.

Lo anterior permite afirmar que al igual que para el PEPTIR 1.0, la concentración de microorganismo (UFC) genera un efecto positivo reflejado en un aumento en la resistencia detectada en el biosensor con PEPTIR 2.0 inmovilizado, sobrepasando el límite de significancia estadística (línea azul). Por otra parte, la concentración del péptido PEPTIR 2.0 y la interacción de

las concentraciones de PEPTIR 2.0 sobre la del microorganismo presentan un efecto negativo de sobre la resistencia del biosensor. Con el objetivo de verificar lo anterior, a continuación, en la Figura 14 se presentan los efectos principales de las concentraciones del péptido y el microorganismo sobre la resistencia del biosensor.

Figura 16. *Gráfica de efectos principales PEPTIR 2.0*



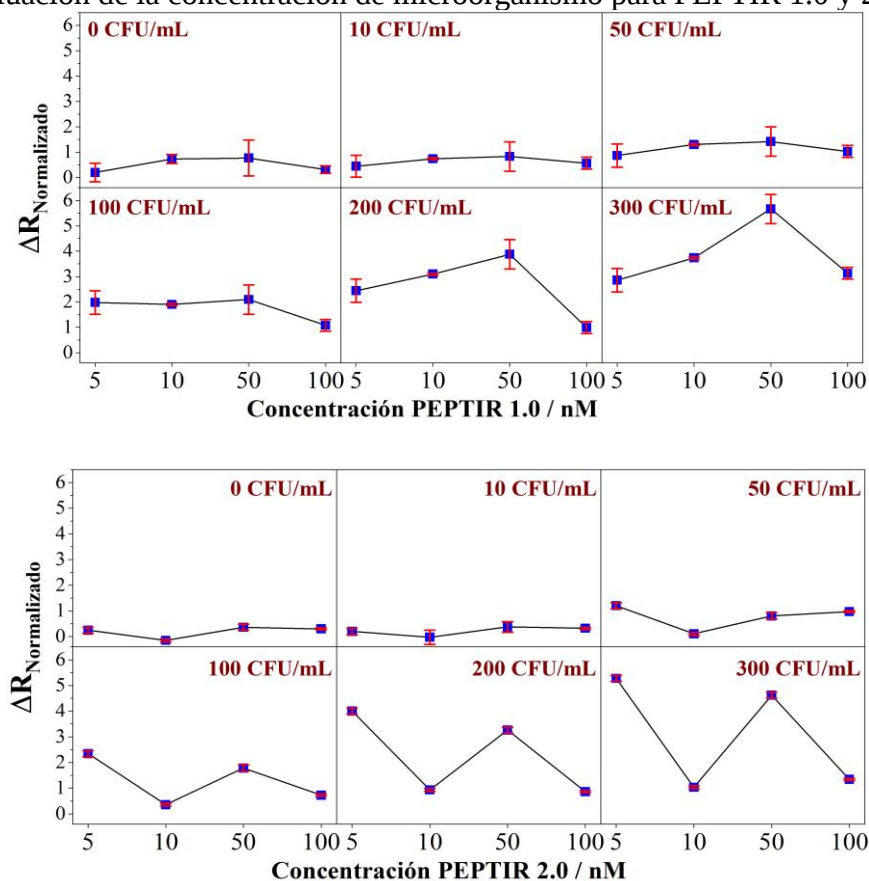
La Figura 14 describe el comportamiento de los efectos principales, concentración de PEPTIR 2.0 y concentración de microorganismo en la resistencia del biosensor. En esta figura se evidencia que a medida que la concentración de PEPTIR 2.0 aumenta, genera un efecto negativo, presentado un valor máximo en la resistencia cuando la concentración de PEPTIR 2.0 es 5 nM, lo anterior, se complementa con lo descrito en el diagrama de Pareto de la Figura 6 y afirma los resultados obtenidos del análisis de calibración de la concentración de péptido PEPTIR 2.0 mostrado en la primera sección de este capítulo. Por otro lado, se observa que a medida que aumenta la concentración de microorganismo (UFC), el valor de la resistencia confirma que el

biosensor con PEPTIR 2.0 inmovilizado tiene la capacidad de detectar *Escherichia coli* O157:H7 a diferentes concentraciones debido a que presenta un aumento en el valor de la resistencia.

4.4 Análisis de la influencia de concentración de microorganismos en el biosensor

Una vez obtenida la concentración de péptido PEPTIR 1.0 y 2.0 que presenta las mejores condiciones para la detección del microorganismo, es necesario evaluar el comportamiento del biosensor a medida que la concentración de microorganismo varía. A continuación, se presenta la relación del valor normalizado de cada una de las concentraciones de microorganismo para las concentraciones de péptido PEPTIR 1.0 y 2.0 definidas en la anterior sección.

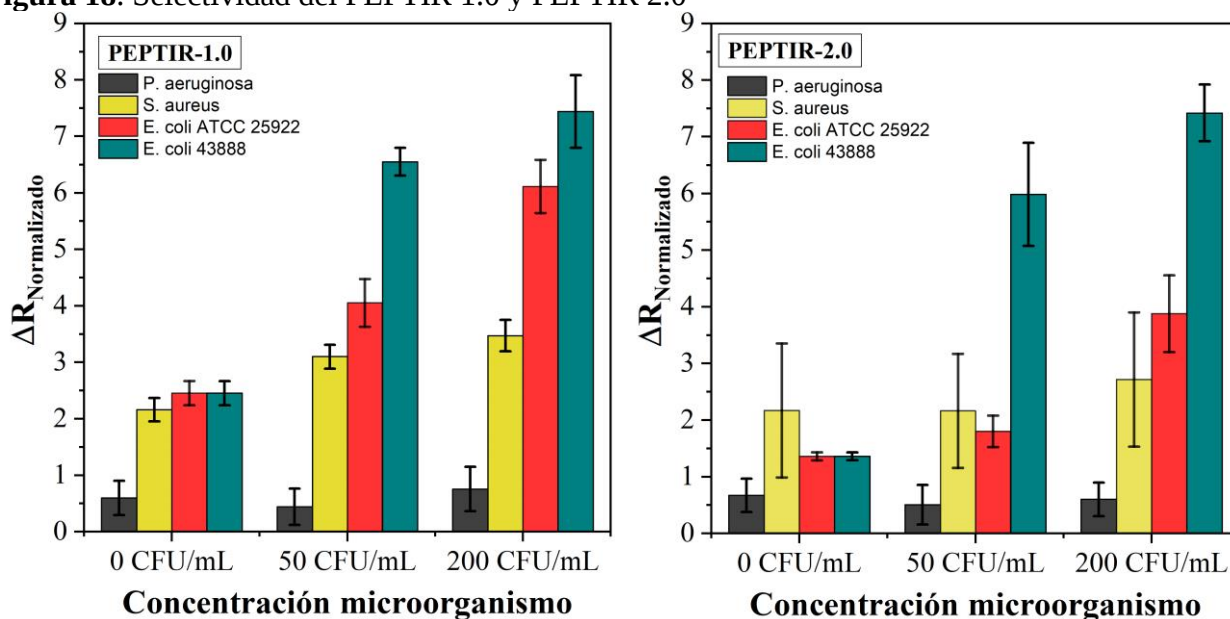
Figura 17. Evaluación de la concentración de microorganismo para PEPTIR 1.0 y 2.0



Con el objetivo de determinar el rango de linealidad del biosensor modificado con péptido y una vez determinadas concentraciones de PEPTIR 1.0 y 2.0 de 10 y 5 nM, y los límites de detección de 43.7 y 19.4 UFC/mL respectivamente, el análisis de la Figura 15 permite inferir que las concentraciones de microorganismo a las cuales el biosensor presenta un comportamiento linealmente estable se encuentra en el rango de 50 a 200 UFC/mL, ya que se observa un cambio en el valor de $\Delta R_{\text{normalizado}}$ a medida que la concentración del microorganismo aumenta de manera lineal, y este se encuentra dentro de los límites de detección para el PEPTIR1.0 y PEPTIR 2.0.

4.5 Análisis de selectividad de los biosensores sobre diferentes microorganismos

A continuación, se presenta las pruebas de selectividad realizadas para el PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0 para diferentes microorganismos, los cuales fueron *P. aeruginosa*, *S.aureus* y *E coli* ATCC 25922. En la figura 16 se presentan los ensayos realizados para determinar la selectividad del PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0 a las concentraciones anteriormente establecidas las cuales fueron 10 nM y 5 nM respectivamente. De igual manera, se establecieron tres concentraciones a evaluar las cuales fueron 0, 50 y 200 UFC/mL evaluados mediante la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). Cada microorganismo se evaluó con biosensores diferentes con el fin de obtener un triplicado para cada concentración y evaluar la reproducibilidad.

Figura 18. Selectividad del PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0

Como se puede observar, *S. aureus* presenta un aumento en la resistencia que no es significativa comparada con el blanco, presentando un aumentando en el error, esto se debe a que es una bacteria Gram positiva y no presenta la molécula de reconocimiento. Por otro lado, se evaluó *P. aeruginosa*, la cual es un patógeno bacteriano oportunista Gram-negativo que se encuentra comúnmente en suelo, agua y ambientes, como se evidencia en la Figura 16 para el PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0 no hay un aumento en la resistencia a medida que las concentraciones aumentan ya que no existen ninguna interacción del péptido y el microorganismo. La evaluación de *Escherichia coli* ATCC 25922 que es la cepa no patógena se realizó con el fin de determinar el comportamiento de los péptidos PEPTIR frente a otra cepa de *Escherichia coli*, el PEPTIR 1.0 presenta una menor selectividad con *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* O157:H7 a 200 UFC/mL ya que las barras de error se solapan, por lo tanto, el PEPTIR 1.0 podría estar detectando la célula completa a esta concentración. Y, por otro lado, el PEPTIR 2.0 presenta una mejor selectividad en las concentraciones evaluadas, tanto en 50 UFC/mL como en 200 UFC/mL con una concentración

de 5nM, lo que indica que el PEPTIR 2.0 está interactuando con la proteína de la membrana intimina específica de este microorganismo.

5 Conclusiones

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

- El desarrollo del biosensor electroquímico basado en electrodos serigrafados permite concluir que las modificaciones con nanopartículas de oro sobre la superficie del electrodo permiten inmovilizar péptidos PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0 a las concentraciones de 10 y 5 nM respectivamente, determinadas mediante el análisis estadístico multifactorial para cada uno de los péptidos.
- Las determinaciones de las características analíticas de los biosensores, empleando espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) permiten determinar que el PEPTIR 2.0 presenta una mayor sensibilidad debido a que, el LOD de 19.4 UFC/mL, es menor respecto al péptido PEPTIR 1.0, con LOD de 43.75 UFC/mL. Esto se atribuye a que el PEPTIR 2.0 presenta una mayor afinidad con la molécula diana intimina, por lo tanto, a una concentración menor de 5 nM el PEPTIR 2.0 presenta un límite de cuantificación (LOQ 64.9 UFC/mL) menor al límite de cuantificación del PEPTIR 1.0 (LOQ 145.8 UFC/mL) con una concentración de 10 nM.
- La evaluación de selectividad de los péptidos permite concluir que el PEPTIR 2.0 presenta una mejor especificidad de *Escherichia coli* O157:H7 en presencia de *S aureus*, *P aeruginosa* y *Escherichia coli* no patógena a concentraciones de 50 y 200 UFC/mL en comparación con el PEPTIR 1.0, el cual es selectivo solo a 50 UFC/mL.
- Las modificaciones del transductor realizadas con nanopartículas de oro exhibieron un comportamiento que permitió la inmovilización de los péptidos PEPTIR 1.0 y PEPTIR 2.0 y la

detección de *Escherichia coli* O157:H7 de manera satisfactoria, por esta razón, el estudio de modificación mediante la técnica dropcasting con nanotubos de carbono se delimitó a determinar la concentración optima. En la cual mediante la evaluación de 10 concentraciones (3.9, 7.8, 15, 31, 62, 125, 250, 500, 1000 y 2000 $\times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$) se determinó que la concentración optima es 7.8 $\times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$, esto bajo la hipótesis que esta modificación mejorará la sensibilidad y selectividad de los biosensores. La determinación del comportamiento de los biosensores modificados con AuNP y nanotubos de carbono en la detección de *Escherichia coli* O157:H7 se establece para trabajo futuro como continuación a esta investigación.

6 Recomendaciones

Se recomienda para estudios posteriores, la evaluación de las nanoestructuras de carbono a la concentración establecida con el fin de mejorar las propiedades eléctricas del transductor y evaluarlo en la detección de *Escherichia coli* O157:H7, además de incluir modificaciones con diferentes polielectrolitos, esto permitiría obtener señales electroquímicas posiblemente con mayor sensibilidad, que eventualmente puedan favorecer una mejor correlación entre los fenómenos de interacción entre la molécula de reconocimiento y el receptor. Por otra parte, es importante realizar estudios de estabilidad del biosensor que permitan establecer su vida útil, con el fin de dar más información sobre las capacidades operativas del dispositivo y del costo-beneficio que podría representar esta tecnología.

Referencias

- Alcaraz, M. R., Fabiano, S. N., & Cámara, M. S. (2013). *Desarrollo de un biosensor amperométrico de tirosinasa para la determinación de contenido fenólico total en aguas superficiales*.
- Alhadrami, H. A. (2018). Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/bab.1621>
- Altug, H., Oh, S. H., Maier, S. A., & Homola, J. (2022). Advances and applications of nanophotonic biosensors. *Nature Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-01045-5>
- Angel, K. S. O., Sánchez-evangelista, G., Carmona-navarrete, I., Galicia-sánchez, M. C., Gómez-luna, A., & Islas-arrollo, S. J. (2018). *Péptidos antimicrobianos , una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas*. 681–688. <https://doi.org/10.24875/GMM.18003445>
- Brosel-Oliu, S., Ferreira, R., Uria, N., Abramova, N., Gargallo, R., Muñoz-Pascual, F.-X., & Bratov, A. (2017). *Novel impedimetric aptasensor for label-free detection of Escherichia coli O157:H7*. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.121>
- Cesewski, E., & Johnson, B. N. (2020a). Biosensors and Bioelectronics Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 159(April), 112214. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112214>
- Cesewski, E., & Johnson, B. N. (2020b). Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112214>
- Chávez, M. (2017). *Caracterización de Monocapas Autoensambladas de Tioles sobre Superficies de Oro*.

- Cho, I. H., Kim, D. H., & Park, S. (2020). Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. *Biomaterials Research*. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0181-y>
- Cobos, J. R. (2019). *Efecto de las propiedades de transporte eléctrico de materiales nanoestructurados aplicados al diseño de biosensores electroquímicos*.
- González, V. (2015). *Biosensores electroquímicos basados en nanomateriales y en materiales magnéticos para la determinación de analitos de interés bioquímico*.
- Gupta, R., Raza, N., Bhardwaj, S. K., Vikrant, K., Kim, K. H., & Bhardwaj, N. (2021). Advances in nanomaterial-based electrochemical biosensors for the detection of microbial toxins, pathogenic bacteria in food matrices. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123379. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123379>
- Kaur, H., Bhosale, A., & Shrivastav, S. (2018). Biosensors: Classification, Fundamental Characterization and New Trends: A Review. *International Journal of Health Sciences & Research (Www.Ijhsr.Org)*. www.ijhsr.org
- Kulagina, N. V., Lassman, M. E., Ligler, F. S., & Taitt, C. R. (2005). Antimicrobial peptides for detection of bacteria in biosensor assays. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac050639r>
- López, L. S. (2021). *Estudio de factores de virulencia en Escherichia coli*.
- Magar, H. S., Hassan, R. Y. A., & Mulchandani, A. (2021). Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications. *Sensors*. <https://doi.org/10.3390/s21196578>
- Mirceski, V., Skrzypek, S., & Stojanov, L. (2018). Square-wave voltammetry. *ChemTexts*, 4(4), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s40828-018-0073-0>

- Pandey, A., Gurbuz, Y., Ozguz, V., Niazi, J. H., & Qureshi, A. (2017). Biosensors and Bioelectronics Graphene-interfaced electrical biosensor for label-free and sensitive detection of foodborne pathogenic E . coli O157 : H7. *Biosensors and Bioelectronic*, 91(October 2016), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.041>
- Primo, N. (2016). *Electrodos modificados con nanotubos de carbono y grafeno*.
- Ramón, M. (2017). *Desarrollo de biosensores para el control de parámetros bioquímicos*.
- Redondo, J. F. (2021). *Evaluación de péptidos análogos a la proteína Tir Como Moléculas de Reconocimiento en Biosensores Electroquímicos para la Detección de Escherichia Coli O157:H7 en Matrices Acuosas*.
- Ren, S., Zhang, X., Li, Z., Jian, X., Zhao, J., & Yan, Y. (2021). Development of a pulse - induced electrochemical biosensor based on gluconamide for Gram - negative bacteria detection. *Microchimica Acta*. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-05073-9>
- Roldán, C. (2019). *Monitoreo de la formación de complejos coacervados y emulsiones O/W con el uso de espectroscopía de impedancia eléctrica y voltametría cíclica*.
- Ropero-vega, J. L., Redondo-ortega, J. F., Galvis-curubo, Y. J., Rond, P., & Marcela, J. (2021). *on Electrochemical Biosensors for the Detection of E . coli O157 : H7 in an Aqueous Matrix*.
- Rosado-Porto, D., Bonivento-Calvo, J., Salcedo-Mendoza, S., Molina-Castillo, A., Maestre-Serrano, R., & García, A. D. C. (2021). Determinación de E. coli biotipo 1 y E. coli O157:H7 en canal de carne bovina en plantas de beneficio del departamento del Atlántico (Colombia). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i3.18476>
- Royano, S. (2020). *Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas*.
- Sánchez, V. H. (2016). *Desarrollo de biosensores para la detección de hidrocarburos aromáticos*

en aguas marinas Programa.

Sandoval, G., & Herrera, E. (2018). *Lipase, Phospholipase, and Esterase Biosensors (Review)*. 1835.

Torres, J. (2019). *Desarrollo de un biosensor amperométrico bienzimático para la cuantificación simultánea de glucosa y colesterol en alimentos.*

Zhong, M., Yang, L., Yang, H., Cheng, C., Deng, W., Tan, Y., & Xie, Q. (2018). An electrochemical immunobiosensor for ultrasensitive detection of Escherichia coli O157:H7 using CdS quantum dots-encapsulated metal-organic frameworks as signal-amplifying tags. *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.11.001>