



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO**
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

Diseño de un biosensor impedimétrico para el
análisis de *Salmonella spp.* basado en una lectina
extraída de *Hechtia argentea*

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA

PRESENTA:

JORGE LÓPEZ TÉLLEZ

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA

DRA. IRAIS SÁNCHEZ ORTEGA

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO DICIEMBRE 2019



Mineral de la Reforma, Hgo., a 4 de diciembre de 2019

Número de control: ICB1-D/1405/2019
Asunto: Autorización de impresión.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Por este medio le comunico que el Jurado asignado al Pasante de Licenciatura en Química Jorge López Téllez, quien presenta el trabajo de titulación “Diseño de un biosensor impedimétrico para el análisis de *Salmonella spp.* basado en una lectina extraída de *Hechtia argentea*” después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Dra. María Elena Páez Hernández
PRIMER VOCAL: Dr. José Antonio Rodríguez Ávila
SECRETARIO: Dra. Iraís Sánchez Ortega
SUPLENTE: Dra. Esmeralda Rangel Vargas

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
“Amor, Orden y Progreso”

Dr. Óscar Rodolfo Suárez Castillo
Director del ICB1



ORSC/SEPC





Este trabajo de investigación se realizó en los laboratorios 1 y 2 del Área Académica de Química y en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo bajo la dirección del Dr. José Antonio Rodríguez Ávila y la Dra. Irais Sánchez Ortega.

Parte de este trabajo fue presentado en el congreso:

XXXII Congreso Nacional de Química Analítica y XXII Simposio Estudiantil. Con el trabajo titulado: “DISEÑO DE UN BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA EL ANÁLISIS DE *Salmonella* BASADO EN UNA LECTINA DE *Hechtia Argentea*”. Jorge López Téllez, Irais Sánchez Ortega, Claudia T. Hornung Leoni, José Antonio Rodríguez Ávila. Universidad Autónoma de San Luis Potosí del 12-14 de junio de 2019, 1er Lugar en la modalidad de Cartel.

Se agradece al CONACyT por el apoyo recibido a través del programa “Ayudantes de Investigador” con expediente del ayudante: 16721.

“Me he dado cuenta que incluso las personas que dicen que todo está predestinado y que no podemos hacer nada para cambiar nuestro destino, siguen mirando a ambos lados antes de cruzar la calle”

-Stephen Hawking

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme culminar esta etapa y lograr mis metas.

A mi madre Clara Téllez por todo su apoyo, su amor, por sus sacrificios, su empeño, su enorme paciencia y todos sus regaños que me permitieron obtener este logro.

A mi padre Ignacio López por su apoyo, paciencia, sacrificios, regaños y consejos.

Al Dr. José Antonio Rodríguez por permitirme trabajar con él, por sus enseñanzas, su paciencia, confianza y por su amistad.

A Ariadna Barbara Lara por apoyarme, acompañarme, por hacerme una mejor persona, por su tiempo y dedicación.

A mis amigos y compañeros que me acompañaron durante esta etapa.

A la Dra. Irais por su tiempo y paciencia durante el desarrollo de este trabajo. A la Dra. Páez y la Dra. Esmeralda por sus consejos y su tiempo en la revisión de este proyecto.

RESUMEN

Las infecciones bacterianas se encuentran entre las principales enfermedades que se diagnostican de manera incorrecta afectando a la población. Una de las principales enfermedades causada por bacterias es la salmonelosis, causada por algunos serotipos del género *Salmonella*. *Salmonella* es uno de los patógenos transmitidos por los alimentos. Son bacilos Gram negativos, de la familia bacteriana Enterobacteriaceae.

La detección de bacterias patógenas se realiza mediante técnicas como: cultivos tradicionales, microscopía electrónica de barrido, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, pruebas bioquímicas y la reacción en cadena de la polimerasa. A pesar de que estos métodos son óptimos y presentan buenos límites de detección de una bacteria en específico consumen mucho tiempo, son laboriosos.

A pesar de las ventajas analíticas de las técnicas mencionadas, se continúa con la búsqueda de nuevos métodos de análisis que sean económicos y permitan una detección en tiempos cortos. El uso de biosensores para detección bacteriana ha demostrado que puede contribuir a reducir los diagnósticos erróneos, minimizar tiempos de análisis y ser sencillos para la detección de bacterias. Los biosensores incorporan diferentes agentes de reconocimiento para el análisis de los analitos

Las lectinas son agentes de reconocimiento, principalmente de origen vegetal, capaces de reconocer carbohidratos que pueden estar contenidos en macroestructuras como: glicoproteínas, lipopolisacáridos y oligosacáridos. Las bacterias están constituidas por una pared celular que posee diferentes carbohidratos terminales los cuales pueden ser reconocidos por dichas lectinas. El presente proyecto propone la evaluación de una lectina obtenida de *Hechtia argentea* en el diseño de un biosensor impedimétrico sensible a *Salmonella spp.* que pueda contribuir a la reducción de tiempo de análisis además que sea eficiente.

ÍNDICE GENERAL
AGRADECIMIENTO
ÍNDICE GENERAL
ÍNDICE DE FIGURAS
ÍNDICE DE TABLAS

1. ANTECEDENTES.....	2
1.1 Bacterias	2
1.1.1 Bacterias Gram positivas	2
1.1.2 Bacterias Gram negativas	3
1.2 Lipopolisacáridos.....	4
1.3 <i>Salmonella spp.</i>	4
1.3.1 Métodos de identificación de <i>Salmonella spp.</i>	5
1.3.1.1 Cultivos microbiológicos.....	6
1.3.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa	7
1.3.1.3 Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas	7
1.4 Biosensores.....	8
1.4.1 Biosensores electroquímicos	8
1.4.1.1 Biosensores amperométricos	9
1.4.1.2 Biosensores potenciométricos.....	11
1.4.1.3 Biosensores voltamperométricos.....	12
1.4.1.4 Biosensores conductimétricos	13
1.4.1.5 Biosensores impedimétricos.....	14
1.5 Espectroscopia de impedancia electroquímica.....	15
1.6 Lectinas.....	17
1.6.1 Clasificación de lectinas.....	18
1.6.2 Nomenclatura de lectinas	22
1.6.3 Lectinas extraídas y reconocimiento.....	22
1.6.4 Interacción lectina-carbohidrato.....	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo general	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3. METODOLOGÍA.....	28
3.1 Extracción y cuantificación.....	28
3.2 Pruebas de aglutinación.....	29
3.3 Pruebas de selectividad e inhibición de carbohidratos.....	29

3.4 Determinación de proteínas mediante SDS-PAGE.....	29
3.5 Construcción del biosensor.....	31
3.6 Evaluación espectroscopia electroquímica de impedancia para carbohidratos.....	32
3.7 Análisis microbiológico.....	33
3.8 Análisis de muestras por métodos microbiológicos tradicionales	33
3.9 Análisis de muestras por espectroscopía de impedancia electroquímica.....	34
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	38
4.1 Prueba de aglutinación e inhibición de carbohidratos	38
4.2 Cuantificación de proteínas totales.....	40
4.3 Electroforesis SDS-PAGE.....	41
4.4 Construcción del biosensor.....	43
4.5 Evaluación del biosensor en el análisis de carbohidratos.....	46
4.6 Evaluación del biosensor en el análisis de bacterias.	47
4.7 Caracterización analítica del biosensor	49
4.7.1 Análisis por espectroscopia electroquímica de impedancia.....	49
4.7.2 Evaluación de muestras.	51
5. CONCLUSIONES	54
6. REFERENCIAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Composición de la pared celular de bacterias a) Gram negativa b) Gram positiva.	3
Figura 2	Representación del LPS de la bacteria <i>S. enterica</i> .	5
Figura 3	Representación de los formatos de pruebas ELISA	8
Figura 4	Representación esquemática del biosensor amperométrico.	10
Figura 5	Esquema representativo del biosensor potenciométrico.	11
Figura 6	Representación esquemática de la metodología del biosensor voltamperométrico	12
Figura 7	Representación del antígeno utilizado en el diseño del biosensor conductimétrico.	14
Figura 8	Representación esquemática de la inmovilización y análisis de <i>Salmonella spp</i> .	15
Figura 9	Representación de un circuito eléctrico.	16
Figura 10	Representación de un gráfico de Nyquist.	17
Figura 11	Estructura química de principales los carbohidratos terminales contenidos en macromoléculas	20
Figura 12	Representación esquemática de los 3 tipos de lectinas	21
Figura 13	Representación esquemática a) análisis microbiológico b) análisis por espectroscopia impedimétrica.	36
Figura 14	<i>Hechtia argentea</i>	38
Figura 15	Imágenes observadas al microscopio (40 x) de la aglutinación causada por el extracto Ha. a) sangre tipo A con extracto b) sangre tipo B con extracto c) sangre tipo O con extracto d) sangre tipo A sin extracto b) sangre tipo B sin extracto c) sangre tipo O sin extracto.	39
Figura 16	Línea de calibrado para la determinación de las proteínas totales en el extracto Ha	41
Figura 17	Representación de la movilidad de las proteínas en una electroforesis en un gel de poliacrilamida.	42
Figura 18	Gel SDS-PAGE de: A. a) estándar de proteínas de pesos moleculares conocidos y b) del extracto de Ha. B) Gráfico log PM (kDa) vs Movilidad relativa	43
Figura 19	Inicio de la formación de la monocapa mediante la adición con MHDA.	44
Figura 20	Activación de la monocapa mediante la formación de un éster de N-hidroxisuccinimida	45

Figura 21	Inmovilización de la lectina sobre la monocapa mediante la formación de una amida	45
Figura 22	Bloqueo de esteres de SNHS remanentes mediante formación de amidas con etanolamina	46
Figura 23	Gráficos complementarios de afinidad a) gráfico de Nyquist para ácido siálico, b) gráfico de Nyquist para D-manosa, c) gráfico de Nyquist para N-acetil-D-glucosamina, d) gráfico comparativo de la concentración de los carbohidratos respecto a los cambios en la resistencia del electrodo.	47
Figura 24	Diagramas de Nyquist a) <i>Salmonella spp.</i> b) <i>Listeria monocytogenes</i> .	48
Figura 25	Esquema de reconocimiento de <i>Salmonella spp.</i> por el biosensor impedimétrico.	49
Figura 26	Diagrama de Nyquist para <i>Salmonella spp.</i> en intervalo de concentraciones de 5.67×10^3 - 2.57×10^7 UFC mL ⁻¹	50
Figura 27	Línea de calibrado ΔR vs Log [Concentración (UFC mL ⁻¹)] de <i>Salmonella spp</i> intervalo de concentraciones de 5.67×10^3 - 2.57×10^7 UFC mL ⁻¹ con sus parámetros analíticos.	51
Figura 28	A) Gráfico de Nyquist para control positivo, B) Medios sólidos para control positivo C) Gráfico de Nyquist para control negativo, D) Medios sólidos para control negativo.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de lectinas	19
Tabla 2	Lectinas empleadas en el análisis de bacterias.	23
Tabla 3	Soluciones para la preparación del gel de poliacrilamida.	30
Tabla 4	Pruebas de inhibición y selectividad de carbohidratos. Concentración de cada carbohidrato= 0.5 M	40

ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

1.1 Bacterias

Las bacterias son células procariotas que presentan tamaños y formas variables; la mayoría presentan medidas entre 0.2-2 μm de diámetro y 2-8 μm de largo. Las formas más comunes son: cocos, bacilos y espirilos, aunque algunas llegan a presentar formas estrelladas o cuadradas [1].

Las células bacterianas poseen una pared que las protege contra la lisis por fuerzas osmóticas y ataques químicos o biológicos, además esta pared proporciona forma a la célula y facilita el transporte de productos químicos vitales de la célula. Los dos tipos de pared celular de acuerdo con su mecanismo de tinción. a la tinción de Gram son: Gram positivo y Gram negativo [2]. Ambos tipos están constituidos por componentes tales como: membrana interna, peptidoglicano y membrana externa, este último solo presente en bacterias Gram negativas.

1.1.1 Bacterias Gram positivas

Las bacterias Gram positivas (Fig. 1b) poseen dos componentes fundamentales: la membrana interna y el peptidoglicano. La membrana interna rodea y encierra al citoplasma celular actuando como una barrera semipermeable. El peptidoglicano es un polímero lineal conformado por carbohidratos unidos a cadenas de aminoácidos, como la N-acetil-D-glucosamina y el ácido N-murámico, que se conoce como la hebra de glicanos. El peptidoglicano forma una macromolécula de hasta 50 capas, interconectada mediante enlaces covalentes e interacciones moleculares que se encuentra fuera de la membrana interna de las células bacterianas, formando un exoesqueleto semirrígido que actúa como una vaina elástica que se estira a medida que el citoplasma crece, pero resiste lo suficiente para evitar rupturas por la alta presión osmótica interna [1,2].

1.1.2 Bacterias Gram negativas

A diferencia de las bacterias Gram positivas, las Gram negativas (Fig. 1a) poseen una bicapa lipídica-proteica llamada membrana externa que envuelve al peptidoglicano y le proporciona estructura a la célula [3]. Además, las bacterias Gram negativas tienen mucho menos peptidoglicano en comparación con bacterias Gram positiva.

La membrana externa es única debido a que las láminas internas y externas de la bicapa consisten en diferentes lípidos: la cara interna contiene fosfolípidos principales mientras que la cara externa es casi exclusivamente lipopolisacárido (LPS), una molécula presente solo en Bacterias Gram negativas.

En la Figura 1 se representa la conformación estructural de ambos tipos de pared celular además de sus componentes antes mencionados.

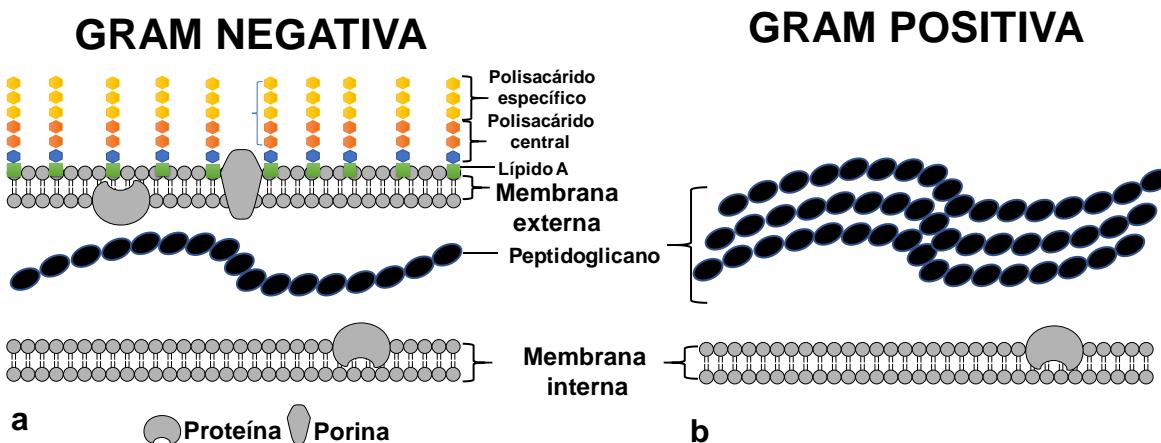


Figura 1. Composición de la pared celular de bacterias a) Gram negativa b) Gram positiva.

1.2 Lipopolisacáridos

Los LPS comprenden una familia de macromoléculas complejas. Un LPS está compuesto de lípido, un polisacárido central y una cadena de polisacárido específica. Debido a que la cadena de polisacáridos sobresale de la membrana externa hacia el exterior de la célula bacteriana hace que una misma especie bacteriana tenga diferentes propiedades biológicas como por ejemplo la toxicidad y la antigenicidad [4,5].

Las estructuras de los oligosacáridos centrales y especialmente las cadenas específicas muestran enormes variaciones estructurales entre géneros bacterianos e incluso dentro de especies bacterianas individuales. Dentro de las bacterias Gram negativas existen algunos géneros que tienen importancia desde el punto de vista sanitario, debido a que pueden causar enfermedades muy graves en el ser humano. Algunos ejemplos son: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas*.

Dentro de éstas se encuentra *Salmonella spp.*, la cual causa salmonellosis, que cada año afecta alrededor de 550 millones de personas, y en ocasiones llega a ser mortal [6]. Las principales manifestaciones clínicas son: fiebre entérica, gastroenteritis, vómito, bacteriemia y complicaciones extraintestinales [7].

1.3 *Salmonella spp.*

Salmonella es un género bacteriano que incluye algunas especies patógenas que pueden transmitirse por alimentos; son anaerobios facultativos, bacilos con un diámetro alrededor de 0.5 μm y una longitud de 2 a 3 μm . Son Gram negativas, y pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. El género *Salmonella* se divide en dos especies: *S. entérica*, y *S. bongori* [9], de los cuales se han identificado más de 2500 serotipos, en su mayoría pertenecientes a *S. entérica* [10].

La mayoría de los serotipos que conforman este género tienen la capacidad de adaptarse dentro de una variedad de hospedadores, incluidos los humanos [11]. La bacteria posee la capacidad de invadir, replicar y sobrevivir en sus hospedadores,

lo que puede resultar en una enfermedad potencialmente mortal. Las principales fuentes de alimento donde normalmente se aísla son: aves de corral, huevos, verduras y productos lácteos [12].

Salmonella spp. al ser una bacteria Gram negativo poseen en la membrana externa lipopolisacáridos, en los cuales posee diferentes carbohidratos [4,13]. Algunos de los carbohidratos que han sido encontrados en el LPS incluyen: L-glicero-D-manoheptosa, D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, ramnosa (6-desoxi-L-manosa), abecuosa (D-treo-D-glicero-3,6-didesoxihexosa.), N-acetil-D-glucosamina (Figura 2) [13].

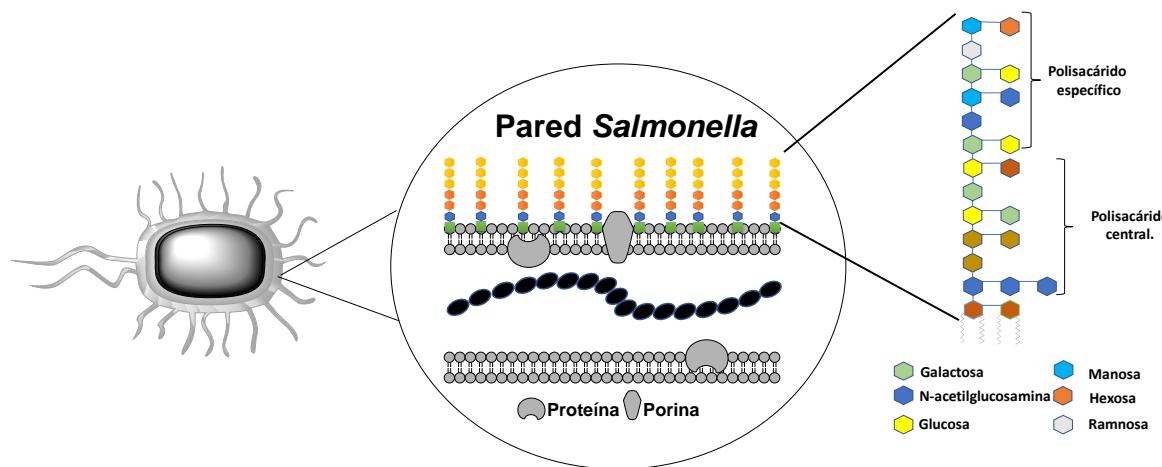


Figura 2. Representación del LPS de la bacteria *S. enterica* [4].

1.3.1 Métodos de identificación de *Salmonella spp.*

Actualmente existen diferentes métodos de aislamiento e identificación del género *Salmonella* a partir de productos alimenticios, los cuales se basan en marcadores fisiológicos y bioquímicos exclusivos de *Salmonella* [14]. Dentro de las principales técnicas utilizadas podemos encontrar:

1.3.1.1 Cultivos microbiológicos

Los cultivos microbiológicos es la técnica más utilizada para la detección de *Salmonella spp.* debido a su selectividad y sensibilidad. En México la NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos, es el procedimiento de elección para la detección de este microorganismo en alimentos. La técnica consta de los siguientes pasos:

- Pre-enriquecimiento en medio no selectivo: es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo, que permite restaurar las células bacterianas dañadas a una condición fisiológica estable.
- Enriquecimiento selectivo; Es el paso utilizado con el fin de incrementar la población de *Salmonella spp.* e inhibir el crecimiento de otros organismos presentes en la muestra. El pre-enriquecimiento y el enriquecimiento selectivo se llevan en medios líquidos.
- Crecimientos en medios sólidos (Agar): en este paso se utilizan medios selectivos que inhiben el crecimiento de bacterias diferentes a *Salmonella spp.*, además de que permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas mediante cambios en el medio. Los medios que más se utilizan son el Agar Xilosa lisina desoxicolato (XLD), verde brillante, sulfito de bismuto y *Salmonella-Shigella*.

Para la posterior identificación de *Salmonella spp.* los medios de cultivo se apoyan en pruebas bioquímicas: Éstas se basan en medios de cultivo sólidos, líquidos y semisólidos que contienen nutrientes característicos de la bacteria, los cuales con base en su bioquímica y los productos de su metabolismo se logra la identificación de *Salmonella spp.* Finalmente, la confirmación se realiza mediante pruebas serológicas, las cuales implican la aglutinación de *Salmonella* con antisueros específicos que reconocen algunas estructuras del microorganismo [9,15].

1.3.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa

El método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) representa un procedimiento rápido con alta sensibilidad y especificidad para detección de *Salmonella spp.* en una amplia variedad de alimentos. Es una técnica que se utiliza para amplificar una o algunas copias de un fragmento de uno o varios genes, para generar una gran cantidad de copias de un ácido nucleico en particular. La técnica permite la caracterización y comparaciones mucho más fáciles de material genético de diferentes organismos.

Se han desarrollado métodos de PCR a varios genes de *Salmonella*, tales como 16S rRNA, agfA y viaB, y plásmidos asociados a virulencia. Además, el gen invA es uno de los más utilizados para detectar *Salmonella spp.* [9]. Del mismo modo, se han desarrollado métodos de PCR en combinación con caldos de pre-enriquecimiento, separación inmunomagnética o centrifugación [9,16]. Adicionalmente, el método PCR en tiempo real (RT-PCR) se basa en un aumento de la fluorescencia de un colorante específico de dsDNA o una sonda de hibridación que se controla durante la amplificación de un gen objetivo [17].

1.3.1.3 Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) es altamente específico, sensibles, rápido, fácil de realizar, lo que permite adoptar fácilmente la tecnología para las pruebas microbiológicas de rutina.

Es una técnica bioquímica utilizada para detectar la presencia de un anticuerpo o un antígeno en una muestra. Para la detección de *Salmonella spp.*, una muestra con una cantidad desconocida de antígeno se inmoviliza sobre un soporte sólido de forma no específica o específicamente, posteriormente que el antígeno se inmoviliza, se agrega un anticuerpo de detección vinculado a una enzima donde forman un complejo con el antígeno. Finalmente, la placa se desarrolla agregando un sustrato enzimático para producir una señal visible debido a la escisión enzimática del sustrato; esto puede ser colorimétrico o fluorescente [15].

Existen diferentes esquemas de inmovilización para pruebas ELISA, la Figura 3 muestra un esquema representativo de las diferentes metodologías aplicadas.

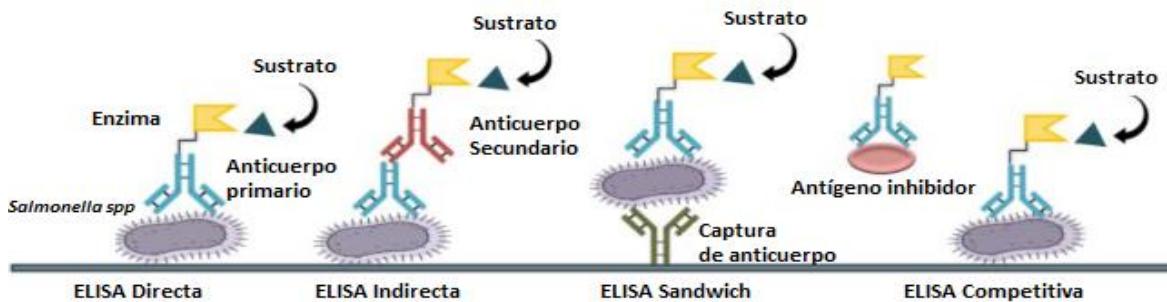


Figura.3 Representación de los formatos de pruebas ELISA [26].

A pesar de que los métodos antes mencionados permiten la detección e identificación de las células a bajas concentraciones, estos consumen mucho tiempo, son laboriosos [14].

1.4 Biosensores

Una alternativa a los métodos de análisis utilizados actualmente es el desarrollo y empleo de biosensores para detección bacteriana, los cuales pueden contribuir a reducir los diagnósticos erróneos, hacer más eficiente el proceso de detección, aumentar la sensibilidad, y a disminuir los tiempos y costos. Dentro de los biosensores, destacan los electroquímicos, debido a que proporcionan un método más rápido y simple para la detección de bacteriana [18].

1.4.1 Biosensores electroquímicos

Un biosensor electroquímico, es un dispositivo integrado con un transductor electroquímico autónomo, que puede proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa utilizando un elemento de reconocimiento biológico que se mantiene en contacto espacial directo con un elemento de transducción

electroquímica. Los biosensores electroquímicos son capaces de convertir un evento biológico en una señal eléctrica, lo que los hace deseables y atractivos para analizar el contenido/concentración de una muestra biológica o analito de interés. Estos se basan en la detección de una propiedad eléctrica (resistencia, corriente, potencial), que se detectan y miden utilizando diferentes métodos, como potociometría, conductimetría, amperometría e impedancia [19,20].

El objetivo principal del sistema de reconocimiento es proporcionar al sensor un alto grado de selectividad para medir el analito, y la interacción del analito está diseñada para producir un efecto medido por el transductor. Un biosensor debe proporcionar información rápida, precisa y confiable sobre el analito de interés. Es un dispositivo capaz de responder de manera continua, reversible y no perturba la muestra, además de ser altamente específicos, independientes de parámetros físicos, dos principios del funcionamiento fundamentales de un biosensor son el reconocimiento biológico y la detección [20].

Los biosensores electroquímicos microbianos traducen la interacción de los microorganismos con un objetivo específico [21]. Con la transducción electroquímica se logra a reducir el tiempo para obtener resultados confirmatorios. Los biosensores electroquímicos son una alternativa adecuada para el desarrollo de dispositivos rápidos para la detección de *Salmonella spp.* [22].

1.4.1.1 Biosensores amperométricos

Los biosensores amperométricos miden las corrientes asociadas con los electrones resultantes de la oxidación o reducción electroquímica de una especie electroactiva con el elemento de bioreconocimiento bajo un potencial constante aplicado al electrodo de trabajo. La fuerza impulsora para la reacción de transferencia de electrones de la especie electroactiva es el potencial aplicado que obliga a la especie a ganar o perder electrones. La corriente obtenida de la reacción del producto es una medida directa de la velocidad de la reacción de transferencia de electrones, que al mismo tiempo es relacionada cuantitativamente a la concentración del analito [20].

Liébanaa y colaboradores (2009) desarrollaron una metodología con transductor amperométrico. En el método las bacterias son capturadas de muestras de leche con perlas magnéticas a través de una reacción inmunológica. Posteriormente se agrega un segundo anticuerpo policlonal marcado con peroxidasa. Se usa como confirmación serológica con detección electroquímica basada en un magneto-electrodo de epoxi-grafito. La detección electroquímica se realiza a un potencial de 0.100 V. La Figura 4 muestra el esquema de trabajo propuesto, la muestra sin un tratamiento previo alcanza un límite de detección (LOD) de 5×10^3 y 7.5×10^3 CFU mL⁻¹ en caldo LB y en leche diluida 1/10 en caldo LB, respectivamente. Cuando la muestra se enriquece previamente, el método presenta un LOD de 1.4 CFU mL⁻¹ [23].

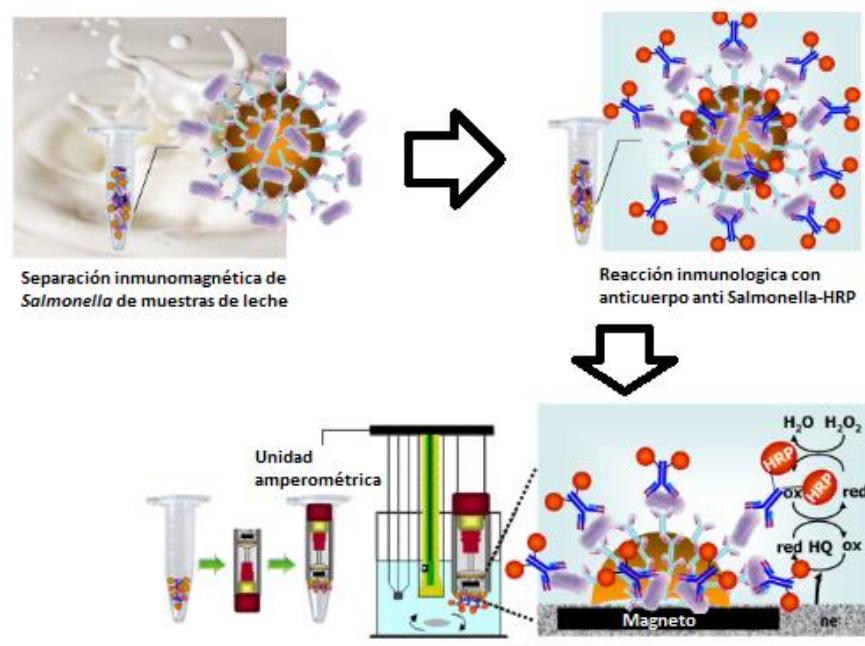


Figura 4. Representación esquemática del biosensor amperométrico [23].

1.4.1.2 Biosensores potenciométricos.

En los biosensores potenciométricos, la reacción de bioreconocimiento provoca una modulación de un potencial redox, membrana o la actividad de un ion. Generalmente se utilizan electrodos selectivos a iones para detectar la respuesta de bioreconocimiento; estos se componen de una capa externa selectiva y una membrana o superficie sensible a una especie deseada, generalmente una enzima. La reacción catalizada por enzimas genera una especie (H^+ , NH_4^+ , CN^-) de reacción que son detectados por los electrodos, que se detecta mediante un electrodo selectivo de iones. La base de este tipo de biosensor es la ecuación de Nernst, que relaciona el potencial del electrodo (E) con la concentración de las especies oxidadas y reducidas [19, 20].

Este tipo de biosensores presenta una ventaja sobre otros transductores electroquímicos debido a su miniaturización del método, aunque este tipo de transductores no son muy utilizados para estos análisis [22].

Silva y colaboradores (2015) desarrollaron un biosensor potenciométrico con una membrana selectiva de iones Cd (II) la cual acopló a un inmunoensayo tipo sándwich magnético para la determinación de *S. typhimurium* en muestras de leche. También se utilizaron electrodos selectivos de iones de cadmio y sodio como electrodos indicadores y pseudo-referencia. El esquema del método se muestra en la Figura 5. El LOD que obtuvieron fue de 20 UFC mL^{-1} , pre-concentrando la muestra con nanopartículas magnéticas. El método se basa en la medida del ion de interés que está contenido en anticuerpo policlonal marcado con iones Cd(II) [24].

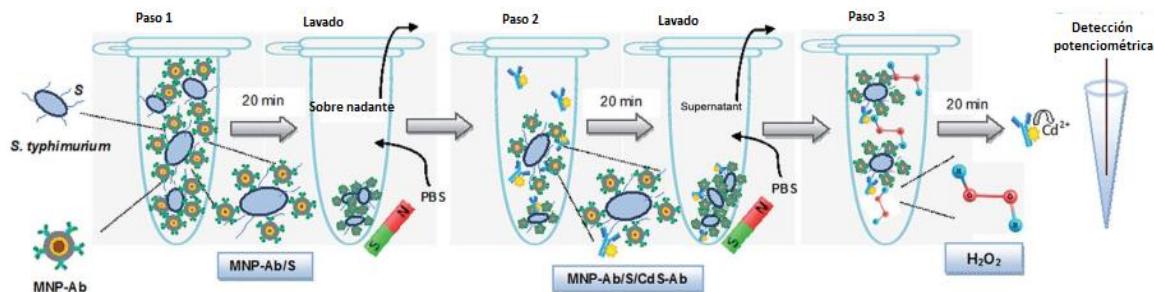


Figura 5. Esquema representativo del biosensor potenciométrico [24].

1.4.1.3 Biosensores voltamperométricos

La voltamperometría es una técnica de transducción en la que la corriente se mide en función del potencial aplicado, por lo cual es la técnica electroquímica más versátil. La posición de la parte superior del pico depende del analito, del reactivo o productos involucrados en alguna reacción. La intensidad de corriente de pico generada es proporcional a la concentración de analito. La voltamperometría es la técnica electroquímica menos propensa al ruido [25].

Los biosensores con una transducción voltamperométrica son los más utilizados en el análisis microbiano, Afonso y colaboradores (2013) desarrollaron un biosensor para *S. entérica* utilizando un magnetoimmunoensayo y nanopartículas de oro (AuNPs) como etiqueta para la detección electroquímica; el biosensor se basa en el uso de un electrodo de carbón serigrafiado que incorpora un imán permanente. Para obtener un mejor LOD la técnica de preconcentración con separación inmunomagnética de *Salmonella spp.* [25].

La captura de *Salmonella spp.* se realiza mediante microesferas magnéticas anti-*Salmonella* (MBs-pSAb) posteriormente se intercalan con anticuerpos modificados con AuNPs (sSAb-AuNPs) que son detectados mediante voltamperometría de pulso diferencial obteniendo un límite de detección de 143 UFC mL^{-1} . El esquema de la metodología se muestra en la Figura 6.

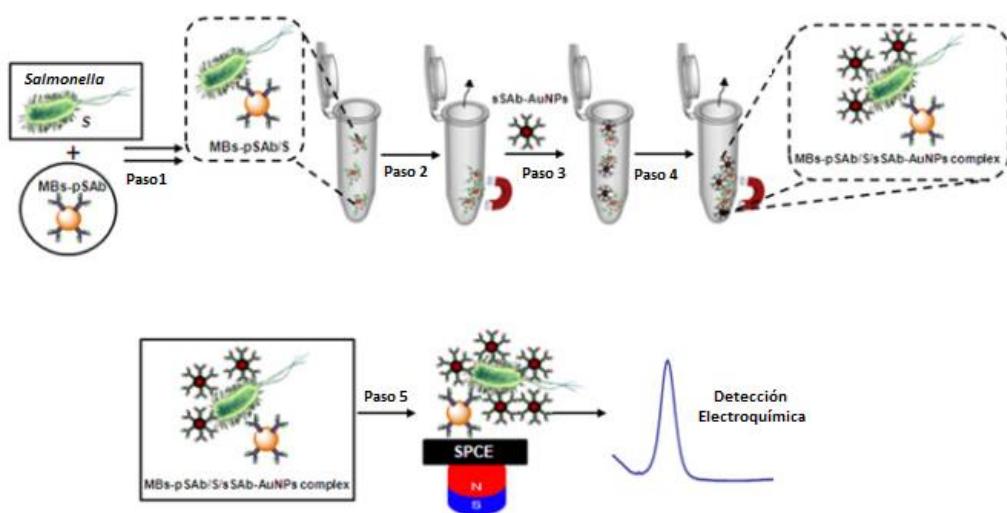


Figura 6. Representación esquemática de la metodología del biosensor voltamperométrico [25].

1.4.1.4 Biosensores conductimétricos

Los biosensores conductimétricos se basan en un biorreconocimiento que cambia la concentración iónica. La mayoría de las reacciones involucran un cambio en la concentración de especies iónicas, lo que conduce a un cambio en la conductividad eléctrica o el flujo de corriente [22]. Un biosensor conductimétrico consiste en dos electrodos metálicos separados por una cierta distancia y una tensión de corriente alterna aplicada a través del electrodo provocando un flujo de corriente. Las principales ventajas del dispositivo conductimétrico son que no necesita un electrodo de referencia, bajo costo, posibilidad de miniaturización y respuesta eléctrica directa. Una desventaja es que la medición de la transducción conductimétrica es menos sensible en comparación con los otros métodos electroquímicos [20,26,27].

Los biosensores conductimétricos son los menos utilizados en el análisis bacteriano debido a que presentan LOD elevados. Muhammad-Tahir y colaboradores desarrollaron un biosensor conductimétrico para detectar *Salmonella*. El biosensor consta de dos componentes: un inmunosensor basado en un inmunoensayo electroquímico tipo sándwich y un lector para la medición de la señal el cual se presenta en la Figura 7. El biosensor proporciona un mecanismo de detección específico, sensible, de bajo volumen para *Salmonella spp.*; el LOD es aproximadamente 79 UFC mL⁻¹.[28]

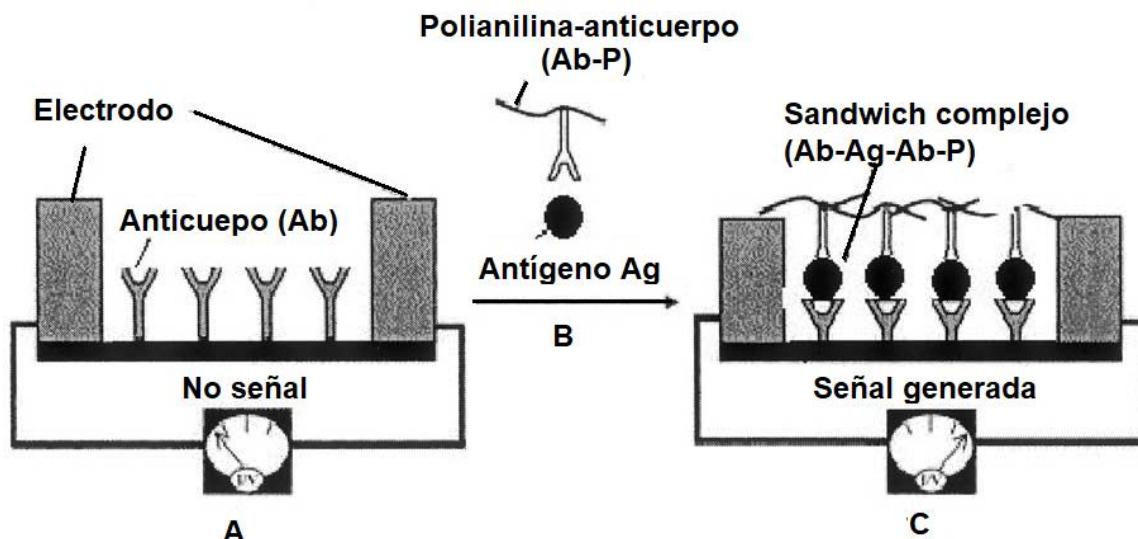


Figura 7. Representación del antígeno utilizado en el diseño del biosensor conductimétrico [28].

1.4.1.5 Biosensores impedimétricos

Los biosensores impedimétricos se basan en la inmovilización de un bioelemento (encargado del bioreconocimiento) que es afín al analito, al realizar el bioreconocimiento en el electrodo se producen cambios en la capacitancia y resistencia en la transferencia de electrones interfacial del electrodo, causando cambios en la impedancia. Los cambios interfaciales generados por los procesos de biorreconocimiento se pueden detectar mediante espectroscopía impedimétrica electroquímica [20].

Este método es una de las alternativas más utilizadas en el análisis electroquímico microbiano ya que permite la miniaturización, obtener una respuesta rápida [22]. Yang y colaboradores (2009) desarrollaron un biosensor con alta sensibilidad hacia *Salmonella spp.* basado en etilendiamina injertada en una monocapa de oro autoensamblada en un electrodo de carbono vítreo para la detección de *Salmonella spp.* Se utilizaron anticuerpos monoclonales inmovilizados en nanopartículas de oro; la interacción se detectó directamente usando la técnica de espectroscopía de

impedancia electroquímica. El método se aplicó a muestras de carne de cerdo obteniendo LOD de 100 UFC mL^{-1} , para la obtención del LOD bajo se realizó un enriquecimiento de la muestra en medios para *Salmonella spp.* [29]. En la Figura 8 se muestra el esquema del biosensor impedimétrico.

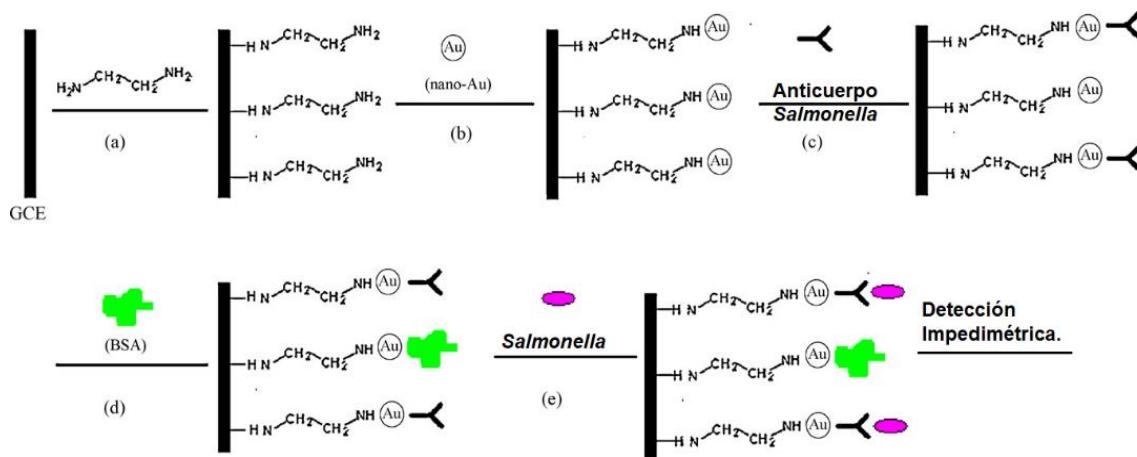


Figura 8. Representación esquemática de la inmovilización y análisis de *Salmonella spp.* [29].

1.5 Espectroscopía de impedancia electroquímica

La espectroscopía impedimétrica electroquímica es la técnica analítica que permite seguir los cambios interfaciales generados en los procesos de biorreconocimiento. Es considera una técnica rápida que sirve para la caracterización, además es ampliamente utilizada para explorar las interacciones de bioafinidad en la superficie de los sensores de los polímeros conductores y puede emplearse para investigar la detección de analitos sin etiquetas mediante transducción impedimétrica [30]. Los tres sistemas de electrodos que lo conforma son el electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un contraelectrodo.

La impedancia electroquímica se mide generalmente aplicando un potencial de onda sinusoidal de corriente alterna con una baja amplitud (5-10 mV) superpuesta a un potencial de corriente continua al sistema electroquímico. La señal de corriente

alterna explora el dominio de frecuencia, permitiendo la excitación individual de diferentes procesos con diferentes constantes de tiempo. El potencial y la corriente aplicados difieren en magnitud y fase; la impedancia resultante “Z”, es usualmente representada con un vector de dos componentes: uno real (Z_{Re}) y uno que es imaginario (Z_{Im}) [20]. Por lo general la impedancia medida del sistema se puede representar mediante un circuito eléctrico como se muestra en la Figura 9.

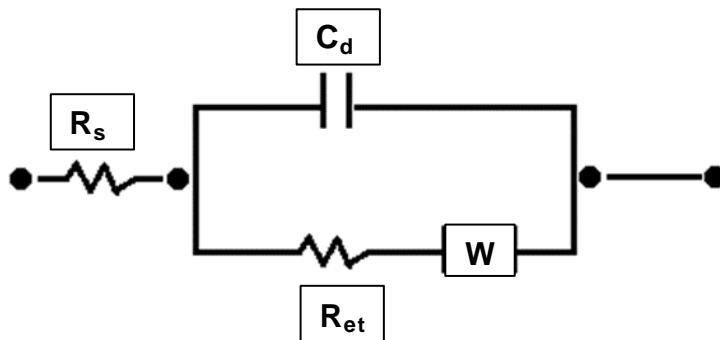


Figura 9. Representación de un circuito eléctrico.

Donde R_s representa la resistencia de la solución entre los electrodos, R_{et} la resistencia de transferencia de carga que explica la capacidad del compuesto redox para interactuar con la superficie del electrodo, C_d es la capacitancia entre el electrodo y los iones cargados en solución, Esta capacitancia se conoce como la capacitancia de doble capa, que existe entre cualquier metal colocado en una solución de electrolito. W es un elemento llamado impedancia de Warburg, que explica los efectos de las limitaciones de transferencia de masa [20].

Existen diferentes maneras de evaluar datos obtenidos de impedancia electroquímica de un electrodo, pero la más común es mediante la gráfica Z_{Im} vs Z_{Re} que genera los gráficos de Nyquist el cual se muestra en la Figura 10.

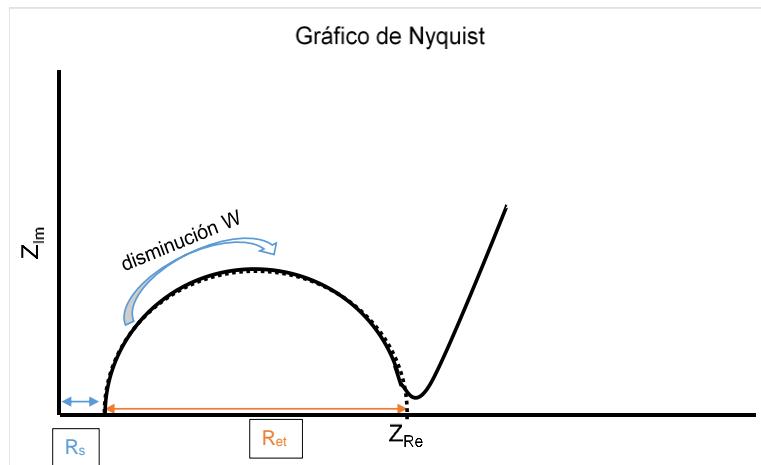


Figura 10. Representación de un gráfico de Nyquist.

Un gráfico de Nyquist contiene información sobre la interfaz electrificada. Este gráfico incluye una región de semicírculo situada sobre el eje seguida por una línea recta. La parte del semicírculo observada a frecuencias más altas corresponde al proceso por transferencia de electrones, mientras que la parte lineal es característica del intervalo de frecuencias más bajas y representa el proceso electroquímico de difusión. A través de la resistencia que va presentando un electrodo al inmovilizar un agente de reconocimiento y posteriormente poner en contacto con el analito se observa un cambio en la resistencia que es proporcional a la concentración del analito [20,30].

Considerando que la pared externa de las bacterias contiene carbohidratos, se han desarrollado biosensores basados en lectinas inmovilizadas, las cuales interaccionan de forma selectiva con carbohidratos ya sea en forma libre o unidos a macromoléculas

1.6 Lectinas

Las lectinas son proteínas de origen vegetal capaces de reconocer carbohidratos los cuales puede estar contenidos en macroestructuras como: glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos. Estas han sido empleadas en el diseño de diferentes

metodologías para el análisis de carbohidratos, ya sea en forma libre o unida a lípidos o proteínas. El estudio de lectinas comenzó con el descubrimiento de Stillmark en 1888, en donde a partir de extractos de ricino observó que lograba la aglutinación de eritrocitos animales [31].

Este tipo de proteínas han sido llamadas de diferentes maneras tales como: aglutininas, hemaglutininas, fitohemaglutininas y actualmente llamadas lectinas, este nombre fue acuñado por Boyd y Shapleigh del término lego que significa elegir o seleccionar. Esto por sus observaciones de algunos extractos que contenían lectinas las cuales poseían la capacidad de distinguir entre los grupos sanguíneos [32].

La definición de lectina más aceptada actualmente es la propuesta por Peumans y Van Damme en 1995, la cual menciona que las lectinas vegetales son proteínas de origen vegetal que poseen al menos un dominio no catalítico capaz de unirse específica y reversible a un monosacárido u oligosacárido, y cuya estructura puede o no formar una macromolécula [33].

La capacidad de distinguir entre los grupos sanguíneos estimuló un interés sobre este tipo de proteínas, por lo cual se buscaron métodos de aislamiento y caracterización de lectinas, y se han encontrado numerosas aplicaciones. Hasta la fecha se han caracterizado con respecto a la estructura de la proteína, la afinidad de unión a los carbohidratos, la termodinámica de unión y otras propiedades.

1.6.1 Clasificación de lectinas

Las lectinas se clasifican de diferentes maneras en función: a su funcionamiento, en relación con la especificidad, o a los sitios (dominio) de unión.

Tabla 1. Clasificación de lectinas

Clasificación	Función
Funcionamiento [34]	Aglutinan eritrocitos independientemente de su origen (animal o humano, y tipos de sangre). Aglutinan eritrocitos de uno o varios tipos de animales o humana. Específicas del grupo sanguíneo (A, B, O).
Especificidad [35].	D-Manosa/D-glucosa D-Galactosa/N-acetil-D-galactosamina N-acetil-D-glucosamina L-fucosa Ácido siálico / oligosacáridos.
Sitios de unión [33].	Merolectinas (un sitio de unión) Hololectinas (más sitio de unión) Quimerolectinas (uno o más sitios de unión además de actividad catalítica.)

En la Figura 11 se representan las estructuras de los carbohidratos de especificidad de reconocimiento, estos son los principales carbohidratos terminales contenidos en diferentes macromoléculas.

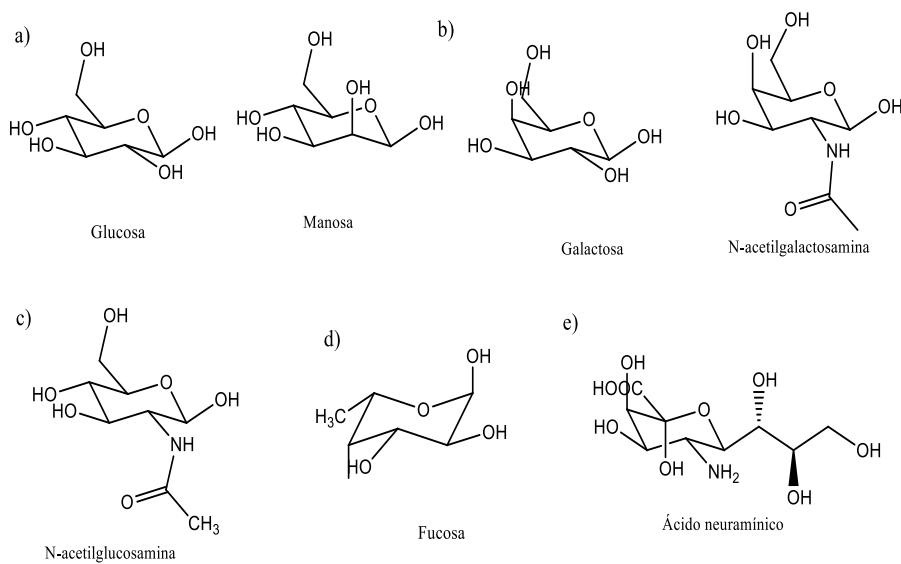


Figura 11. Estructura química de los principales carbohidratos terminales contenidos en macromoléculas.

Las merolectinas son proteínas que se componen de un único sitio de unión a carbohidratos. Son proteínas de polipéptidos individuales pequeñas que, debido a su naturaleza monovalente, son incapaces de precipitar los glicoconjungados o las células aglutinantes.

Las hololectinas Son proteínas que contienen dos o más sitios que son idénticos o homólogos entre sí. Este grupo comprende lectinas que tienen múltiples sitios de unión y, por lo tanto, son capaces de aglutinar células o precipitar glicoconjungados. La mayoría de las lectinas vegetales conocidas son hololectinas, ya que se comportan como hemaglutininas.

Las quimerolectinas son proteínas de fusión que poseen un sitio de unión a carbohidratos dispuesto en tandem con un dominio no relacionado, que tiene una actividad catalítica bien definida (u otra actividad biológica) que actúa independientemente del dominio de unión a carbohidratos. Dependiendo del número de sitios de unión al azúcar, las quimerolectinas se comportan como merolectinas u hololectinas [33].

Los tipos de lectinas en función del dominio de unión a carbohidratos se representan en la Figura 12.

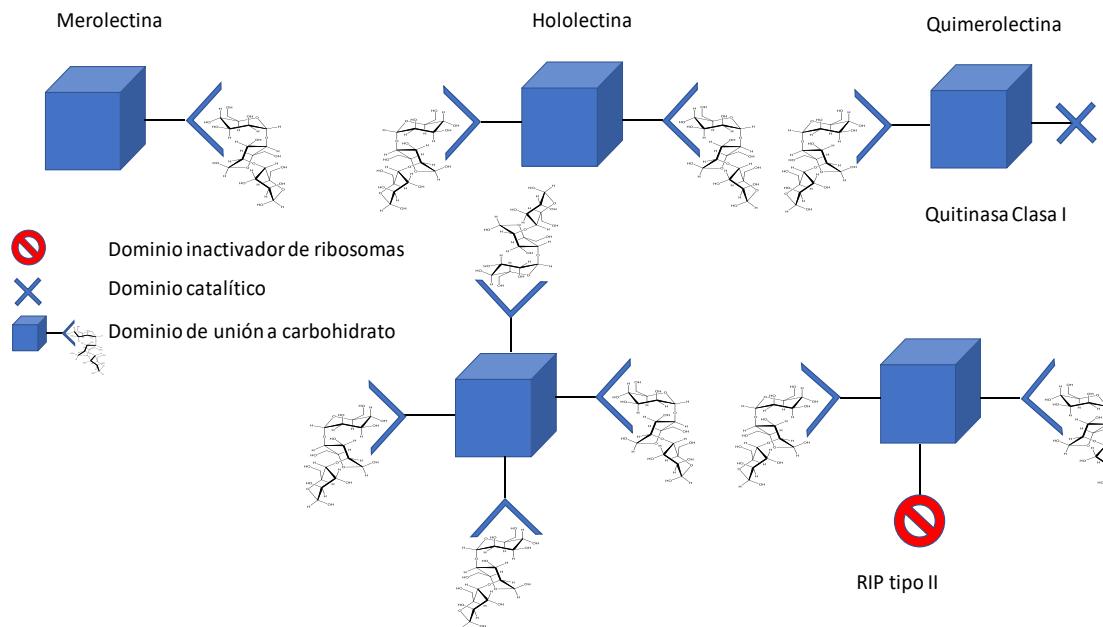


Figura 12. Representación esquemática de los 3 tipos de lectinas [33]

A medida que se obtuvo mayor conocimiento e información sobre las lectinas, se fueron desarrollando diferentes procedimientos, técnicas y métodos de detección más sofisticados, los cuales emplean glicoproteínas naturales, conjugados sintéticos de carbohidrato-proteína y polisacáridos para detectar lectinas y estudiar su especificidad [34]. El método que es utilizado para detección de lectinas es el desarrollado por Hořejší y Kocourek en 1974 [36].

1.6.2 Nomenclatura de lectinas

La nomenclatura de las lectinas de origen vegetal se designaba con un nombre trivial, otra forma de nombrar a las lectinas es mediante abreviaturas de tres letras derivadas de la planta o material vegetal donde se extrajo la planta. Con la finalidad de hacer una nomenclatura general sobre las lectinas se adoptó el código de tres letras, utilizando la primera letra del género y el nombre de la especie de la planta seguido de L (para lectina) o A (para aglutinina). Para diferenciar entre lectinas aisladas de la misma especie de planta, se agregaba un carácter romano después del código de tres letras denotando el orden cronológico de su descubrimiento.

Esta nomenclatura no es práctica debido a que los códigos de tres letras se refieren a dos o más lectinas de diferentes especies, por lo cual Van Damme y colaboradores propusieron introducir una nomenclatura con abreviaturas que comprende las primeras tres letras del género y del nombre de la especie seguidos de una “a” que se refiere a aglutina. [37]

1.6.3 Lectinas extraídas y reconocimiento.

Se ha realizado la detección de bacterias mediante un reconocimiento de lectina-carbohidrato. Las lectinas pueden reconocer los carbohidratos bacterianos contenidos en el LPS debido a las interacciones específicas entre los LPS bacterianos. Las lectinas podrían ofrecer una alta sensibilidad y selectividad.

Serra y colaboradores desarrollaron una metodología a partir de dos lectinas *Concanavalina A* y *Arachis hypogaea*, para la detección de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium phlei*.[38]

Wang y colaboradores (2013) evaluaron 5 lectinas para el desarrollo de un nuevo biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) que utiliza lectina como biorreceptor para la detección rápida de *E. coli* O157: H7. Determinaron que al utilizar la lectina de *Triticum vulgaris* como la molécula de unión, se obtienen una mayor selectividad eficaz de *E. coli* O157: H7[39].

Oliveira y colaboradores desarrollaron un biosensor electroquímico selectivo mediante la lectina de *Cratylia mollis* autoensamblada, este observó su interacción con el LPS de *E. coli*, *Serratia marcescens*, *S. enterica* y *Klebsiella pneumoniae*.

En la Tabla 2 se describen las diferentes lectinas utilizadas para el análisis de las diferentes bacterias, así como a que carbohidrato terminal reconocen.

Tabla 2. Lectinas empleadas en el análisis de bacterias.

Fuente de la lectina	Nombre de la lectina	Carbohidrato de reconocimiento	Bacteria afín	Ref
<i>Canavalia ensiformis</i>	Canensa	D-Manosa, D-Glucosa	<i>E. coli</i> , y <i>M. phlei</i> .	38
<i>Arachis hypogaea</i>	Arahypa	D-galactosa, N-acetil-D-galactosamina	<i>S. aureus</i>	37
<i>Triticum vulgaris</i>	Trivila	Ácido Siálico,	<i>E. coli</i> O157: H7	39
<i>Cratylia mollis</i>	Cramola	D-Glucosa	<i>S. marcescens</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> y <i>K. pneumoniae</i>	40

1.6.4 Interacción lectina-carbohidrato

Los lipopolisacáridos junto con las glicoproteínas presentan estructuras ramificadas; por lo tanto, presentan una gran diversidad de estructuras conformacionales además diferentes carbohidratos terminales. Las lectinas contienen de uno a más sitios de unión para los carbohidratos.

Las interacciones que se han encontrado entre las lectinas y los carbohidratos son a través de puentes de hidrógeno, coordinación metálica, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Los puentes de hidrógeno son comunes en estructuras que contienen carbohidratos debido a la presencia de grupos hidroxilo, amina y carboxilo. [35]

Las lectinas presentan una alta especificidad hacia los carbohidratos terminales de las glicoproteínas y lipopolisacáridos, razón por la cual se han desarrollado métodos en la aplicación como bioreceptores en biosensores en el análisis de carbohidrato, a través de estos biosensores basados en lectinas se han utilizado en el análisis de diagnóstico de cáncer, análisis bacteriano y viral [35]

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Extraer e incorporar una lectina de *Hechtia argentea* en un biosensor impedimétrico basado en electrodos serigrafiados de oro capaz de reconocer *Salmonella spp.* en muestras de alimentos.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Extraer una lectina de la especie *Hechtia argentea* para evaluar las propiedades aglutinantes mediante ensayos de hemoaglutinación e inhibición por carbohidratos.
- II. Identificar la selectividad hacia carbohidratos de la lectina extraída para posteriormente incorporarla como agente de reconocimiento en un biosensor impedimétrico utilizando electrodos serigrafiados de oro
- III. Validar el biosensor para su aplicación en el análisis microbiológico de muestras de huevo de gallina.

METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

3.1 Extracción y cuantificación

Las muestras de *Hechtia argentea* perteneciente a la familia Bromeliaceae fue proporcionada por el herbario del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada (sistema Milli-Q, Millipore) con una resistividad no menor a 18.2 MΩ cm.

El proceso de extracción de la lectina comienza con el secado de la hoja a temperatura ambiente para eliminar la mayor cantidad de agua contenida y evitar la desnaturalización de las proteínas. La hoja, ya seca, se pulveriza. Se pesa 1.0 g de la muestra molida y se coloca en 5.0 mL de una solución de NaCl (J.T. Baker) 150 mM, la mezcla se agita durante 60 min y se deja reposar durante 16 h a 4°C. Transcurrido el tiempo de reposo, la mezcla se filtra a través de una gasa y la fase líquida se centrifuga a 3000 rpm por 10 min, resguardándola en pequeñas porciones en oscuridad a -20 °C hasta su uso [41].

La concentración de proteínas totales en el extracto se determina mediante el método de Bradford. El reactivo se prepara mezclando 5.0 mg de azul de Coomassie G-250 (Sigma-Aldrich), 2.5 mL de etanol al 95% y 5 mL H₃PO₄, aforando a 50 mL con agua desionizada. La solución se filtra por gravedad empleando papel filtro y se almacena en un frasco ámbar hasta su uso. Para la determinación de proteínas, se añaden 50 µL del extracto en 1.0 mL de reactivo de Bradford y se coloca en una celda de cuarzo para la lectura de la absorbancia a 595 nm, empleando un espectrofotómetro (Hach DR 2700 Alemania). La concentración se determina mediante interpolación en la línea de calibrado empleando estándares de albúmina sérica (Sigma-Aldrich) en un intervalo de concentración de 2.44 a 9.1 mg L⁻¹.

3.2 Pruebas de aglutinación.

El extracto obtenido se evalúa en ensayos de hemoaglutinación con los diferentes tipos de sangre (A, B y O). Para el análisis se colocan 50 μ L de sangre con 50 μ L del extracto en una placa de toque. La placa de toque se coloca en incubación a 37 °C por 30 min. Posteriormente se toma 20 μ L de esta mezcla para observar la aglutinación en un microscopio con un aumento de 40x [42].

3.3 Pruebas de selectividad e inhibición de carbohidratos

Para evaluar la selectividad e inhibición de reconocimiento y afinidad a algún carbohidrato, se preparan soluciones con una concentración 0.5 M de los siguientes carbohidratos: D-galactosa, D-glucosa, ácido siálico, N-acetil-D-glucosamina, L-fucosa, D-fructosa, D-manosa y D-maltosa (todos de la marca Sigma-Aldrich). Se sigue el procedimiento descrito en la sección 3.2, pero ahora se agrega el carbohidrato a analizar y se observa a un aumento de 40X. Cuando no existe aglutinación en la muestra se relaciona con una inhibición debido a que se encuentra un carbohidrato en su forma libre por lo cual la lectina interactúa con los carbohidratos en forma libre, en lugar de interaccionar con los carbohidratos de las macromoléculas de la sangre, por lo cual da una pauta a una selectividad al carbohidrato que se esté analizando. Si se observa la aglutinación indica que la lectina no es selectiva al carbohidrato que se agrega. [42]

3.4 Determinación de proteínas mediante SDS-PAGE

Para comprobar el número de proteínas extraídas e identificar la lectina en el extracto, se realiza una electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) en el equipo Mini-PROTEAN® (Biorad Tetra Cell USA). Se preparan las siguientes soluciones: persulfato de amonio (Biorad) al 10 % (APS), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, como fijador del gel se prepara una mezcla de 40 mL de metanol (grado técnico), 10 mL de ácido acético glacial (grado técnico) en 50 mL de agua desionizada. El colorante se prepara disolviendo 0.25 g de azul de Coomassie G-250 en 45 mL de metanol, 5 mL de ácido acético glacial y 50 mL de agua desionizada. El colorante

se disuelve en metanol, la mezcla se filtra y se almacena. La solución decolorante es una mezcla de 20 mL de metanol, 10 mL de etanol (grado técnico), 5 mL de ácido acético en 65 mL de agua desionizada.

El gel de resolución fue 11% de acrilamida-bisacrilamida y un gel de concentración de 4 % de acrilamida-bisacrilamida (los geles se preparan mezclando en un vaso de precipitados los componentes indicados en la Tabla 3). Primero se debe polimerizar el gel de resolución, esta se vierte sobre las placas utilizadas para la polimerización del gel dejando un espacio de alrededor 3 cm para agregar el gel de concentración. Posteriormente, añadir una pequeña cantidad de agua destilada cubriendo el espacio libre. Cuando el gel de resolución ha polimerizado, se retira el agua destilada, se añade el gel de concentración y se coloca el peine, para la formación de los pocillos donde se coloca la muestra.

La solución de APS 10 % y TEMED se agregan a la mezcla de la soluciones antes de verter la mezcla sobre las placas, ya que estas soluciones son las que fungen como agentes polimerizantes.

Tabla 3. Soluciones para la preparación del gel de poliacrilamida.

	Gel de resolución 11%	Gel de concentración 4%
Agua bidestilada	3.7 mL	6.1 mL
Solución acrilamida-bisacrilamida (Biorad)	3.7 mL	1.3 mL
Gel buffer (Biorad)	2.5 mL	2.5 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL
APS 10%	50 µL	50 µL
N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED) (Biorad)	5 µL	10 µL

La preparación de la muestra consiste en mezclar 100 μ L de una solución preparada con 50 μ L de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) en 950 μ L Sample buffer (Biorad) y colocarlos en un tubo Eppendorf con 25 μ L del extracto de proteínas obtenido de *Hechtia argentea*, la mezcla se calienta por 4 min a 100 °C. Posteriormente se coloca la placa del gel dentro de la cámara de electroforesis, posteriormente se llena con 70 mL buffer 10x Tris/glicina/SDS (Biorad) y 630 mL de agua. Se retira el peine del gel y se coloca en 30 μ L de muestra preparada una muestra de estándares de peso molecular conocido. La cámara se conecta a la fuente de poder a 180 V por 50 min.

Transcurrido el tiempo, se retira el gel de las placas, se lava el gel con dos porciones de agua desionizada durante 10 min agitando suavemente, se desecha el agua de lavado, se agrega la solución fijadora agitando suavemente por 30 min, se desecha la solución y se agrega la solución colorante por 60 min agitando suavemente. Se lava con dos porciones de agua desionizada de 10 min agitando suavemente, y finalmente se agrega la solución decolorante por 24 h.

3.5 Construcción del biosensor

El biosensor diseñado se construye sobre la superficie de electrodos serigrafiados de oro de curado a baja temperatura (DropSens 220BT). El electrodo de trabajo (12.5 mm²) es de oro, mientras que el electrodo auxiliar y de pseudo-referencia es de plata.

Se prepara una solución buffer de fosfatos (PBS) la cual contiene NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 2 mM, a la cual se le agrega CaCl₂, ZnCl₂ y MgCl₂ en concentración 0.5 mM cada una, el pH se ajusta a 7.4 finalmente la solución es aforada con agua desionizada.

La preparación comienza agregando a la superficie de oro 10 μ L de una solución de ácido mercaptohexadecanoico (MHDA) 25 mM disuelto en etanol, se deja en reposo durante 24 h a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se lava la superficie con etanol para retirar el exceso de MHDA. Posteriormente se activa la

superficie para la inmovilización de la lectina agregando 10 μ L de solución N-(3-dimetilaminopropil)-N-ethylcarbodiimida (EDC)/N-hidroxisulfosuccinimida (SNHS) 20 mM y 5 mM respectivamente, diluidos en conjunto en PBS. La solución se deja en contacto por 60 min a temperatura ambiente, finalizado el tiempo se lava con PBS y se aplican 40 μ L del extracto que contiene la lectina durante 60 min. Posteriormente se sumerge el electrodo modificado en una solución etanolamina 20 mM cubriendo totalmente la superficie del electrodo durante 30 min para bloquear las posiciones aún vacantes. Concluida la preparación del biosensor, se conservan sumergidos en PBS a una temperatura de 4°C hasta su uso [43]

3.6 Evaluación espectroscopia electroquímica de impedancia para carbohidratos

Una vez construido el biosensor, se complementó la selectividad de la lectina para comprobar la interacción entre la lectina-carbohidrato. De cada uno de los carbohidratos mencionados para el análisis de inhibición de aglutinación, se preparan soluciones en concentraciones de 1×10^{-7} a 1×10^{-4} M. Primero, se realiza la lectura de espectroscopia de impedancia electroquímica a la superficie del electrodo agregando 40 μ L de una solución redox de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5mM. Posteriormente se lava con PBS, se coloca la solución del carbohidrato a analizar, se deja reposar por 10 min, se lava nuevamente la superficie con PBS y se realiza la lectura de espectroscopia de impedancia electroquímica agregando 40 μ L de una solución redox de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5mM,

Las determinaciones electroquímicas se realizan en un potenciómetro galvanostato Metrohm Autolab (modelo PGSTAT302N, Amsterdam, Holanda) controlado a través del software NOVA 2.0. Se utiliza una solución redox que contiene 5 mM de ferrocianuro de potasio $K_4[Fe(CN)_6]$ y 5 mM de ferricianuro de potasio $K_3[Fe(CN)_6]$, que se prepara en PBS.

Se fijaron las condiciones de trabajo de potenciómetro un potencial de corriente directa de 350 mV y un potencial de corriente alterna de 5 mV de amplitud. El análisis por espectroscopía de impedancia electroquímica es determinado en 25 frecuencias de 0.01Hz a 100 kHz.

3.7 Análisis microbiológico

Las bacterias analizadas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Dos bacterias se analizan, una Gram positiva (*Listeria monocytogenes*) y otra Gram negativa (*Salmonella spp.*). Ambas cepas, se inoculan en caldo soya tripticaseína (BD Bioxon) y se incuban a 37 °C por 24 h. De cada uno de los cultivos obtenidos se realizan diluciones decimales en solución salina 0.85 % hasta obtener una concentración de 10^5 UFC mL⁻¹, lo cual se determina mediante un conteo en placa en agar soya tripticaseína (BD Bioxon). Finalmente, las suspensiones bacterianas se analizan mediante espectroscopía de impedancia electroquímica.

3.8 Análisis de muestras por métodos microbiológicos tradicionales

Las muestras a analizadas fueron huevos de gallina (10 en total) obtenidas en varios establecimientos comerciales de la Cd. de Pachuca. Estos se mantienen en bolsas de polietileno y se conservan a temperatura ambiente desde su compra hasta el análisis (aproximadamente 24 h).

Para el análisis se utilizan los siguientes medios de cultivo: caldo soya tripticaseína (CST), agar soya tripticaseína (AST), caldo lactosado, caldo tetratrationato (CT), caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), agar *Salmonella-Shigela* (BBL) (SS), agar Verde Brillante (BD Bioxon) (VB) y agar Xilosa Lisina Desoxicolato (BD Bioxon) (XLD), además de solución salina 0.85%. Todo el material utilizado, así como los medios de cultivo se esteriliza a 121 °C por 15 min en autoclave (Felisa, FE-399, Mexico).

El análisis de las muestras se realiza basándose en la NOM-210-SSA1-2014. Cada pieza de huevo por separado se coloca en bolsas de polietileno y se añade 225 mL de caldo lactosado para su pre-enriquecimiento. La mezcla se agita suavemente frotando el cascarón cuidando de no romperlo. Se deja reposar por 60 min a temperatura ambiente, se retira el huevo y las bolsas con el caldo se incuban durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, de cada muestra, se toman dos alícuotas de 1.0 mL de y se transfirieren, por separado a tubos con caldo RV y CT, y son incubadas durante 24 h a 37 °C. A partir de los cultivos desarrollados en RV y CT, se inoculan medios sólidos selectivos para *Salmonella* (XLD, VB y SS), se procede a sembrar mediante siembra por estría y se incuban por 24 h a 37°C.

Además de las muestras, se utiliza un huevo inoculado con *Salmonella spp.*, y un huevo desinfectado en una solución de etanol (70% v/v). Estos se utilizan como control positivo y negativo respectivamente. A estos controles, se les realiza el mismo procedimiento de análisis que se aplica a las muestras. En la Figura 13a se representan los pasos de la metodología descrita para el análisis microbiológico.

3.9 Análisis de muestras por espectroscopía de impedancia electroquímica

Para hacer el análisis impedimétrico se realiza una curva de calibración utilizando como estándar *Salmonella spp.* El crecimiento de la bacteria se realiza en los mismos medios utilizados para las muestras. Se obtienen estándares en concentraciones 10^3 a 10^8 UFC mL $^{-1}$, estos son obtenidos mediante diluciones decimales en serie y la concentración es determinada por conteo en placa.

El análisis se realiza con un pre-enriquecimiento y posteriormente un enriquecimiento selectivo, el procedimiento es el mismo descrito en la sección anterior (3.9). La muestra que se analiza en el biosensor es la procedente de caldo RV. En la Figura 13b se representan los pasos seguidos en el análisis impedimétrico así como los pasos para la realización de la línea de calibrado.

Se fijaron las condiciones de trabajo descritas en la sección 3.6. El primer paso es realizar la lectura de espectroscopía de impedancia electroquímica a la superficie del electrodo agregando 40 μ L de una solución redox de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5mM. Terminado esto se lava la superficie con el tampón de fosfatos y se colocan 40 μ L del caldo RV que contiene el cultivo de la muestra dejando incubar a temperatura ambiente por 15 min, después se lava la superficie con el PBS y se agregan 40 μ L de la solución redox de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$, finalmente se realiza la lectura de espectroscopía de impedancia electroquímica.

Metodología

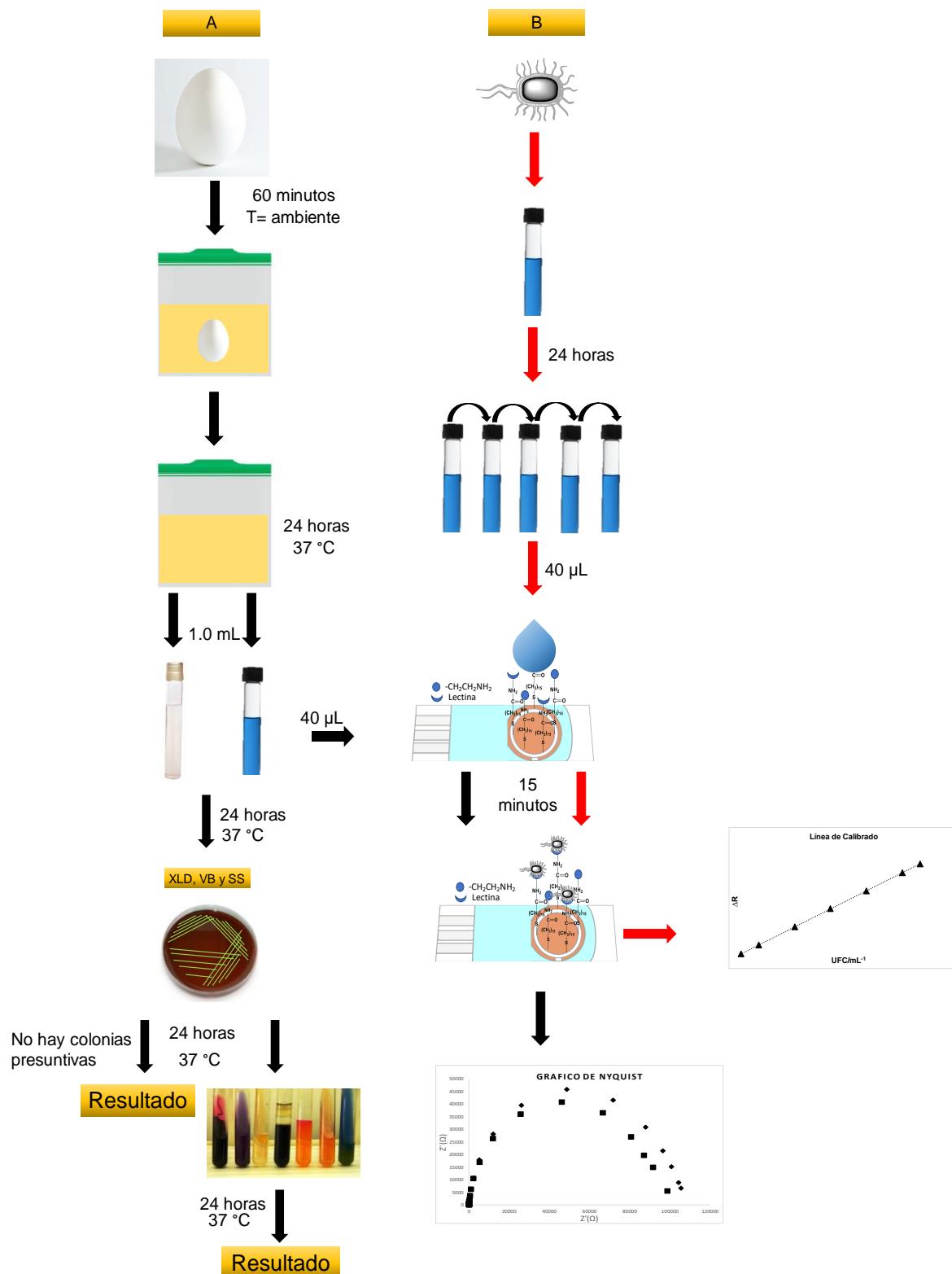


Figura 13. Representación esquemática a) análisis microbiológico b) análisis por espectroscopía impedimétrica

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La lectina obtenida de *Hechtia argentea* (Ha), será nombrada de acuerdo con la nomenclatura propuesta por Van Damme,[37] la cual nos dice que se toma las tres primeras letras de *Hechtia*, las tres primeras letras de *argentea* y la “a” de aglutina por lo cual el nombre es “**Hecarga**”.



Figura 14. *Hechtia argentea* [44]

4.1 Prueba de aglutinación e inhibición de carbohidratos

Las pruebas de aglutinación nos indican la presencia o la ausencia de al menos una lectina de la planta a evaluar, debido a que la aglutinación es una propiedad de las lectinas [34, 37]. En la Figura 15 se observan las muestras de diferentes tipos de sangre (A, B y O) aglutinadas cuando se enfrentaron al extracto de Ha, las cuales se contrastaron con una muestra control que contiene el tipo de sangre a evaluar y NaCl 150 mM.

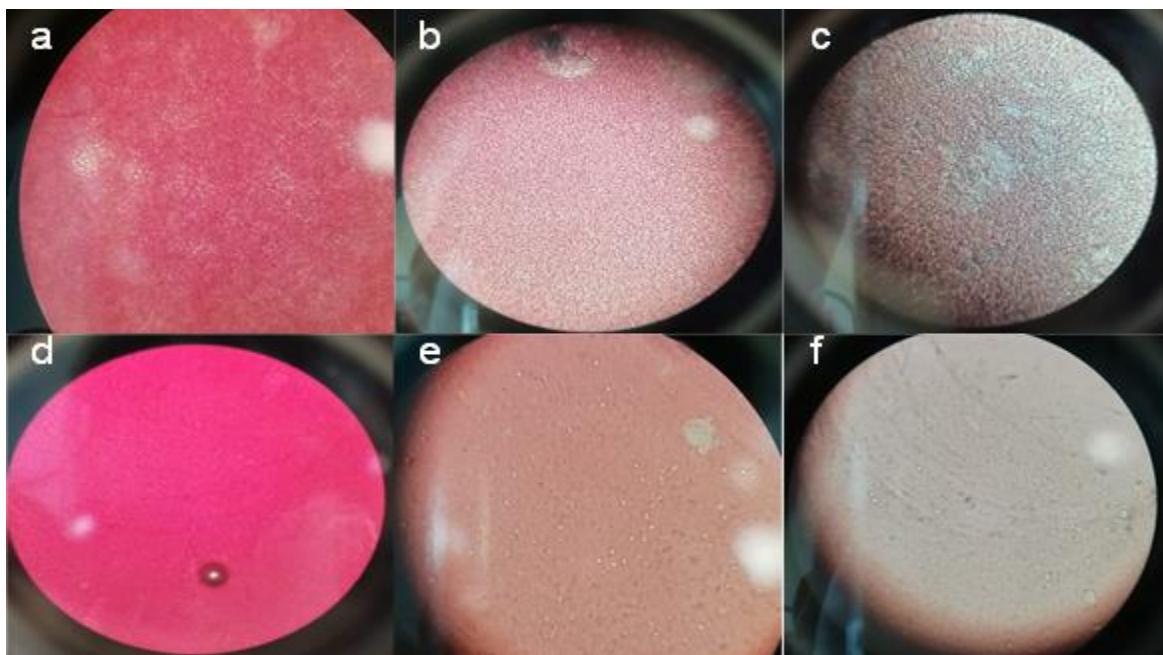


Figura 15. Imágenes observadas al microscopio (40 x) de la aglutinación causada por el extracto Ha. a) sangre tipo A con extracto b) sangre tipo B con extracto c) sangre tipo O con extracto d) sangre tipo A sin extracto b) sangre tipo B sin extracto c) sangre tipo O sin extracto.

Todas las muestras de sangre humana presentaron aglutinación, lo cual nos permite decir que el extracto obtenido de Ha contiene al menos una lectina, la cual interacciona con macromoléculas presentes en los componentes de la sangre.

La siguiente etapa consistió en realizar pruebas de inhibición mezclando un carbohidrato, muestra de sangre y el extracto de Ha. En caso de existir una afinidad hacia el carbohidrato añadido, se observa una inhibición de la aglutinación. Este proceso se correlaciona con afinidad de la lectina extraída hacia algún carbohidrato permitiendo así el reconocimiento del mismo cuando está contenido alguna macromolécula de interés. El principio de la prueba realizada se basa en que los carbohidratos ocupan los sitios activos que posee la lectina, impidiendo que las macromoléculas contenidas en los componentes de la sangre interaccionen [32].

Las pruebas de inhibición fueron desarrolladas solamente en sangre tipo O, las cuales se observaron al microscopio (40X). La Tabla 4 presenta los resultados

obtenidos, donde se observa la inhibición de la aglutinación con ácido siálico, N-acetil-D-glucosamina, y D-manosa, lo que indica una afinidad de la lectina (o lectinas) en el extracto hacia estos carbohidratos.

Tabla 4. Pruebas de inhibición y selectividad de carbohidratos. Concentración de cada carbohidrato= 0.5 M

Carbohidrato	Aglutinación
D-Galactosa	Si
D-Glucosa	Si
Ácido Siálico	No
N-acetil-D-glucosamina	No
L-Fucosa	Si
D-Fructosa	Si
D-Manosa	No
D-Maltosa	Si

4.2 Cuantificación de proteínas totales

Una vez verificada la presencia de lectina en el extracto, se determina el contenido de proteínas totales en el mismo, mediante interpolación en la línea de calibrado a partir del método de Bradford. El método fue elegido debido a que es una técnica simple, rápida y sensible en comparación con otros métodos, además de estar sujeta a un menor número de interferentes que pudieran estar contenidos en los reactivos y componentes no proteicos de las muestras biológicas [45].

El método de Bradford se basa en la unión del colorante azul de Coomassie a la proteína. El colorante libre puede existir en cuatro formas iónicas diferentes. La forma aniónica de interés es de color azul. Esta forma es la que se une a la proteína y tiene un máximo de absorbancia a 595 nm.

La línea de calibrado se construye empleando seroalbúmina bovina como estándar en el intervalo de concentración 2.44-9.1 mg L⁻¹. El extracto obtenido de Ha se diluyó y se analizó mediante interpolación, encontrando una concentración en la muestra

Discusión de resultados

de 131.7 mg L⁻¹. En la Figura 16 se representa la línea de calibrado con un valor de R=0.9964 además de un intervalo lineal de 2.2-9.1 mg L⁻¹.

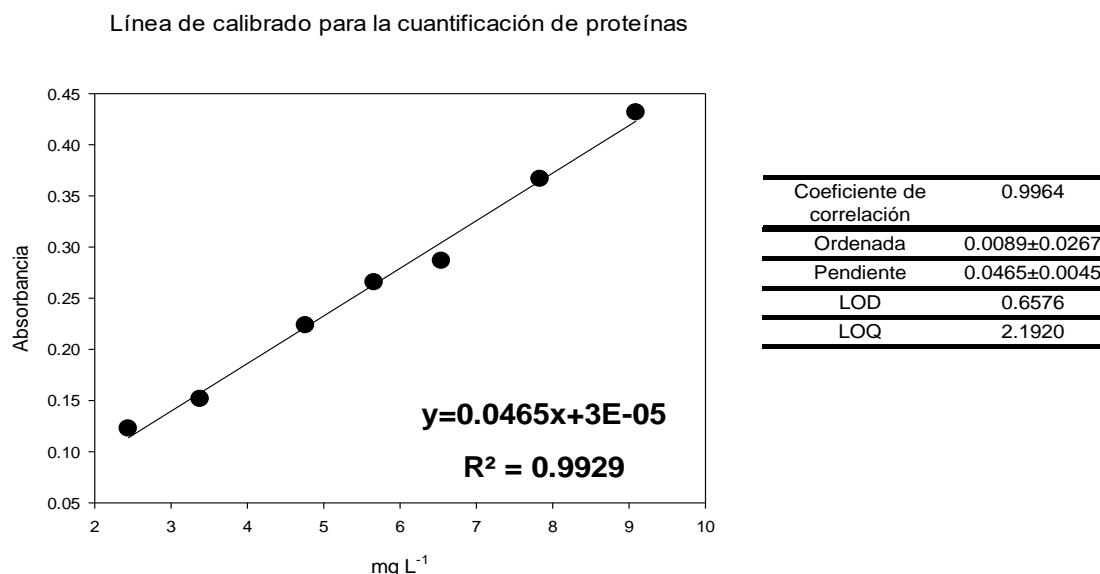


Figura 16. Línea de calibrado para la determinación de las proteínas totales en el extracto Ha.

4.3 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en gel nos permite identificar el número de proteínas contenidas en el extracto Ha, así como conocer el peso molecular de la proteína al ser comparado con un estándar de proteínas de pesos conocidos. Las proteínas se analizan en el gel de poliacrilamida formado por dos fases. La fase superior donde las moléculas se concentran y la inferior donde las moléculas se separan según su peso molecular. Las proteínas al estar tratadas con SDS, se rodean de cargas negativas, lo que permite que las proteínas migren hacia la termina positiva. En la Figura 17 se representa la migración de las proteínas.

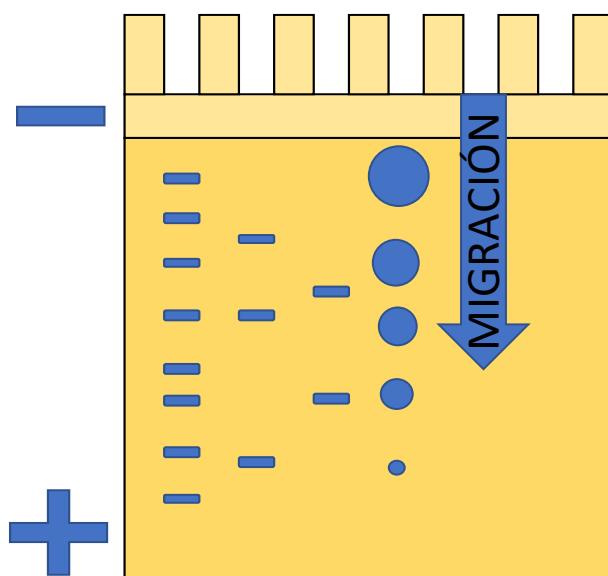
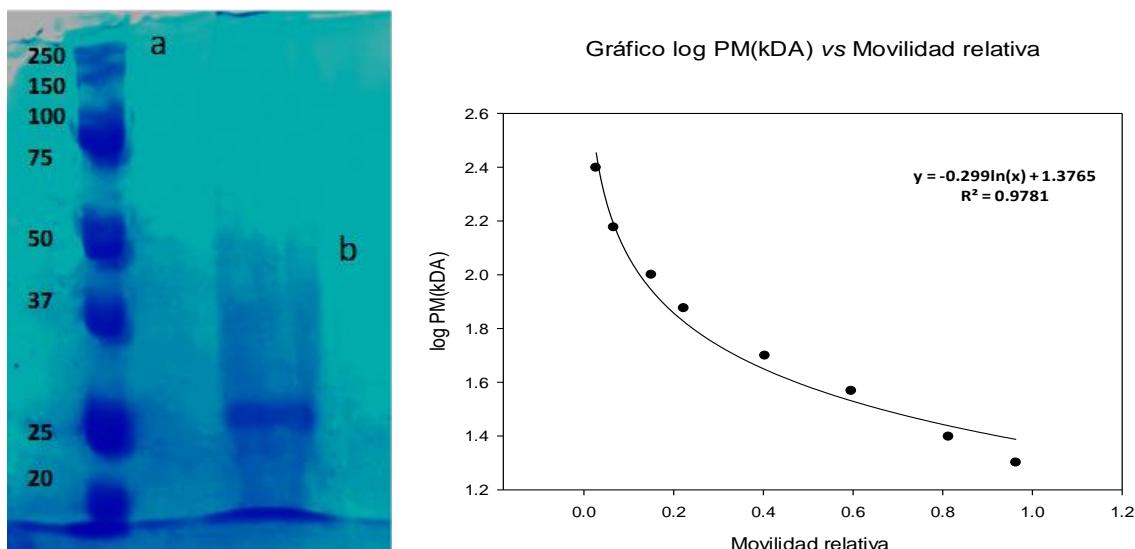


Figura 17. Representación de la movilidad de las proteínas en una electroforesis en un gel de poliacrilamida.

Con lo descrito anteriormente la migración de las proteínas contenidas en el extracto se separa mediante sus pesos moleculares, siendo mayor la movilidad cuando menor es el peso molecular. El gel de electroforesis obtenido para el análisis del extracto de Ha muestra el patrón de movilidad del extracto y de marcador de pesos moleculares (para la determinación del peso molecular) (Figura 18A).

Respecto al análisis del extracto de Ha, es importante resaltar que se observa únicamente una banda (Fig. 18A.b) que se asocia a la presencia de una lectina. Éste hecho permite utilizar el extracto obtenido sin necesidad de purificarlo. Con la finalidad de conocer el peso molecular (Fig. 18A.a), se realizó el gráfico log PM (kDa) vs. movilidad relativa del marcador de pesos moleculares (Fig.18B). A partir de los datos obtenidos se encontró un peso molecular de la proteína extraída de 27.4 kDa.



A
B
Figura 18. Gel SDS-PAGE de: A. a) estándar de proteínas de pesos moleculares conocidos y b) del extracto de *Ha*. B) Gráfico log PM (kDa) vs Movilidad relativa

El contenido de proteínas está asociado a la lectina, con ambos datos es posible determinar la cantidad que se adicionará durante el proceso de formación del biosensor impedimétrico.

4.4 Construcción del biosensor

La inmovilización del agente de reconocimiento sobre una superficie requiere ciertas características del método. Las metodologías de inmovilización principales son: formación de iminas con glutaraldehído y la formación de amidas con la adicción de EDC/SNHS [43,46]. La selección de la metodología más adecuada requiere que el elemento de reconocimiento deba orientarse con un mínimo impedimento estérico para que pueda interactuar de manera efectiva con el analito. Además, se debe cuidar que el agente de reconocimiento no pierda su capacidad de interacción con el analito.

La formación de amidas con EDC/SNHS presenta una alta eficiencia de conversión, condiciones de reacción suaves, excelente biocompatibilidad con poca influencia en

la bioactividad de las moléculas objetivo y productos mucho más limpios que otros reactivos de reticulación como el glutaraldehído. Debido a estas ventajas, en la inmovilización de proteínas por lo cual se selecciona este método de inmovilización [47].

El método de formación de monocapas autoensabladas (SAMs por sus siglas en inglés- Self-assembled monolayers) es uno de los más utilizados para la inmovilización de anticuerpos en inmunoensayos. Con superficies metálicas como oro y plata se pueden formar capas mediante quimisorción espontánea de alcano tióles. A pesar de que el modelo descrito para la formación de un enlace entre el oro y el azufre del alcano tiol es aún controversial sugiere una adición oxidativa del enlace S-H a la superficie de oro mediante la siguiente ecuación.



Para la formación la monocapa (Fig. 19) se agrega MHDA 25 mM a la superficie del electrodo serigrafiado de oro para la formación de un enlace oro-azufre.

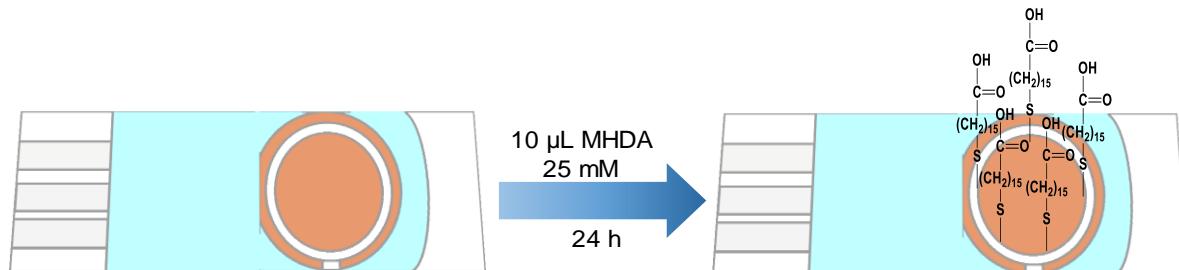


Figura 19. Inicio de la formación de la monocapa mediante la adición con MHDA.

Posteriormente, el grupo ácido carboxílico que se encuentra en el extremo de la cadena alquílica servirá para anclar el agente de reconocimiento mediante la formación de una amida. La reacción propuesta se realiza en etapas, en primera el EDC reacciona con el grupo carbonilo de ácido carboxílico formando un intermediario de O-acilurea. Posteriormente, el intermediario reacciona con SNHS para formar un éster de N-hidroxisuccinimida (Fig.20) el cual es un buen grupo saliente que puede reaccionar fácilmente con nucleófilos como aminas [47].

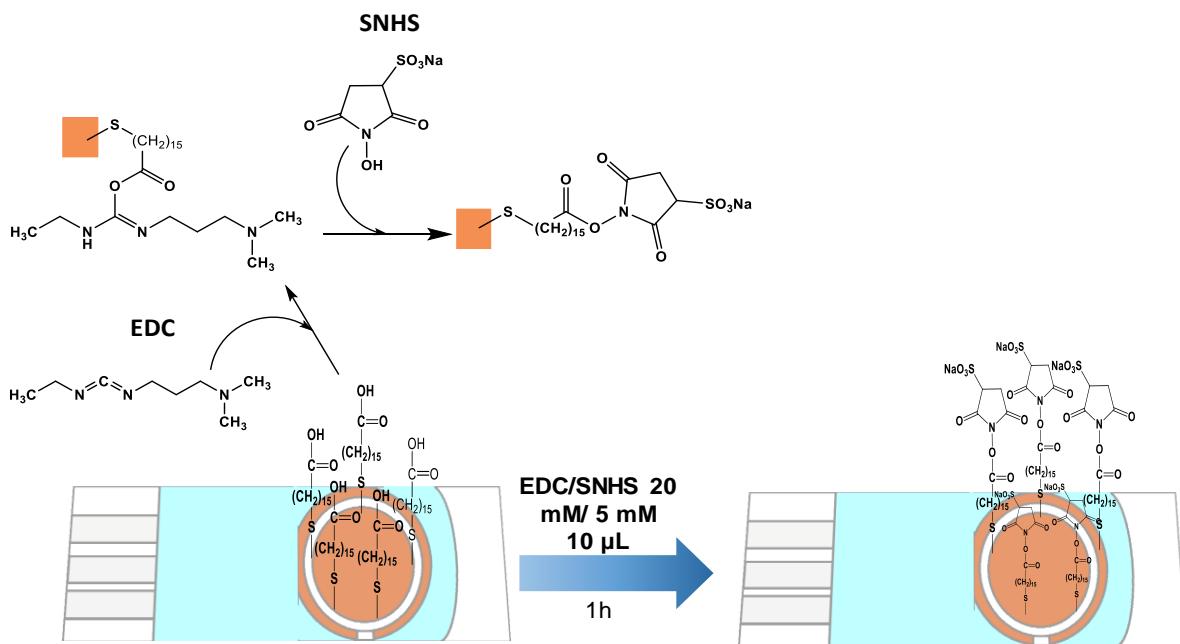


Figura 20. Activación de la monocapa mediante la formación de un éster de N-hidroxisuccinimida.

Cuando la superficie queda activada se agrega la lectina (5.3 ng, Fig. 21) para que el SNHS éster reaccione con las aminas presentes de la lectina del extracto Ha, dando lugar a la formación de una amida. De esta forma se logra la inmovilización covalente del agente de reconocimiento sobre la superficie del electrodo.

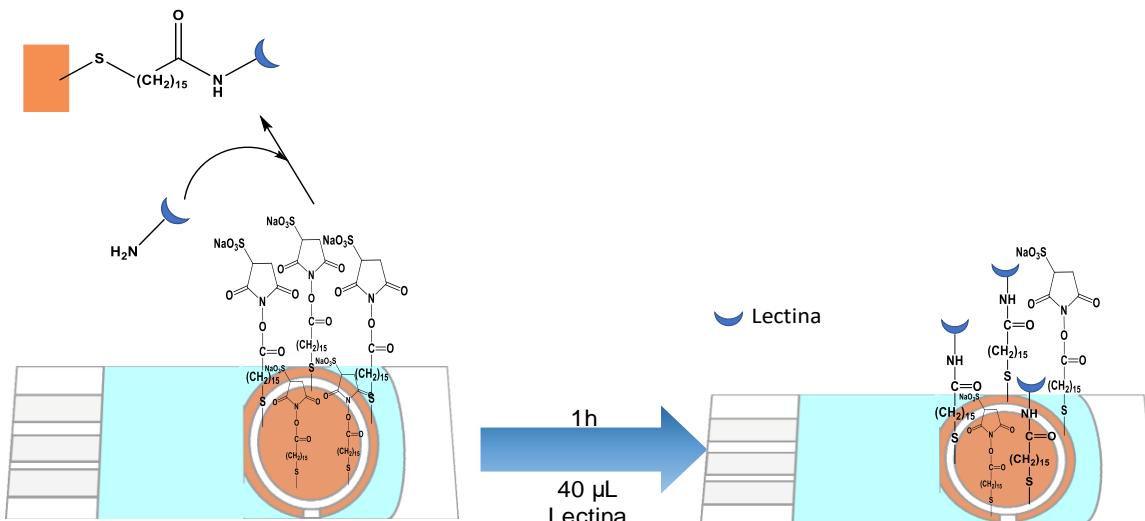


Figura 21. Inmovilización de la lectina sobre la monocapa mediante la formación de una amida

Para finalizar la construcción del biosensor, posterior a la inmovilización de la lectina se debe llevar un bloqueo de esteres de SNHS remanentes para evitar interacciones no específicas en el análisis de muestras. Por lo cual el electrodo se sumerge en una solución de etanolamina, que reacciona formando un enlace amida (Fig. 22).

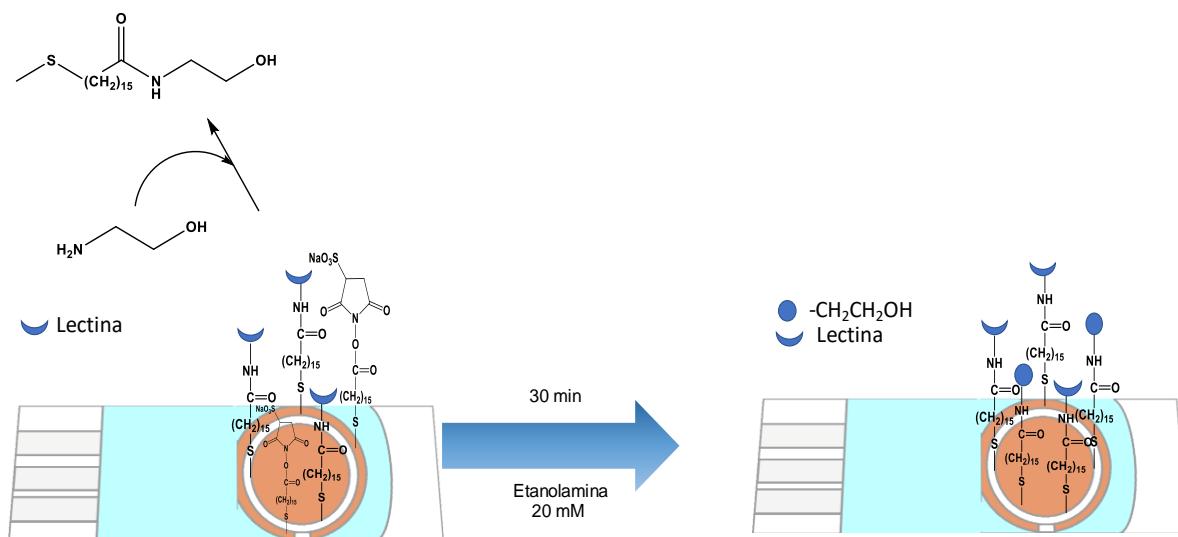


Figura 22. Bloqueo de esteres de SNHS remanentes mediante formación de amidas con etanolamina.

4.5 Evaluación del biosensor en el análisis de carbohidratos

Una vez construido el biosensor se evaluó la interacción entre la lectina y los carbohidratos. Se prepararon soluciones de carbohidratos (1×10^{-7} - 1×10^{-4} M) de D-manosa, ácido siálico y N-acetil-D-glucosamina. Los gráficos de Nyquist (Fig. 23) obtenidos confirman la existencia de una interacción lectina-carbohidrato cuando se observa un incremento en la resistencia del dispositivo. La Figura 23d muestra esta tendencia hacia los tres carbohidratos analizados. Los resultados son congruentes con los ensayos de inhibición de aglutinación previamente realizados.

De manera parcial puede concluirse que la lectina extraída de Ha presenta afinidad por D-manosa, ácido siálico y N-acetil-D-glucosamina. Estos carbohidratos están

contenidos en la pared celular de algunos microorganismos por lo que existe la posibilidad de emplear el dispositivo diseñado en el análisis microbiológico [38-40].

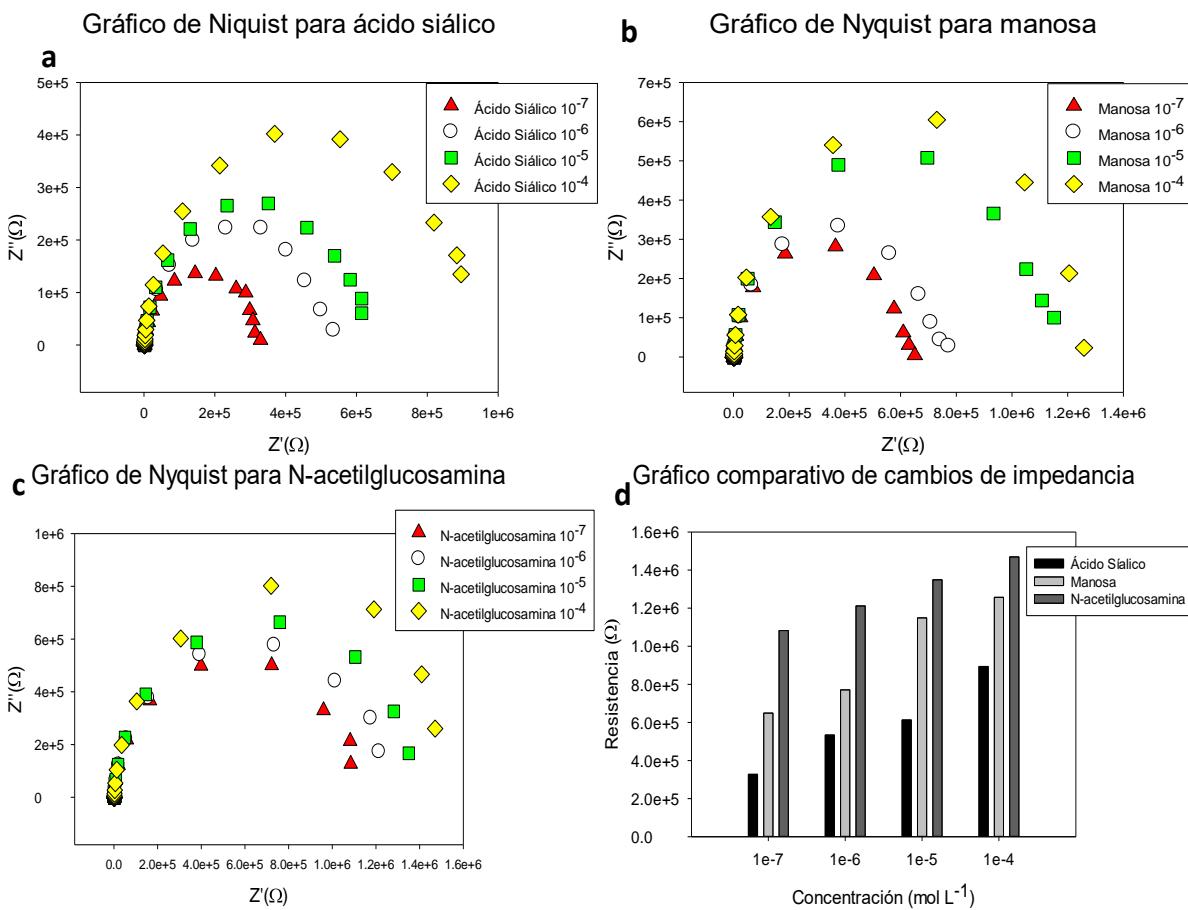


Figura 23. Gráficos complementarios de afinidad a) gráfico de Nyquist para ácido siálico, b) gráfico de Nyquist para D-manosa, c) gráfico de Nyquist para N-acetil-D-glucosamina, d) gráfico comparativo de la concentración de los carbohidratos respecto a los cambios en la resistencia del electrodo.

4.6 Evaluación del biosensor en el análisis de bacterias.

Las bacterias están divididas en dos categorías: Gram positivo y Gram negativo. Las Gram positivo como se menciona anteriormente contienen un recubrimiento de un polímero conformado por ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina llamado péptidoglicano [2]. La lectina obtenida podría identificar a N-acetil-D-glucosamina debido a que es afín a este carbohidrato.

Las bacterias Gram negativo contienen una membrana externa conformada por LPS que contiene diferentes carbohidratos terminales por lo cual sí la bacteria contiene algún carbohidrato a la que es afín la lectina podría ser detectado.

El análisis se basa en un cambio en la resistencia del biosensor. Cuando existe un cambio en la resistencia del biosensor se asocia a la interacción de la bacteria-lectina mediante alguno tipo de unión, por lo tanto, existe un reconocimiento hacia este microorganismo. En caso contrario cuando no existe un cambio en la resistencia se asocia a que la bacteria y la lectina no interactúan y por lo tanto no hay un reconocimiento de bacteria.

Con la finalidad de comprobar la afinidad del agente de reconocimiento, se analizaron dos soluciones que contenían una bacteria Gram positiva (*Listeria monocytogenes*) y una Gram negativa (*Salmonella spp.*). Ambas bacterias hicieron crecer y posteriormente se diluyeron hasta obtener una concentración de 10^5 UFC mL⁻¹. Estas fueron analizadas con el biosensor y se registró la lectura de la resistencia del biosensor en el electrodo. En la Figura 24 se muestran los gráficos de Nyquist de ambas bacterias

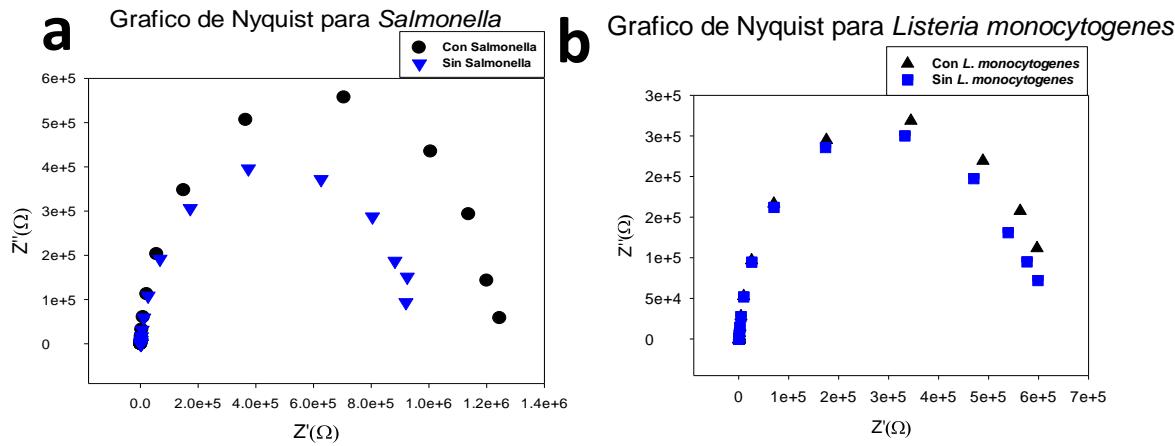


Figura 24. Diagramas de Nyquist a) *Salmonella spp.* b) *Listeria monocytogenes*.

Se puede observar un cambio en la impedancia cuando se analiza *Salmonella spp.*. Se ha descrito que esta bacteria contiene como carbohidrato terminal en el LPS a

manosa [11]. Considerando los resultados anteriores, es probable que la lectina contenida en Ha sea afín a este carbohidrato pudiendo existir una interacción lectina con D-manosa contenida en LPS de la bacteria. En la Figura 25 se muestra el esquema de análisis de unión de *Salmonella spp.* sobre la superficie del biosensor.

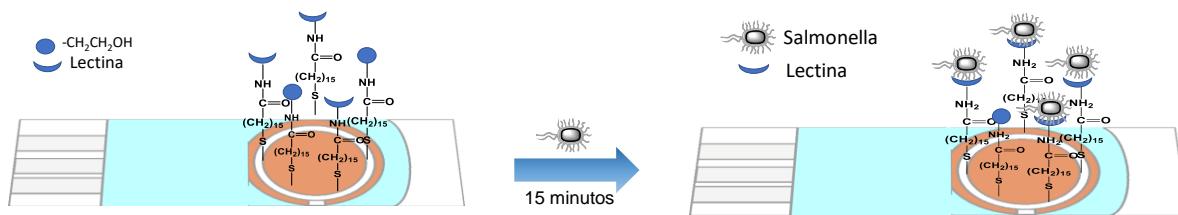


Figura 25. Esquema de reconocimiento de *Salmonella spp.*

En el análisis de la bacteria *L. monocytogenes* no se observa un cambio en la impedancia a pesar de que se demuestra mediante las pruebas de inhibición de aglutinación y el análisis electroquímico que la lectina igual es afín a N-acetil-D-glucosamina no se observa que la bacteria interaccione con lectina esto debido que el carbohidrato esta polimerizado y no tenga la disposición para interactuar con el sitio activo de la lectina.

En contraste con otras metodologías basadas en biosensores se obtienen LOD de detección parecidos, sin embargo, los métodos descritos utilizan técnicas de preconcentración con anticuerpos específicos a *Salmonella*. Estos elevan los costos de la metodología.

4.7 Caracterización analítica del biosensor

4.7.1 Análisis por espectroscopía electroquímica de impedancia.

Para el análisis por espectroscopía electroquímica de impedancia se construyó una línea de calibrado en un intervalo de concentraciones de 5.67×10^3 - 2.57×10^7 UFC mL⁻¹. En la Figura 26 se muestra el gráfico de Nyquist donde se observa que a

medida que aumenta la concentración de *Salmonella* spp la impedancia del biosensor aumenta.

Gráfico de Nyquist para *Salmonella* spp

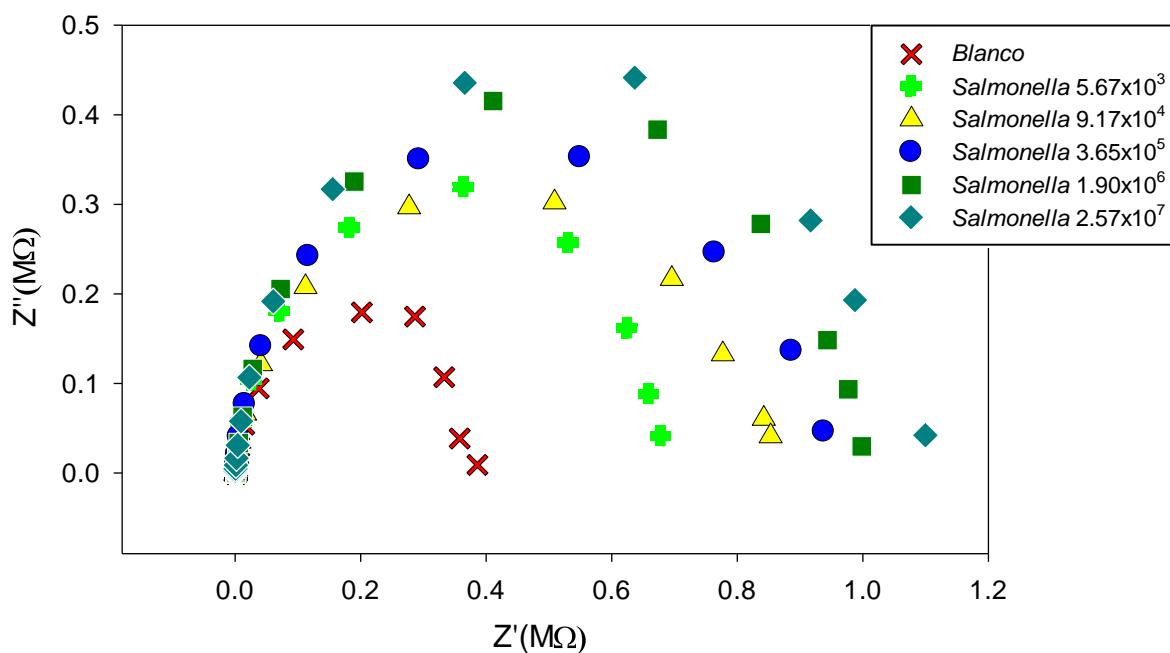


Figura 26. Diagrama de Nyquist para *Salmonella* spp. en intervalo de concentraciones de 5.67×10^3 - 2.57×10^7 UFC mL⁻¹

A partir de la diferencia de los cambios de la resistencia del biosensor (ΔR) en función a la concentración de *Salmonella* spp. se traza la línea de calibrado. La línea presenta un $R^2=0.9902$, por lo que los cambios en la impedancia pueden ser asociados a la concentración del analito. A partir de datos de obtuvo un LOD de 5 UFC mL⁻¹, a pesar de que los LOD de los métodos microbiológicos tradicionales llegan hasta 1 UFC mL⁻¹, este presenta inconvenientes en los tiempos de análisis datos analitos más relevantes de la línea de calibrado están representados en la Figura 27. Se obtiene un intervalo lineal de 15 - 2.57×10^7 UFC mL⁻¹

Línea de calibrada para *Salmonella* spp

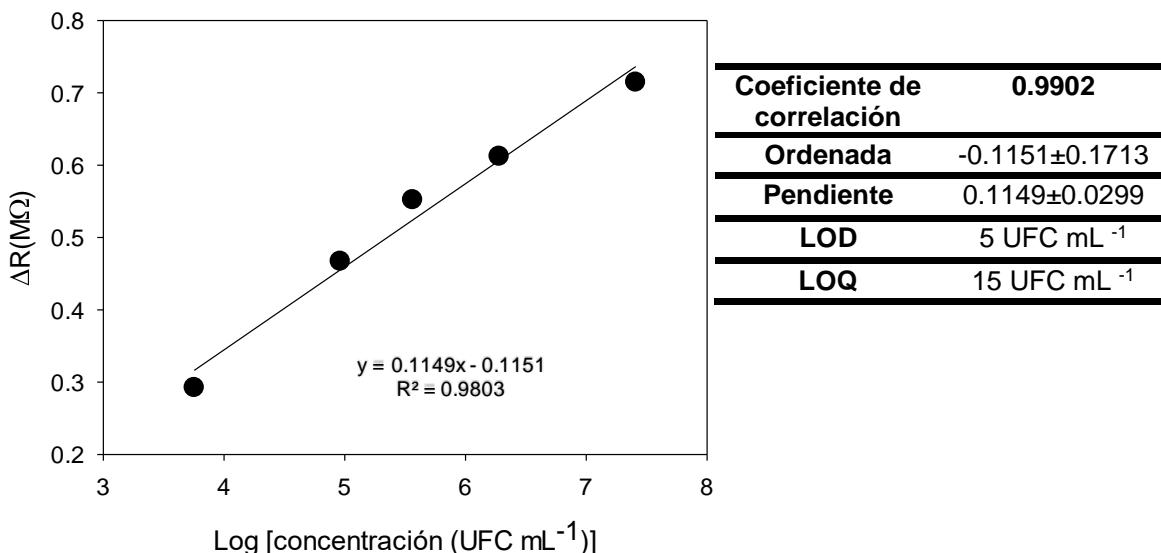


Figura 27. Línea de calibrado ΔR vs Log [Concentración (UFC mL^{-1})] de *Salmonella* spp. intervalo de concentraciones de 5.67×10^3 - 2.57×10^7 UFC mL^{-1} con sus parámetros analíticos.

4.7.2 Evaluación de muestras.

La metodología propuesta se aplicó al análisis de huevos de gallina, los resultados fueron comparados con los proporcionados por el método microbiológico. Este último fue seleccionado debido a que es el más empleado en el análisis de bacterias. Además de ser el método que marca NOM para este análisis.

Los resultados obtenidos mediante el biosensor electroquímico de los controles fueron de acuerdo con lo planteado. Tanto el control positivo como el negativo se comportaron de la forma esperada para el análisis, presentando o no un cambio en la resistencia respectivamente (Fig. 28 A y 28 C).

Los análisis fueron seguidos por el método microbiológico donde se presenta en control positivo el desarrollo de las colonias características de la *Salmonella* spp. en los diferentes medios. (SS colonias planas incoloras con un punto negro en el centro

de la misma, XLD colonias rojas con centros de color negro, VB colonias blanquecinas con un halo rojo) (Fig. 28B y Fig. 28D)

En la mayoría de las muestras de huevo analizadas, aunque se observó crecimiento microbiológico en los medios, este no correspondía a colonias presuntivas de *Salmonella* spp. De la misma forma, el análisis electroquímico en 9 de las 10 muestras no mostró un resultado positivo a la presencia de *Salmonella* spp. ni un cambio en la resistencia. Solamente una muestra presentó cambio en la resistencia, aunque por el método de referencia no se detectó el crecimiento de *Salmonella* spp., pero sí de otra bacteria, lo cual puede atribuirse a que la muestra pudo contaminarse, y se reconoció a otra bacteria, o bien a que la concentración de microorganismo presente era menor.

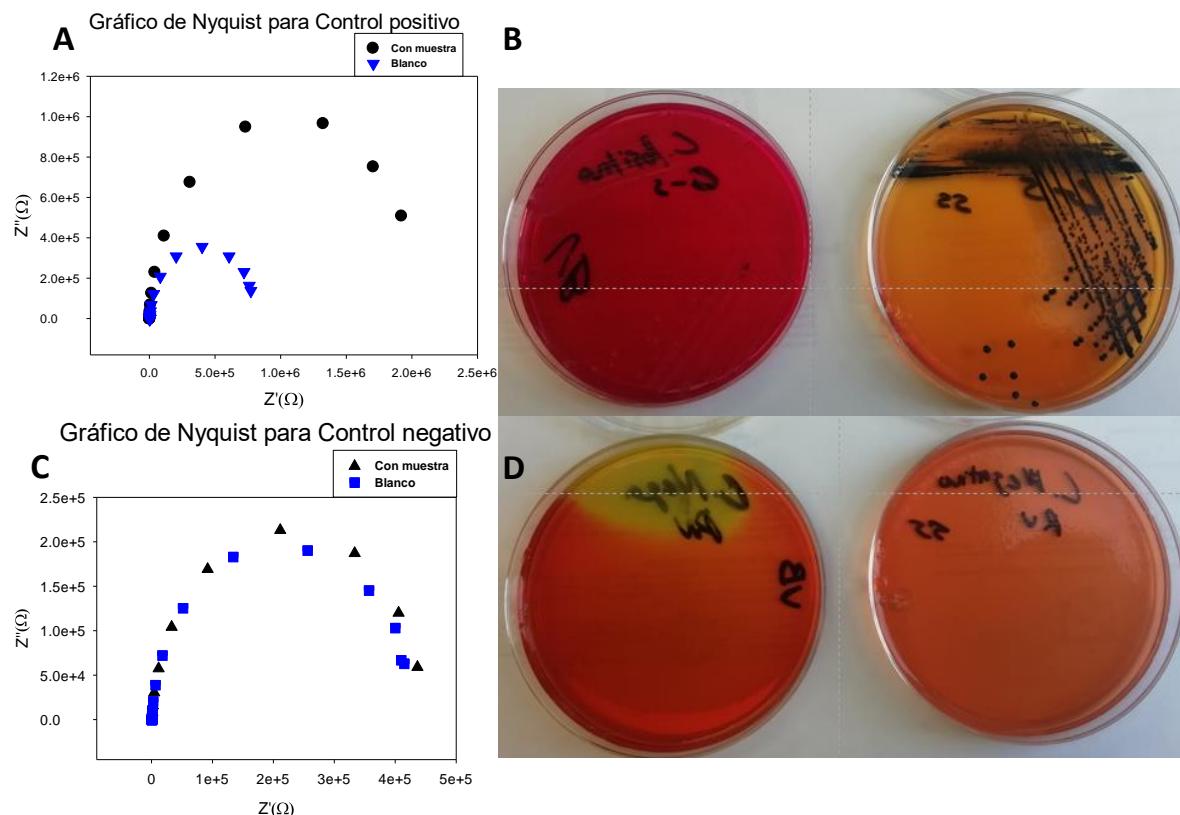


Figura 28. A) Gráfico de Nyquist para control positivo, B) Medios sólidos para control positivo C) Gráfico de Nyquist para control negativo, D) Medios sólidos para control negativo.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Se extrajo una lectina de la especie *Hechtia argentea*, la cual es nombrada Hecarga. El extracto acuoso obtenido presenta una sola lectina con un peso molecular de 27.4 KDa y una concentración de 131.7 mg L^{-1} . Adicionalmente fue positivo en las pruebas de aglutinación empleando sangre humana.

La Hecarga presenta selectividad hacia D-manosa, ácido siálico y N-acetil-D-glucosamina, corroborado mediante ensayos de inhibición de la aglutinación. La lectina Hecarga se inmovilizó como agente de reconocimiento en un biosensor impedimétrico utilizando electrodos serigrafiados de oro, comprobándose la selectividad.

El biosensor impedimétrico basado en la Hecarga reconoce a la bacteria *Salmonella spp.* debido probablemente a que esta contiene como carbohidrato terminal a D-manosa lo que permite la formación de la interacción lectina-carbohidrato.

El biosensor diseñado alcanza un LOD de 5 UFC mL^{-1} y un intervalo lineal de $15-2.57 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$. La técnica se aplicó al análisis de muestras de huevo de gallina, encontrando resultados congruentes empleando muestras control. La validación se debe completar a través de la evaluación de la precisión (repetibilidad y reproducibilidad).

Durante el análisis de muestras se observó una muestra positiva empleando el biosensor, pero que no fue positiva mediante ensayos microbiológicos, por lo que se propone como perspectiva realizar una evaluación de otros microorganismos que puedan ser posibles interferentes.

Hechtia argentea es una planta endémica del estado de Hidalgo, por lo que se contribuye a utilizar fuentes alternativas para el desarrollo de métodos de análisis más eficientes, robustos y de menor costo que permitan disminuir paralelamente el tiempo de análisis en comparación con métodos utilizados actualmente en el análisis de microorganismos.

REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

- [1] Tortora G.J., Funke B.R., Case C. L. Introducción a la microbiología Buenos Aires, Medica Panamericana (2007).
- [2] Young K.D. Bacterial cell wall: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons. Inglaterra (2010).
- [3] Graham L.L., Beveridge T.J., Nanninga N. Periplasmic space and the concept of the periplasm. Trends in Biochemical Sciences 16, 328-329 (1991)
- [4] Helander I. M., Mamat U., Rietschel E.T. Lipopolysaccharides., Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons. Inglaterra (2001)
- [5] Lam J.S., Graham L.L., Lightfoot J., Dasgupta T., Beveridge T.J. Ultrastructural examination of the lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* strains and their isogenic rough mutants by freeze-substitution. Journal of Bacteriology 174, 7159-7167. (1992)
- [6] Organización mundial de Salud, *Salmonella* (no tifoidea) [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- [7] Sheorey H., Darby J., Australian Family Physician. 37: 806-810 (2008)
- [8] Heron M. National Vital Statistics Reports, 67, 1-76 (2018).
- [9] Musaj A., Llugaxhiu D., Hyseni B., Detection of *Salmonella* in egs. Journal International Environmental Application & Science, 13. 1-7 (2018)
- [10] Eng S., Pusparajah P., Ab Mutalib N.S., Ser H., Chan K., Lee L. Journal Frontiers in Life Science. 8, 284-293 (2015)
- [11] Allerberger F., Liesegang A., Grif K., Khaschabi D., Prager R., Danzl J., Hock F., Ottl J., et al. Occurrence of *Salmonella enterica* serovar Dublin in Austria. Euro Surveill. 153: 148-152. (2003)
- [12] Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Nillian, E., Ghazali, F.M., Cheah, Y.K., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. and Radu, S. Simultaneous Detection of *Salmonella* spp., *Salmonella Typhi* and *Salmonella Typhimurium* in Sliced Fruits Using Multiplex PCR. Food Control, 22, 337-342 (2011)

- [13] Holme T., Lindberg A., Garegg P., Onn T. Chemical Composition of Cell-wall Polysaccharide of Rough Mutants of *Salmonella* typhimuriurn. Journal of general microbiology. 52, 45-54 (1968).
- [14] Juneja V.K., Cherry J.P., Tunick M.H. Advances in microbial food safety. Washington, D.C: Oxford University Press (2006).
- [15] Odumeru J. A., León-Velarde C. G., *Salmonella* Detection Methods for Food and Food Ingredients, *Salmonella* - A Dangerous Foodborne Pathogen.
- [16] Yoshimasu MA, Zawistowski J Application of rapid dot blot immunoassay for detection of *Salmonella* enterica serovar enteritidis in eggs, poultry, and other foods. Applied Environmental Microbiology, 67, 459-461. (2001)
- [17] Hyeon JY, Park C, Choi IS, Holt PS, Seo KH, Development of multiplex real-time PCR with Internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and Cronobacter in powdered infant formula. International Journal of Food Microbiology. 144. 177-81. (2010)
- [18] Ramnani P., Saucedo N.M., Mulchandani A. Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors for label-free sensing of environmental pollutants. Chemosphere.143. 85-98 (2016).
- [19] Thévenot, D.R., Tóth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. Pure and Applied Chemistry. 71 (12), 2333-2348. (1999)
- [20] Karunakaran C., Kalpana B., Robson B. Biosensors and bioelectronics. (2015)
- [21] Su, L., Jia, W., Hou, C., Lei, Y., Microbial biosensors: A review. Biosensors and Bioelectronics 26(5), 1788-1799 (2011)
- [22] Silva N. F., Magalhães S J., Freire C., y Delerue-Matos C., Electrochemical Biosensors for *Salmonella*: State of the Art and Challenges in Food Safety Assessment, Biosensors and Bioelectronic.
- [23] Liébana S, Lermo A, Campoy S, Cortés MP, Alegret S, Pividori MI. Rapid detection of *Salmonella* in milk by electrochemical magneto-immunosensing. Biosensors and Bioelectronics.25. 510-513. 10.1016/j.bios.2009.07.022 (2009)

- [24] Silva N. F., Magalhães S J., Olivas M. T., Delerue-Matos C. A potentiometric magnetic immunoassay for rapid detection of *Salmonella* typhimurium. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 7, 4008-4011 (2015)
- [25] Afonso A.S., Merkoçi A., Electrochemical detection of *Salmonella* using gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* 40. 121-126 (2013)
- [26] Mikkelsen, S.R., Rechnitz, G.A. Conductometric tranducers for enzyme-based biosensors. *Analytical Chemistry* 61, 1737-1742. (1989).
- [27] Grieshaber, D., MacKenzie, R., Reimhult, E. *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*. *Sensors*. 8. 1400-1458 (2008).
- [28] Muhammad-Tahir Z., Alocilja E. C., A conductometric biosensor for biosecurity *Biosensors and Bioelectronics* 18. 813-819. (2003)
- [29] Yang G. J., Huang, J. L., Meng, W. J., Shen, M., Jiao, X. A. A reusable capacitive immunosensor for detection of *Salmonella* spp. based on grafted ethylene diamine and self-assembled gold nanoparticle monolayers. *Analytica Chimica Acta* 647. 159-166. (2009)
- [30] Yang, L., Bashir, R. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances*. 26. 135-150. (2008)
- [31] Stillmark, H., Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen [doctoral thesis]. Dorpat. (1888)
- [32] Boyd, W. C., Shapleigh, E. Antigenic Relations of Blood Group Antigens as Suggested by Tests with Lectins. *The Journal of Immunology*. 73, 226-231. (1954)
- [33] Peumans, W. J. and Van Damme, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*. 109. 347-352 (1995).
- [34] Goldstein I.J., Hayes C.E., The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 35. 127-340. (1978)
- [35] Kennedy, J.F., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Cavalcanti, M.S.M., Coelho, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*. 26. 219-230. (1995)

- [36] V. Hořejší, J. Kocourek, Studies on phytohemagglutinins XVIII. Affinity electrophoresis of phytohemagglutinins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure*. 336. 338-343. (1974)
- [37] Van Damme, E. J. M., Lannoo M., y Peumans, W. J. *Plant Lectins. Advances in Botanical Research*. 48. 109-209. (2008)
- [38] Serra B., Gamella M., Reviejo A. J., Pingarrón J. M. Lectin-modified piezoelectric biosensors for bacteria recognition and quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 391: 1853-1860. (2008)
- [39] Wang Y., Ye Z., Si C., Ying Y. Monitoring of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples using lectin-based surface plasmon resonance biosensor. *Food Chemistry* 136. 1303-1308. (2013)
- [40] Oliveira M., Andrade C., Zeng X., Correia Maria., Coelho Luana., Singh P. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition *Journal of Colloid and Interface Science*. 362. 194–201. (2011)
- [41] Santana G.M.S., Alburquerque L.P., *et al.* Isolation of Lectin from *Opuntia ficus-indica* Cladodes. *Acta Horticulturae*. 811. 281-286 (2009)
- [42] Pacha-Gupta R., Sundarajan P., *et al.* Isolation and parcial characterization of lectins from Indian variaties of leguminous plants. *Journal of Advanced Research*. 4. 1827-1834. (2016)
- [43] Silva M.L., Gutiérrez E., Rodriguez J.A., Gomes C., David L. Construction and validation of a *Sambucus nigra* biosensor for cancer associated STn antigen, *Biosensors and Bioelectronics*, 57. 254-261. (2014)
- [44] Paladini R. *Hechtia argentea* (B.S.Williams) Baker *The Encyclopedia of Bromeliads. Llifle Encyclopedias of living forms.* http://www.llifle.com/Encyclopedia/BROMELIADS/Family/Bromeliaceae/32978/Hechtia_argentea
- [45] Kruger N.J. *The Bradford Method for Protein Quantitation. The Protein Protocols Handbook*. Totowa, NJ (2009)
- [46] Putzbach W., Ronkainen N. J. *Immobilization Techniques in the Fabrication of*

Referencias

- Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors*. 13. 4811-4840. (2013)
- [47] Wang C., Yan Q., Liu H., Zhou X., Xiao S. Different EDC/NHS Activation Mechanisms between PAA and PMAA Brushes and the Following Amidation Reactions. *Langmuir*. 27. 12058-12068 (2011)