

**BIOPLATAFORMAS ELECTROANALÍTICAS CON SENSIBILIDAD MODULABLE Y SIN AMPLIFICACIÓN DE LA DIANA PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE RELEVANCIA EN SEGURIDAD ALIMENTARIA**

**V. Ruiz-Valdepeñas Montiel<sup>1</sup>, M. Gamella<sup>1</sup>, J. Parrón<sup>2</sup>, M.I. Ballesteros<sup>3</sup>, M. Villalba<sup>2</sup>, C. Cuadrado<sup>3</sup>, R. Linacero<sup>3</sup>, M. Pedrero<sup>1</sup>, J.M. Pingarrón<sup>1</sup>, S. Campuzano<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Química Analítica, <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, <sup>3</sup>Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid  
E-mail: vrvmontiel@ucm.es

### 1. Introducción

La seguridad alimentaria (SA), una de las inquietudes y desafíos más trascendentes que ha tenido que enfrentar nuestra sociedad durante la última década, tiene como objetivo garantizar el acceso físico y económico a alimentos seguros y nutritivos. La demanda creciente de alimentos está aumentando el riesgo de su consumo y según la Organización Mundial de la Salud, los alimentos son los responsables de más de 200 enfermedades, entre las que se incluyen diarrea, alergias y hasta cánceres [1]. Al mismo tiempo, la SA está ligada a otros retos del siglo XXI, como el cambio climático, que amenaza la salubridad alimentaria y calidad nutricional [2]; o la pandemia del COVID-19, que ha planteado retos sin precedentes en la seguridad e inocuidad del sector agroalimentario [3]. En este marco, los trastornos (alergias o intolerancias) y adulteraciones alimentarias son prioridades principales. La prevalencia a la alergia alimentaria ha aumentado en la última década, considerándose actualmente una amenaza en los países desarrollados. Alrededor de 220 millones de personas la padecen, con tasas del 10 % entre los niños en edad preescolar. Si bien se han logrado importantes avances en la investigación básica, traslacional y clínica, la comprensión de la alergia alimentaria y el desarrollo de terapias requieren ampliar urgentemente su caracterización, mediante tecnologías ómicas que permitan desentrañar la complejidad de la alergia alimentaria y seleccionar biomarcadores fiables para su detección y/o seguimiento [4-5]. Por otro lado, la adulteración alimentaria implica la adición no declarada de sustancias perjudiciales y/o innecesarias a los alimentos, lo que además de disminuir su calidad y considerarse un fraude para los consumidores, puede provocar efectos nocivos para la salud [6].

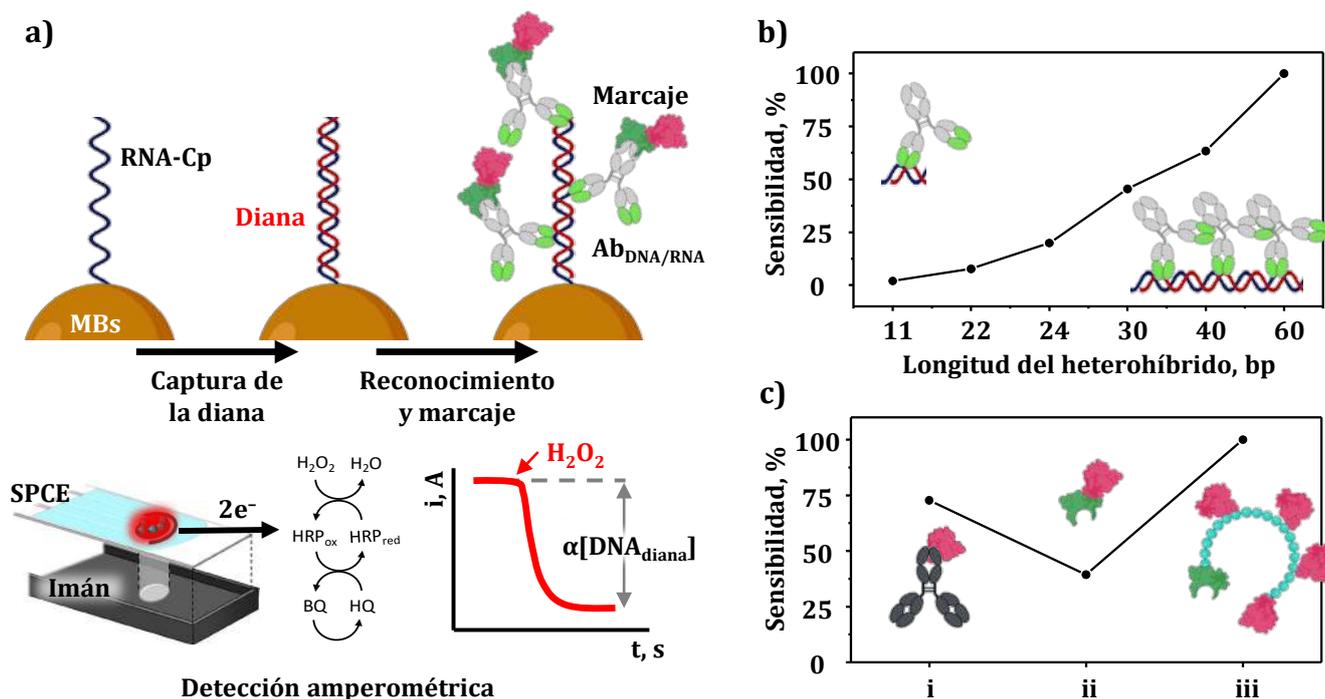
Los principales métodos y/o técnicas disponibles para la determinación de alérgenos y adulterantes incluyen: métodos inmunológicos (ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISAs, ensayos de flujo lateral, inmunoelectroforesis, inmunoblot), peptidómicos, proteómicos, citometría de flujo, inmunocromatográficos, resonancia de plasmón superficial, espectrometría de masas, cromatografías, o métodos basados en DNA (reacción en cadena de la polimerasa, PCR, PCR en tiempo real, PCR-ELISA) [7]. Sin embargo, estos métodos no satisfacen plenamente las exigencias de la sociedad actual, como el análisis descentralizado, barato, sencillo y de carácter multiplexado y/o multiómico. En este sentido, las atractivas propiedades que demuestran los biosensores electroquímicos, como elevada velocidad de respuesta, compatibilidad con fabricación rentable, escalable y miniaturizada, bajo consumo energético y fácil integración en dispositivos portátiles o teléfonos inteligentes hacen que se consideren especialmente adecuados para el control descentralizado y rutinario de alimentos [8]. Por ello, en este artículo se discuten los aspectos más relevantes de las metodologías electroanalíticas de vanguardia desarrolladas recientemente por el Grupo de Investigación de Electroanálisis y (Bio)Sensores Electroquímicos (GEBE) y otros Grupos colaboradores de la Universidad Complutense de Madrid basadas en la detección de secuencias específicas de DNA, de origen animal o vegetal, asociadas a alérgenos o fraudes alimentarios. La selección de dianas genéticas, como alternativa específica y fiable para su detección, responde a la mayor estabilidad de las moléculas de DNA a procesados alimentarios y a la posibilidad de acoplamiento sencillo con estrategias de amplificación del material genético.

## 2. Bioplataformas electroanalíticas para la detección de ácidos nucleicos: diseño, operación y oportunidades

El diseño e implementación de plataformas bioelectroanalíticas de coste asequible y tiempo reducido para la detección sencilla y descentralizada de ácidos nucleicos, con sensibilidad modulable, sin necesidad de recurrir al empleo de estrategias para la amplificación de la diana o nanomateriales, y fácilmente transferibles al diseño de otras dianas o de implementarse en bioplataformas de multiplexado, se ha abordado con éxito y de manera pionera por nuestro Grupo de investigación y colaboradores. Para ello, se han desarrollado estrategias para biosensado de DNA basadas en la captura de heterohíbridos (DNA/RNA) sobre micropartículas magnéticas (MBs), en su reconocimiento con anticuerpos selectivos a dichos heterohíbridos ( $Ab_{DNA/RNA}$ ) y en su marcaje enzimático con bioreceptores específicos (anticuerpos secundarios o proteínas bacterianas) etiquetados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) [9-11]. La transducción final se realiza por amperometría empleando el sistema

HRP/ $H_2O_2$ /hidroquinona (HQ) y tras la captura de los bioconjugados magnéticos sobre los electrodos de trabajo de electrodos serigrafados de carbono (SPCEs) (**Figura 1a**).

Estas bioplataformas, por explotar en el mismo enfoque amplificación enzimática y dos reacciones de afinidad diferentes (formación de heterohíbridos DNA/RNA y su reconocimiento por un  $Ab_{DNA/RNA}$  específico), ofrecen características particularmente atractivas en términos de sensibilidad y selectividad. Además, el empleo del  $Ab_{DNA/RNA}$ , capaz de reconocer epítomos de 6 pares de bases en este tipo de heterohíbridos [11] y de ser marcado con distintos bioreceptores multienzimáticos disponibles comercialmente (anticuerpos secundarios o proteínas bacterianas conjugados con una única o múltiples unidades de la etiqueta enzimática [9-10]), proporciona, no sólo una sensibilidad considerablemente superior a los formatos convencionales de hibridación tipo sándwich o competitivo, sino también la posibilidad de modular



**Figura 1:** a) Diagrama esquemático de las etapas requeridas para el análisis de ácidos nucleicos empleando las plataformas biosensoras desarrolladas y detección amperométrica. Influencia de la longitud del heterohíbrido (DNA/RNA) **b)** y de la estrategia de marcaje enzimático **c)** basadas en el empleo de i) anticuerpo secundario o ii) proteína A conjugada con una molécula de HRP o iii) con polímeros que contienen múltiples moléculas de HRP, en la sensibilidad del bioensayo, expresado como %, asignándose el 100 % al valor máximo de sensibilidad obtenido. (Creado con biorender.com).

la sensibilidad a la carta simplemente variando la longitud de los heterohíbridos formados o de las estrategias empleadas para el marcaje enzimático. Teniendo en cuenta el tamaño del epítipo que reconoce el  $Ab_{DNA/RNA}$  [11], el incremento de la longitud del heterohíbrido formado supone la inmovilización de un mayor número de anticuerpos (**Figura 1b**), que actuarán como soportes de un mayor número de moléculas de trazador enzimático sobre el heterohíbrido y, por tanto, en una mayor respuesta electroquímica.

Los resultados recogidos en la **Figura 1c** muestran la influencia del marcaje enzimático con (i) un anticuerpo secundario, ii) una proteína A bacteriana conjugada con una molécula de HRP, o iii) polímeros que contienen múltiples moléculas de HRP, en la sensibilidad del bioensayo. Como puede observarse, la sensibilidad es mayor en presencia de múltiples moléculas de HRP.

### 3. Aplicación al análisis de secuencias específicas de DNA de relevancia en seguridad alimentaria

Para el diseño e implementación de las bioplataformas sensoras, en primer lugar, se seleccionaron fragmentos característicos de DNA asociados con alérgenos [12] o adulteraciones alimentarias [13] de relevancia.

En las siguientes subsecciones se discuten brevemente y críticamente las características de diseño, analíticas, operacionales e implementación de las distintas plataformas biosensoras desarrolladas, clasificándolas, atendiendo al tipo (genómico, mitocondrial o de cloroplastos) y naturaleza (vegetal o animal) del DNA diana.

#### 3.1. DNA genómico de origen vegetal

Para la detección de tomate y mostaza se seleccionaron fragmentos característicos del DNA genómico de las secuencias codificantes de las proteínas alergénicas *Sola l 7* y *Sin a 1*, de las semillas del tomate y la mostaza, respectivamente. Las bioplataformas desarrolladas para su detección implican la captura de heterohíbridos (DNA/RNA) de 60 bp mediante hibridación tipo sándwich sobre la superficie de las MBs y posterior reconocimiento con el  $Ab_{DNA/RNA}$  y anticuerpos secundarios conjugados con HRP. Estos biosensores permiten la determinación a nivel pM de las secuencias diana sintéticas y su discriminación inequívoca frente a secuencias sintéticas no complementarias o con 1–3 pares de bases desapareadas y frente a extractos de DNA genómico de origen vegetal no diana con los que podrían coexistir en las muestras alimentarias. Es importante destacar la posibilidad

de detección de las secuencias específicas directamente en 50–100 ng de DNA genómico desnaturalizado extraído de semillas de tomate o de mostaza sin fragmentar ni amplificar [12].

#### 3.2. DNA mitocondrial de origen animal

Con el fin de contribuir a la detección de adulteraciones alimentarias en muestras cárnicas de ternera con carne de caballo, se seleccionó un fragmento característico de la región *D-Loop* del DNA mitocondrial del caballo. En este caso, la bioplataforma se basó en la hibridación y captura de heterohíbridos (DNA/RNA) de 40 bp sobre las MBs y su posterior reconocimiento y marcaje enzimático con el  $Ab_{DNA/RNA}$  y una proteína bacteriana conjugada con un homopolímero que contiene múltiples unidades de HRP. Esta bioherramienta permite detectar 0.12 pM (3 attomoles) de la secuencia sintética diana. Además, se evaluó la posibilidad de simplificar las estrategias y mejorar el rendimiento de los procesos de extracción genética mediante el aislamiento selectivo de las mitocondrias. La elevada sensibilidad de la bioplataforma desarrollada y el empleo de mitocondrias como importantes contenedores de información genética (el DNA mitocondrial está constituido por un menor número de genes que el genómico, pero con un mayor número de copias por gen) permitió la aplicación exitosa de la bioherramienta a la detección de la diana en DNA mitocondrial. De hecho, la bioplataforma puesta a punto demostró sensibilidad y selectividad suficiente para la discriminación entre carne de caballo y ternera empleando tan sólo 50 ng de extractos de DNA mitocondrial y la detección en 75 min de tan sólo un 0.5 % (p/p) de carne de caballo en ternera (niveles establecidos por la Comisión Europea) directamente en lisados mitocondriales crudos, sin necesidad de extracción ni amplificación previa del material genético [13].

#### 3.3. DNA de cloroplastos de origen vegetal

En la actualidad se está evaluando el potencial de los cloroplastos para la extracción y detección sencilla de secuencias de ácidos nucleicos de origen vegetal asociadas con alérgenos alimentarios, para lo que se ha seleccionado un fragmento característico del DNA de los cloroplastos del cacahuete. Empleando bioherramientas de fundamento similar a las discutidas en las subsecciones anteriores, los estudios en curso están demostrando también la posibilidad de emplear estos biodispositivos electroquímicos para la detección de trazas de este fruto seco tan

alergénico en amplicones preparados a partir de DNA extraído de cloroplastos de distintos alimentos crudos y procesados.

#### 4. Conclusiones

El trabajo colaborativo de nuestro Grupo de investigación y colaboradores de los últimos años ha derivado en estrategias electroanalíticas pioneras que combinan de forma ingeniosa el empleo de anticuerpos específicos a heterohíbridos (DNA/RNA) y estrategias de marcaje con bioreactivos multienzimáticos sobre microsoportes magnéticos para el biosensado amperométrico sensible y específico de ácidos nucleicos sobre sustratos desechables. Estas bioherramientas permiten detectar de forma simple, rápida, sensible y selectiva y en extractos de distinta naturaleza, secuencias específicas de DNAs de origen animal (carne de caballo en lisados mitocondriales) o vegetal (cacahuets en DNA de cloroplastos y semillas de tomate o mostaza en DNA genómico). Además, por las características de los soportes y de la instrumentación empleada, estas bioplataformas son particularmente atractivas para la detección de procesos de adulteración y/o trazas de alérgenos de relevancia en el punto de atención a través de la interrogación individual o simultánea de secuencias características de DNA. Todos estos atributos las posicionan a la vanguardia de las técnicas de detección moderna para asegurar el cumplimiento de las normativas de etiquetado y seguridad alimentaria con los beneficios que ello supone para fabricantes y consumidores. Es importante destacar que la versatilidad de estas bioherramientas las hace aplicables a la detección de ácidos nucleicos de diversa naturaleza (DNAs o RNAs) y longitud y que las oportunidades que ofrecen pueden aprovecharse también en otros campos de interés, como el clínico y en conexión con otros tipos de biosensado aparte del electroquímico.

#### 5. Agradecimientos

Se agradece a la SEQA la concesión del premio a la mejor comunicación tipo Póster presentada por VR-VM en la XXIII SEQA, el apoyo financiero de los Proyectos de Investigación SAF2017-86483-R y AGL2012-39863-C02-02 (Ministerio de Economía y Competitividad) y PID2019-103899RB-I00 (Ministerio de Ciencia e Innovación) y de los Programas NANOAVANSENS (S2013/MT-3029) y TRANSNANOAVANSENS (S2018/NMT-4349) de la CAM y del Contrato postdoctoral Atracción de

Talento Investigador de la CAM (2020-T2/BIO-20167) a VR-VM.

#### 6. Referencias

- [1] Y. Xu, X. Li, X. Zeng, J. Cao, W. Jiang. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 62, 10 (2022) 2800—2819.
- [2]: R.A. Duchenne-Moutien, H. Neetoo. *J. Food Prot.* 1 84, 11 (2021) 1884—1897.
- [3]: A. Lacombe, I. Quintela, Y. Liao, Y, V.C.H. Wu. *J. Food Saf.* 41 (2021) e12878. <https://doi.org/10.1111/jfs.12878>.
- [4]: H. Renz, K.J. Allen, S.H. Sicherer, H.A. Sampson, G. Lack, K Beyer, H.C. Oettgen. *Nat. Rev. Dis. Primers* 4 (2018) 17098. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.98>.
- [5]: M. De Martinis, M.M. Sirufo, M. Suppa, L. Ginaldi. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1474. <https://doi.org/10.3390/ijms21041474>.
- [6]: A. Choudhary, N. Gupta, F. Hameed, S. Choton. *Int. J. Chem. Stud.* 8, 1 (2020) 2564—2573.
- [7]: S. Campuzano, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, V. Serafín, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón. *Biosensors* 10, 2 (2020) 10. <https://doi.org/10.3390/bios10020010>.
- [8]: J.R. Sempionatto, V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Vargas, H. Teymourian, J. Wang. *ACS Sens.* 6, 5 (2021) 1745–1760.
- [9]: V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, E. Povedano, E. Vargas, R.M. Torrente-Rodríguez, M. Pedrero, A. J. Reviejo, S. Campuzano, J.M. Pingarrón. *ACS Sens.* 3, 1 (2018) 211—221.
- [10]: V. Ruiz-Valdepeñas Montiel (2019). Desarrollo de plataformas electroquímicas para biosensado directo de analitos de relevancia alimentaria y clínica en muestras de elevada complejidad. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- [11]: A.J. Qavi, J.T. Kindt, M.A. Gleeson, R.C. Bailey. *Anal. Chem.* 83 (2011) 5949—5956.
- [12]: M.A. Pereira-Barros, M.F. Barroso, L. Martín-Pedraza, E. Vargas, S. Benedé, M. Villalba, J.M. Rocha, S. Campuzano, J.M. Pingarrón. *Biosens. Bioelectron.* 137 (2019) 171—177.
- [13]: V. Ruiz-Valdepeñas Montiel, M.L. Gutiérrez, R.M. Torrente-Rodríguez, E. Povedano, E. Vargas, Á.J. Reviejo, R. Linacero, F.J. Gallego, S. Campuzano, J.M. Pingarrón. *Anal. Chem.* 89, 17 (2017) 9474—9482.