

# DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE VIRUS EN MUESTRAS DE *ALLIUM SATIVUM L.* CULTIVADAS EN EL PÁRAMO ANDINO DE VENEZUELA

Sabino Menolasina\*, Dianaly Rodríguez

\*Laboratorio de Investigaciones Electroquímicas. Cátedra de Fisicoquímica.  
Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes.  
Mérida-Venezuela501.  
E-mail: \*sabino@ula.ve

## Resumen

Un inmunosensor electroquímico para detectar la presencia o no de ciertos *Allexivirus* en muestras de ajo *Allium sativum L.* provenientes del Municipio Rivas Dávila (Bailadores) del estado Mérida fue construido y caracterizado empleando la técnica electroquímica, Voltamperometría Cíclica (VC). El inmunosensor posee como elemento de reconocimiento biológico anticuerpos mononucleares anti-*Allexivirus* específicos contra GarV-A, absorbidos sobre un electrodo de carbón vítreo previamente modificado con tiourea (TIO) y monocapas de nanopartículas de oro (AuNPs) sintetizadas en el laboratorio y caracterizadas por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), las cuales fueron intercaladas por atracción electrostática con monocapas de azul de metileno (AM). El inmunosensor mostró una alta especificidad y sensibilidad y permitió detectar la presencia de *Allexivirus* específicos contra GarV-A en las muestras analizadas.

Palabras claves: immuno sensor electroquímico, *Allium Sativum L.*, *Allexivirus*, voltametría cíclica

## Abstract

An electrochemical immunosensor for detecting the presence or non-presence of certain *Allexivirus* on garlic samples *Allium sativum L.* from the Rivas Davila municipality (Bailadores) Merida state, was constructed and characterized using the electrochemical technique, cyclic voltammetry (CV). The immunosensor has as biological recognition element, mononuclear *Allexivirus* antibodies specific to GarV-A adsorbed onto a glassy carbon electrode previously modified with thiourea (TIO) and gold nanoparticle monolayers (AuNPs) synthesized in the laboratory and characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM), which were interspersed by electrostatic attraction with methylene blue monolayer (AM). The immunosensor showed high specificity and sensitivity to the presence of *Allexivirus* in the analyzed samples.

Keywords: electrochemical immunosensor, *allium sativum l*, *allexivirus*, cyclic voltammetry

## Introducción

El ajo (*Allium sativum L.*) es considerado en Venezuela como una hortaliza importante por las excelentes cualidades para la salud y gastronomía (1). Desde el punto de vista económico le ofrece al productor un considerable margen de ganancia a corto plazo en superficies cultivadas

relativamente pequeñas. Las zonas de producción de ajo se concentran en los estados Mérida, Lara, Táchira y Trujillo, siendo el estado Mérida el de mayor producción. El *Allium sativum L.*, ocupa el tercer lugar de importancia dentro del grupo de las hortalizas comercialmente cultivadas en el estado Mérida/Venezuela después de la papa y zanahoria. Esto se debe a que en zonas de cultivo por encima de los 1.000 metros, donde las condiciones tropicales todavía predominan, las condiciones agroecológicas son ideales

para expresar al máximo el potencial de rendimiento y calidad de bulbos de ajo al momento de la cosecha. Sin embargo, a pesar de las condiciones climáticas y de la importancia económica y social que posee esta especie, su producción en el estado Mérida ha disminuido en los últimos años como consecuencia de varios factores, entre los que destacan la carencia de semillas certificadas para la siembra que aseguren el desarrollo y crecimiento de plantas sanas (2). El ajo, aunque es una planta anual, presenta la limitante de que sólo se reproduce de forma asexual; esto lleva a que, en ciclos sucesivos de cultivo, se produzca una acumulación del inóculo de muchos patógenos como, hongos, bacterias y principalmente virus; ocasionando la reducción de los rendimientos y la calidad, con la consecuencia de pérdidas económicas. Los productores venezolanos de ajo hacen uso de los dientes o bulbos de procedencia desconocida como única forma de propagación comercial del cultivo (2). Por la importancia económica y social que el ajo representa para nuestra región andina y el país, es necesario prestar atención a los factores que ocasionan pérdidas a la producción, siendo uno de ellos las enfermedades, y entre éstas, las causadas por los virus. Actualmente la mayoría del ajo que se produce en el estado Mérida está contaminado por virus.

La transmisión de virus en ajo se atribuye principalmente a la reproducción vegetativa de la especie, sin embargo, según lo descrito por Román y Núñez (3), las principales enfermedades virales en ajo encontradas en el estado Mérida son causadas por especies pertenecientes a dos de sus familias formalmente reconocidas: Potyviridae y Flexiviridae. Entre los miembros de la familia Potyviridae se encuentran los virus enanismo amarillo de la cebolla (Potyvirus Onion yellow dwarf virus: OYDV), reportado como causante de achaparramientos y reducción de tamaño del bulbo, y el virus rayado amarillo del puerro (Leek yellow stripe virus: LYSV) causante de mosaico en hojas.

La familia Flexiviridae comprende dos géneros: *Carlavirus* y *Allexivirus*. El primero está representado por el virus latente común de ajo (GCLV), que no produce síntomas aparentes; sin embargo, en combinación con otras especies causa serias pérdidas de cosechas. El segundo, el género *Allexivirus*, se cree que son transmitidos por los ácaros y tienen una organización del genoma similar a la del *Carlavirus*. Este género incluye el virus X de chalote (ShVX) y las líneas de virus de ajo ((Garlic virus A (GarV-A), Garlic virus C (GarV-C), Garlic virus E (GarVE), Garlic virus X (GarV-X) y las secuencias parciales de otros tres (Garlic mite-borne filamentous virus (GarMbFV), Garlic virus B (GarV-B) and Garlic virus D (GarV-D))

(4-6), causantes de mosaicos leves en hojas. Los autores concluyeron que todo el ajo cultivado porta una o más de estas especies, formando complejos que de no causar síntomas graves pueden ejercer efectos nocivos sobre el comportamiento fenotípico de este cultivo, como bajos rendimientos, calibres reducidos del bulbo y bajo contenido de materia seca.

La sanidad del producto, muy vinculada con la calidad, es de vital importancia para su comercialización, sobre todo para su exportación a otros países. Para el saneamiento del cultivo de ajo en nuestra región andina, además de contar con semillas certificadas, es necesario identificar el tipo de virus que lo afecta en las distintas zonas donde se cultiva, eso solo se consigue a través de análisis inmunológicos, los cuales consisten en una reacción bioquímica que implica el reconocimiento del virus o antígeno (Ag) por un anticuerpo (Ac), al formarse el complejo antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos proporcionan una alta especificidad hacia un determinado antígeno o análogo de interés. Las técnicas inmunológicas son poco accesibles, de costo muy elevado, sus metodologías son complejas y requiere de largos periodos de tiempo para obtener los resultados debido al tratamiento especializado previo que se le debe aplicar a las muestras a ser analizadas. Todo esto hace que no puedan ser utilizadas como rutina para el control de calidad de una variedad de plantas alimenticias en nuestro país.

Los inmunosensores electroquímicos son sensores que se caracterizan por presentar un anticuerpo como elemento biológico de reconocimiento, el cual es el responsable de la especificidad del sensor y junto con un transductor electroquímico transforman la reacción bioquímica en una señal medible electroquímicamente. Debido a la alta especificidad de un inmunosensor y a la sensibilidad que ofrecen las técnicas electroquímicas, la detección de virus presentes en verduras y hortalizas a través del uso de

inmunosensores electroquímicos, podría ser una alternativa de bajo costo para el control sanitario de estos rubros.

Actualmente se encuentra en la literatura numerosos ejemplos de inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de nanopartículas de oro como soporte del anticuerpo y el antígeno, ya que éstas proporcionan un ambiente similar a su entorno natural. Además las partículas metálicas actúan como medio de conducción electrónico, facilitando la transferencia electrónica, permitiendo alcanzar elevados niveles de estabilidad y sensibilidad (7).

En el presente trabajo se desarrollo un inmunosensor electroquímico utilizando AuNPs sintetizadas en el laboratorio, como soporte del elemento de reconocimiento biológico (anti-*Allexivirus* específicos contra GarV-A) para detectar la presencia de *Allexi* virus en muestras de ajo empleando VC.

## Materiales y Métodos

### Reactivos

Los anticuerpos mononucleares anti-*Allexivirus* específicos contra GarV-A, fueron suministrados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Estado Mérida, en sueros concentrados provenientes de conejos. Las muestras de ajo contaminadas con *Allexivirus* provenientes de la población de Bailadores, Municipio Rivas Dávila, Estado Mérida se emplearon como antígenos en los estudios electroquímicos que se realizaron con el inmunosensor. El ácido tetracloroaurico y el citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) utilizados en la síntesis de las AuNPs fueron suministrados por Merck. El azul de metileno ( $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{C}_3\text{S}$ ) y tiourea ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ ) utilizados fueron de grado analítico y suministrados por Merck. Los reactivos utilizados en la preparación de las soluciones electrolíticas fueron de grado analítico de la RDH y utilizados sin ningún tratamiento adicio-

nal de purificación. El agua utilizada fue de calidad Milli Q 18 M $\Omega$  (Millipore, Milford, MA, USA). Todos los reactivos fueron utilizados sin ningún tratamiento adicional de purificación. Las soluciones fueron preparadas en agua desionizada de 18 M $\Omega$ .cm y ajustadas a pH 6,5.

### Tratamiento de la superficie electródica de carbón vítreo (SECV)

Las SECV fue pulida con diferentes grados de alúmina (0,3 y 0,05  $\mu\text{m}$ ) provenientes de la Buehler usando agua desionizada como lubricante. Posterior a dicha limpieza mecánica, dicha superficie fue sometida a una limpieza electroquímica por VC en una solución 0,1M HClO<sub>4</sub> aplicando un determinado número de barridos cíclicos entre -0,2 V y 1,7 V. Una vez que la SECV fue tratada siguiendo los pasos descritos anteriormente se procedió a caracterizarla electroquímicamente y a realizar las distintas modificaciones sobre su superficie con la finalidad de desarrollar el inmunosensor electroquímico.

### Modificación electroquímica y química de la SECV

La electrodeposición de tiourea sobre la superficie de SECV se hizo siguiendo el procedimiento descrito por Chai et.al. (8). Bajo este procedimiento la TIO es adsorbida sobre la SECV. Posteriormente se procede a colocar sobre la SECV modificada con TIO, 15  $\mu\text{L}$  de una mezcla coloidal de AuNPs, a la cual se le aplica aire frío hasta que el solvente de la mezcla se evapore. Posteriormente esta SECV modificada fue activada por VC en solución buffer fosfato pH 6,7 antes de ser nuevamente modificada alternando capas de AM y AuNPs.

### Tratamiento de la muestra

Los antígenos presentes en las muestras analizadas fueron extraídos por trituración en mortero, de las hojas que recubren al bulbo del *Allium sativum*. La muestra triturada fue re-suspendida en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 6,5 y posteriormente filtrada. La solución resultante fue protegida de la luz y guardada a 4°C.

### Aparatos

Los experimentos por VC se realizaron utilizando una celda de vidrio de un compartimiento y tres electrodos. Un electrodo de Ag/AgCl (sat) fue utilizado como electrodo de referencia y un alambre de platino como electrodo secundario. Como electrodo de trabajo se utilizó un electrodo de

carbón vítreo (CV) modificado electroquímicamente y químicamente. Los experimentos por VC se realizaron utilizando un potenciostato galvanostato Autolab PGSTAT12. Todo el material de vidrio fue lavado inicialmente con detergente y abundante agua desionizada.

## Resultados y Discusión

Para la construcción del inmunosensor se modificó electroquímicamente y químicamente una superficie electródica de carbón vítreo con sustancias orgánicas (TIO y AM) e inorgánicas (AuNPs), de tal forma de que sirvieran de soporte para el anclaje del componente biológico (el anticuerpo).

Primero la TIO fue electrodepositada sobre la superficie de CV utilizando la técnica de VC, ciclando 10 veces entre -0,8 y 1,5 V al electrodo de CV en una solución acuosa de 0,25M de TIO.

Kirchnerová y Purdy (1981) (9), confirmaron que en soluciones ácidas y neutras, la oxidación de tiourea procede por la vía de una reacción de transferencia electrónica lenta de un electrón, reduciéndole a radical  $[(NH_2)_2-C-S]^{+}$  a 0,7 V. La siguiente oxidación de este radical, se da solamente a potenciales más elevados (1,2 V). De hecho, durante la electrolisis de tiourea en medio ácido, se forma un precipitado blanco, identificado como C,C'ditioformamidinodinitrato. La TIO fue adsorbida sobre la superficie de carbón vítreo a través de sus grupos funcionales aminos, durante la aplicación de diez barridos de potencial entre -0,8 a 1,5 V a una velocidad de 0,1 V/S por voltamperometría cíclica (10).

La Figura 1 muestra los voltamperogramas obtenidos con el electrodo modificado de CV con tiourea y sin modificar en solución reguladora de fosfato 0,1 M, pH 6,7.

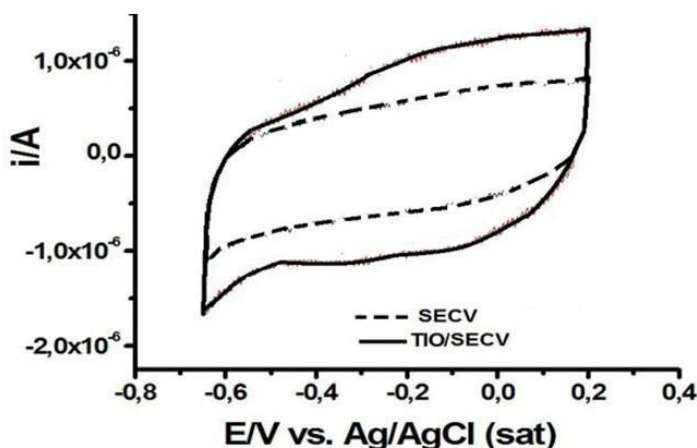


Figura 1. Voltamperogramas obtenidos en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 6,5 con un el sensor sin modificación química (SECV) y con el modificado con TIO (SECV/TIO)

La Figura 2A, muestra el espectro obtenido con una alícuota de las AuNPs sintetizadas por reducción del ácido tetracloroáurico con citrato.

La aparición de un máximo de absorción a 525 nm, es característico de AuNPs con un tamaño de 16 a 20 nm, de acuerdo a los resultados reportados en la literatura (11). La Figura 2B muestra la imagen obtenida por TEM de las AuNPs sintetizadas, observándose que presentan una forma irregular y un tamaño promedio de  $16,2 \pm 1,1$  nm.

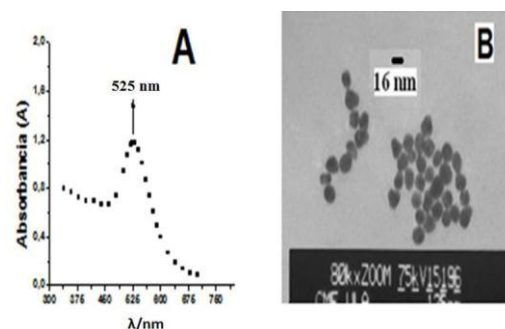
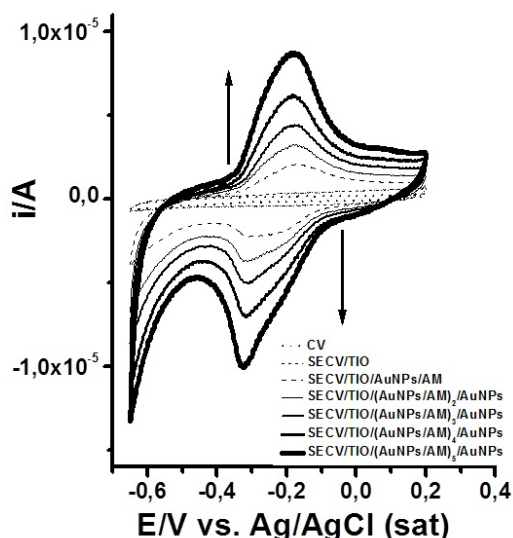


Figura 2. A) Espectro UV/VIS de una mezcla coloidal de oro en medio acuoso obtenido empleado un espectrofotómetro UV/VIS JEWAY y una celda plástica de 1cm de espesor. B) Imagen de AuNPs de oro obtenidas por TEM de las síntesis con citrato de sodio.

La Figura 3, muestra la familia de voltamperogramas obtenidos con el sensor SECV/TIO modificado con diferentes capas de AuNPs/AM en solución reguladora de fosfato 0,1 M, pH 6,7. Las AuNPs que están cargadas negativamente pueden ser adsorbidas sobre la tiourea, el azul de metileno que a un pH de 6,7 está cargado positivamente es atraído fácilmente por las AuNPs. Una vez formado la primera capa de AM/AuNPs sobre el electrodo modificado SECV/TIO, se puede seguir adsorbiendo por atracción electrostática otras capas de AM/AuNPs hasta desarrollar el sensor electroquímico SECV/TIO/(AuNPs/AM) $_n$ /AuNPs.



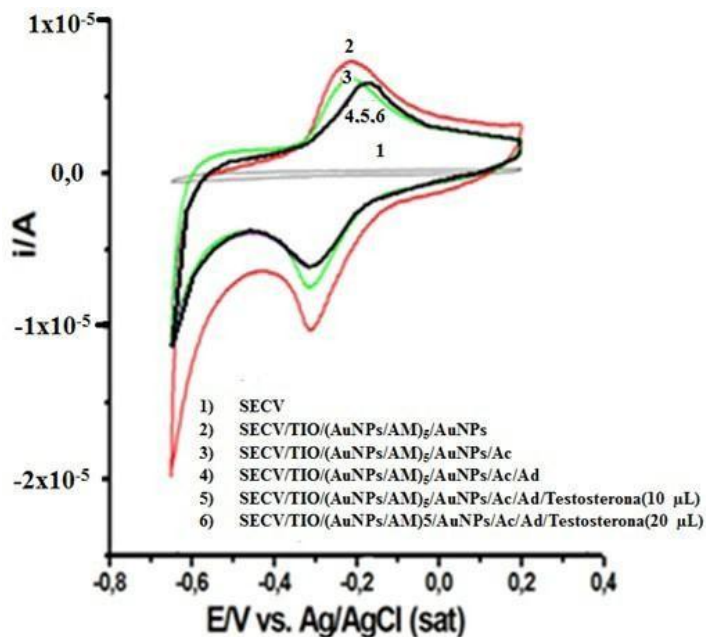


**Figura 3.** Familia de voltamperogramas obtenidos con el sensor SECV/TIO modificado con diferentes capas de AM/AuNPs en solución reguladora de fosfato 0,1 M, pH 6,7

A medida que se incrementa el número de capas se observa un incremento de una corriente de pico de oxidación. El azul de metileno es un colorante catiónico cargado positivamente con un proceso redox reversible en soluciones acuosas, cuyo potencial formal  $E_0$  varía entre -0,10 y -0,40 (Vs ECS) en un rango de pH de 4 a 11, lo que lo hace un mediador catalítico para diferentes sistemas biológicos (12). El AM en la multicapa actúa como mediador de electrones.

La Figura 4 muestra la respuesta electroquímica del sensor SECV/TIO/(AuNPs/AM)5/AuNPs al ir siendo modificado con anticuerpos (Ac: anti-*Allexivirus* específicos contra GarV-A) y leche descremada y posteriormente la respuesta electroquímica del inmunosensor construido frente a la presencia de diferentes cantidades del antígeno testosterona. Se observa que la respuesta electroquímica disminuye a medida que se adsorben los anticuerpos y la leche descremada (Ad) como consecuencia del bloqueo de la superficie electroquímica del sensor. Una vez que la superficie electródica se modifica con los anticuerpos y se bloquean los sitios activos donde no se han adsorbidos estos con Ad, se tiene el inmunosensor, el cual al ser evaluado en presencia de

concentraciones variables de antígenos no específicos (testosterona), no muestra ningún cambio en su respuesta electroquímica.



**Figura 4.** Respuesta electroquímica del sensor SECV/TIO/(AuNPs/AM)5/AuNPs al ir siendo modificado con anticuerpos (Ac: anti-*Allexivirus* específicos contra GarV-A), leche descremada (Ad) y su comportamiento frente a un antígeno no específico

Al evaluar dicho inmunosensor, SECV/TIO/(AuNPs/AM)5/AuNPs/Ac/Ad en presencia de diferentes cantidades de una suspensión preparada por trituración de las hojas que recubren al bulbo de muestras de *Allium sativum* provenientes del municipio Rivas Dávila (Bailadores) del estado Mérida y mezclando en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 6,5 y posteriormente filtrada, se observa que el mismo responde al variar la cantidad de suspensión que se agrega a la celda electroquímica. A medida que se adicionan cantidades específicas de la suspensión, la señal del pico de oxidación disminuye de manera proporcional al volumen añadido (Figura 5A y Figura 5B)

En la Figura 5B, se observa que la respuesta electroquímica del inmunosensor decrece linealmente a medida de que se realizan adiciones sucesivas de la suspensión preparada a partir de las hojas que recubren al bulbo de muestras de *Allium sativum*, en la celda electroquímica que contiene solución reguladora de fosfato 0,1 M, pH 6,7. Este comportamiento es indicativo que las muestras de ajos que se procesaron están contaminadas con el virus GarV-A.

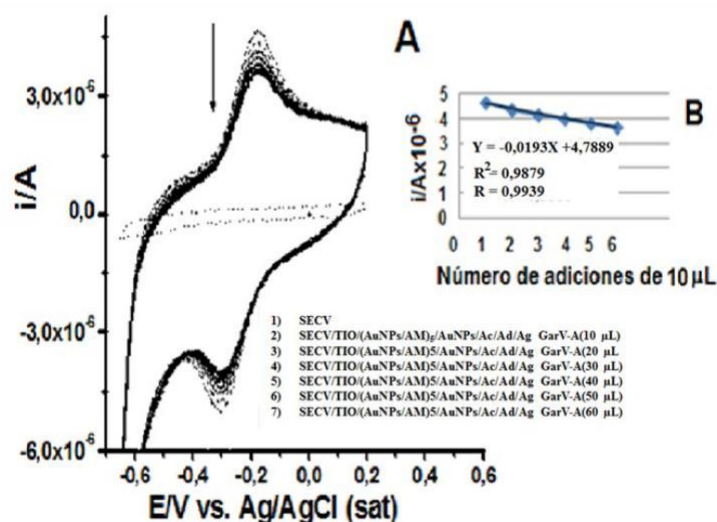


Figura 5. A) Respuesta electroquímica del inmunosensor en presencia del virus GarV-A presente en muestras de ajos provenientes del Municipio Bailadores, Edo. Mérida. B) Comportamiento lineal de  $I_p$  vs. Número de adiciones de 10 mL de una suspensión de hojas del bulbo de ajos contaminados con el virus GarV-A

## Conclusiones

El inmunosensor SECV/TIO/(AuNPs/AM)<sub>5</sub>/AuNPs/Ac/Ad desarrollado permitió la detección de Allxivirus en muestras de ajo *Allium sativum* provenientes del municipio Rivas Dávila (Bailadores) del estado Mérida.

La respuesta del inmunosensor presentó una linealidad aceptable, demostrando que el inmunosensor responde de manera proporcional a la concentración de Allxivirus en solución, además la prueba de interferentes demostró que la respuesta del inmunosensor es específica, ya que no hubo respuesta ante la presencias de bacterias interferentes.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA)-ULA, proyecto: FA-517-12-08-A, por la financiación de este trabajo y al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Estado Mérida-Venezuela por su colaboración en el suministro de los anticuerpos mononucleares anti-Allxivirus específicos contra GarV-A.

## Referencias

- Pardo A, Marín C. 2003; Caracterización de cultivares de ajo en Cubiro, Estado Lara. *Agronomía Tropical*. 53(4): 381-395.
- Pardo A, Hernández A, Méndez N. Caracterización molecular de siete clones de ajo (*Allium sativum* L.) mediante la técnica RAPD. *Bioagro*. 2(21): 81-86.
- Velásquez VR, y Reveles HM. 2012; Manejo de Enfermedades Virales de Ajo en Zacatecas. Folleto Técnico No. 40. Campo Experimental Zacatecas, CIRNOC - INIFAP, 26 p.
- Ryabov EV, Generozov EV, Vetten HJ, Zavriev SK. 1996; Analysis of the 3-region of the mite born filamentous virus genome testified sits relation to the shallot virus X group. *Mol. Biol.* 30: 103-110.
- Song SL, Kim JT, Lee CH, Choi JS. 1998. Molecular characterization of the garlic virus X genome. *J. Gen. Virol.* 79: 155-159.
- Sumi S, Matsumi T, Tsuneyoshi T. 1999. Complete nucleotide sequences of garlic viruses A and C, members of the new lyratifiedgenus Allxivirus. *Arch Virol* 144: 1819-1826.
- Ma H, Sun J, Zhang Y, Bian C, Xia S, Zhen T. 2016. Label-free immunosensor based on one-step electrodeposition of chitosan-gold nanoparticles biocompatible film on Au microelectrode for determination of aflatoxin B1 in maize. *Biosens & Bioelectr.* 22-29.
- Chai R, Yuan R, Chai Y, Ou Ch, Cao Sh, Li X. 2008. Amperometric immunosensors based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and methylene blue on thiourea modified glassy carbon electrode for determination of human chorionic. *Talanta*. 74(5): 1330-1336.
- Kirchnerová J, Purdy W. The mechanism of the electrochemical oxidation of thiourea. *Analytica Chimica Acta*, 123: 83-95.
- Menolasina S, De Oliveira MI, Travieso C. Superficies de carbón vítreo modificadas con compuestos orgánicos y nanopartículas de oro como sensores de dopamina. *Avances en Química*. 8(3): 139-144
- Cai H, Xu C, He P, Fang Y. Colloid Au-enhanced DNA immobilization for the electrochemical detection of sequence-specific DNA. *J. Electroanal. Chem.* 510: 78-85.
- Li M, Gao F, Yang P, Wang L, Fang Y. Conveniently assembling dithiocarbamate and gold nanoparticles onto the gold electrode: A new type of electrochemical sensors for biomolecule detection. *Surf. Sci.* 602: 151-155.