

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**EVALUACIÓN DE LA *MANIHOT ESCULENTA* COMO BIOMARCADOR
SEDENTARIO DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR CADMIO**

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE QUIMICO

PAULO CESAR BUSTAMANTE FONSECA

Directora: Dra. Lenys Mercedes Fernández Martínez

QUITO, junio 2023

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Químico, de mi tesista Paulo Cesar Bustamante Fonseca, ha sido concluida conforme a las normas establecidas; por tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in blue ink, reading "Lenys M. Fernández Martínez". The signature is fluid and cursive, with the first letters of the first and last names being capitalized and prominent.

Ph.D. Lenys Fernández Martínez

Directora de la disertación

Quito, 29 de junio de 2023

DEDICATORIA

Dedico este manuscrito a mi querida mami la cual a pesar de las dificultades que atravesamos juntos, supo hallar la forma de sacarme adelante y darme aliento ♡

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fuerza, paciencia y sabiduría para realizar esta investigación.

A mi madre por ser siempre mi ejemplo a seguir y mi luz de esperanza en los momentos difíciles y a mi padre quien gracias a su cosmovisión, me enseñó lo primordial que es tener un criterio propio.

A mi directora de tesis Lenys por brindarme su tiempo, experiencia y conocimiento, me encuentro profundamente agradecido por su mentoría y por creer en mi a lo largo de este proceso.

A mis amigos de la carrera Ingrid, Leslie, Deya, Adri, Andrés y Emerson por darme momentos de risas y enseñarme que no todo en la carrera es competencia.

A mis amigos del colegio y del barrio Melani, Paula, Ale y Bryan por enseñarme que conforme pasan los años, lo único que importa es la calidad de las personas y el crecimiento personal que tienes con ellas.

A los laboratorios de Biotecnología de la ESPE en especial a Andrea y Mónica por brindarme su apoyo, guía y paciencia en el desarrollo de la parte experimental, a los laboratorios del GEFA en especial a Jocelyne y Diego por aportar con sus conocimientos, recursos y experiencia en mi investigación y finalmente a Sala de preparaciones de la escuela de Ciencias Químicas en especial a Raque y Meli por brindarme los recursos y conocimientos que me facilitaron la culminación de este trabajo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ejemplos de contaminación a) bacteriana y b) fúngica. Imágenes obtenidas de: kapitalinteligente biocuriosidades respectivamente.	16
Figura 2. Muestra obtenida después del tratamiento de desinfección T3.....	17
Figura 3. Explantes sembrados del tubérculo de la Manihot esculenta (a), callo a los 20 días (b), callo a los 60 días (c).....	18
Figura 4. Suspensiones celulares de Manihot esculenta contaminadas.....	19
Figura 5. Suspensiones celulares de Manihot esculenta a los tres meses.	19
Figura 6. Vista con la ayuda de un microscopio en 40x, de la concentración celular presente en la suspensión celular.	20
Figura 7. Voltagrama cíclico del electrodo GC en H_2SO_4 0,5 mol/L, velocidad de barrido 50 mV/s durante 20 ciclos para la respectiva limpieza electroquímica.....	21
Figura 8. Voltagrama cíclico del electrodo GC en H_2SO_4 0,1 mol/L, velocidad de barrido 50 mV/s durante 15 ciclos para la respectiva activación electroquímica.	21
Figura 9. Voltagrama para la curva de calibración para la detección de H_2O_2 sobre el electrodo GC (1era. réplica).....	22
Figura 10. Voltagrama para la curva de calibración para la detección de H_2O_2 sobre el electrodo GC (2da. réplica).	23
Figura 11. Voltagrama para la curva de calibración para la detección de H_2O_2 sobre el electrodo GC (3era. réplica).	23
Figura 12. Curva de calibración para la detección de H_2O_2 sobre el electrodo GC obtenida mediante regresión lineal.	24
Figura 13. Voltametría de pulso diferencial de muestra de 0,0075 mg a las 72h.....	25
Figura 14 Curva de calibración para la detección de H_2O_2 al cabo de 24, 48 y 72 horas en muestras con 0,0030 mg de sulfato de cadmio.	25
Figura 15. Expresión de peróxido de hidrógeno en la suspensión celular vs. tiempo de exposición a Cd(II).	27
Figura 16. Expresión de peróxido de hidrógeno en la suspensión celular vs. miligramos de $CdSO_4$	27

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de los parámetros variados para la determinación del mejor protocolo de desinfección.....	17
Tabla 2. Resultados de las variables analizadas para la determinación del mejor protocolo de desinfección.....	17
Tabla 3. Concentraciones iniciales de H ₂ O ₂ en muestras de suspensiones celulares con los respectivos miligramos de CdSO ₄ a diferentes tiempos de exposición.....	26

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Voltamperometría de 0,0030 mg a 24 horas de exposición.	30
Anexo 2. Voltamperometría de 0,0030 mg a 48 horas de exposición.	31
Anexo 3. Voltamperometría de 0,0030 mg a 72 horas de exposición.	31
Anexo 4. Voltamperometría de 0,0045 mg a 24 horas de exposición.	32
Anexo 5. Voltamperometría de 0,0045 mg a 48 horas de exposición.	32
Anexo 6 Voltamperometría de 0,0045 mg a 72 horas de exposición.	33
Anexo 7. Voltamperometría de 0,0060 mg a 24 horas de exposición.	33
Anexo 8 Voltamperometría de 0,0060 mg a 48 horas de exposición.	34
Anexo 9 Voltamperometría de 0,0060 mg a 72 horas de exposición.	34
Anexo 10 Voltamperometría de 0,0075 mg a 24 horas de exposición.	35
Anexo 11 Voltamperometría de 0,0075 mg a 48 horas de exposición.	35
Anexo 12 Cálculo para cuantificar la concentración de H ₂ O ₂ en μM.	36
Anexo 13 Curva de calibración para la detección de H ₂ O ₂ al cabo de 24, 48 y 72 horas en muestras con 0,0045 mg de sulfato de cadmio.	36
Anexo 14 Curva de calibración para la detección de H ₂ O ₂ al cabo de 24, 48 y 72 horas en muestras con 0,0060 mg de sulfato de cadmio.	37
Anexo 15 Curva de calibración para la detección de H ₂ O ₂ al cabo de 24, 48 y 72 horas en muestras con 0,0075 mg de sulfato de cadmio.	37
Anexo 16 Análisis ANOVA para la obtención de la curva de calibración ajustada.	38
Anexo 17 Cálculo para evaluar el porcentaje de recuperación del método.	39

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	10
2. ABSTRACT	10
3. INTRODUCCIÓN	11
4. MÉTODOS	13
4.1 MATERIALES	13
4.1.1 REACTIVOS.....	13
4.1.2 EQUIPOS.....	13
4.2. MÉTODOS.....	13
4.2.1 OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES DEL TUBERCULO DE LA MANIHOT ESCULENTA	13
4.2.1.1 ETAPA DE CAMPO	13
4.2.1.2 PROCESOS DE DESINFECCIÓN	13
4.2.1.3 INDUCCIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO.....	14
4.2.1.4 SIEMBRA.....	14
4.2.1.5 MULTIPLICACIÓN DE CALLO	14
4.2.1.6 OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES	14
4.2.1.7 ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES	14
4.2.1.8 RECONTEO CELULAR	14
4.2.2 MÉTODO ANALÍTICO	15
4.2.2.1.1. LIMPIEZA.....	15
4.2.2.2. ACTIVACIÓN DEL ELECTRODO GC.....	15
4.2.2.2.1. OBTENCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.....	15
4.2.2.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LAS SUSPENSIONES CELULARES	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. DESINFECCIÓN DE EXPLANTES DEL TUBÉRCULO DE LA MANIHOT ESCULENTA	16
5.2. PROTOCOLO DE INDUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO	18
5.3. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES	18
5.4. CONTEO CELULAR	20
5.5. MÉTODO ANALÍTICO	20
5.5.1. LIMPIEZA DEL ELECTRODO DE TRABAJO	20
5.5.2. ACTIVACIÓN DEL ELECTRODO DE TRABAJO	21
5.5.3. CURVA DE CALIBRACIÓN	22

5.5.4. CUANTIFICACIÓN DE H ₂ O ₂ EN LAS SUSPENSIONES CELULARES	.24
6. CONCLUSIONES28
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS28
8. ANEXOS30

1. RESUMEN

Un biomarcador sedentario, es un organismo vivo del cual puede obtenerse información sobre contaminación ambiental. En este sentido, se tiene especial interés en plantas y árboles; particularmente, en la presente investigación en la yuca amazónica o *Manihot esculenta*. En el presente estudio se evaluó a la *Manihot esculenta* como biomarcador sedentario de contaminación por cadmio. Se cuantificó la concentración de peróxido de hidrógeno, como señal indicativa del estallido oxidativo, producto de la presencia del metal en la planta, en suspensiones celulares de explantes del tubérculo de *Manihot esculenta*. Las muestras estresadas con el metal se evaluaron variando la concentración de iones Cd(II) en las suspensiones y el tiempo de exposición. Para la cuantificación de peróxido de hidrógeno se utilizó la técnica electroquímica de voltametría de pulso diferencial, empleando como electrodo de trabajo carbono vítreo. El método experimental resultó ser óptimo y conveniente para la cuantificación de la expresión de peróxido de hidrógeno. Los resultados de este estudio indican que la *Manihot esculenta* es un buen candidato como biomarcador sedentario.

2. ABSTRACT

A sedentary biomarker is a living organism from which information on environmental contamination can be obtained. In this sense, there is special interest in plants and trees; particularly, in the present investigation in the Amazonian yucca or *Manihot esculenta*. In the present study, *Manihot esculenta* was evaluated as a sedentary biomarker of Cd contamination. The concentration of hydrogen peroxide was quantified in cell suspensions of *Manihot esculenta* tuber explants as an indicative signal of the oxidative burst due to the presence of the metal in the plant. The samples stressed with the metal were evaluated by varying the concentration of cadmium ions in the suspensions and the exposure time. For the quantification of hydrogen peroxide, the electrochemical technique of differential pulse voltammetry was used, employing glassy carbon as the working electrode. The experimental method proved to be optimal and convenient for the quantification of hydrogen peroxide expression. The results of this study indicate that *Manihot esculenta* is a good candidate as a sedentary biomarker.

3. INTRODUCCIÓN

La ciencia tiene interés por preservar y proteger al ambiente, así como el de llegar a establecer parámetros químicos, físicos y biológicos que puedan estimar el efecto de la actividad humana en ella (Toro-Restrepo, B., 2011).

La contaminación ambiental se define como la presencia de todos aquellos elementos, sean estos químicos, biológicos o físicos, que interfieren con las características naturales del medio ambiente ya que, exceden el nivel máximo permisible en él; esta se encuentra estrechamente ligada con el desarrollo de los procesos de industrialización, así como con el avance de la tecnología.

Dicho lo anterior, el uso de la biotecnología se presenta como una herramienta de monitoreo y remediación de contaminantes ambientales. El biomonitoreo puede realizarse en sistemas vivos que muestren las circunstancias del medio en el que se encuentran; estos sistemas reciben el nombre de biomarcadores. La herramienta se fundamenta en seguir en tales sistemas parámetros de funcionamiento, estructura y reacción cuando el medio en el que se desarrollan se ve alterado como consecuencia de diferentes tipos de riesgos (León, E. A. R., Carballo, M. M., Sánchez, B. P., & del Socorro Fernández, M., s.f.); midiendo así que tan nocivo y perjudicial es para el ser vivo el cambio al cual es sometido.

La *Manihot esculenta* (Yuca), pertenece a la familia de las Euforbiaceae que comprende más de 7000 especies distribuidas en las regiones tropicales de todo el mundo. Es una raíz que procede de un arbusto, cultivada en los países tropicales de América, África y Asia; un tubérculo de fruto de color blanco o amarillo, protegida por una ligera corteza parda o marrón oscuro de aspecto leñoso (Perea, M., 2010).

En el grupo de investigación de Electroquímica Fundamental y Aplicada (GEFA) de la Escuela de Ciencias Químicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, se ha considerado que para evaluar a la *Manihot esculenta* como bioindicador sedentario de contaminación por metales pesados, la mejor metodología es la cuantificación de la expresión de peróxido de hidrógeno por medio de sensores electroquímicos en suspensiones celulares del fruto estresado por estos contaminantes. Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio en movimiento. Estas suspensiones pueden ser permanentes mediante el suministro continuo de nutrientes (Roca, W. M., & Mroginski, L. A., 1991).

En la presente investigación, se utilizó explantes de tubérculos de *Manihot esculenta*, cultivada en la región amazónica del Ecuador, con el objetivo de medir la expresión de peróxido de hidrógeno en suspensiones celulares, cuando son expuestas a niveles citotóxicos de Cd(II). Para el seguimiento de la expresión se empleó la voltamperometría de pulso diferencial como técnica electroquímica, en la cual se mide la corriente en un momento en que la diferencia entre la curva farádica deseada y la corriente de carga de interferencia es grande. Este valor del potencial de base se establece inicialmente en una región donde todas las especies en las que se tiene interés se encuentran electroinactivas. No obstante, a medida que progresa el tren de ciclos, el potencial base se acerca gradualmente y luego pasa los potenciales característicos de esas especies. En estas regiones, se produce una "preelectrólisis" en el potencial base antes de la aplicación del programa de potencial sobre la superficie del sensor electroquímico, electrodo (AB, 2022).

La importancia de generar conocimiento en esta área está en que no existen estudios previos que analicen el desempeño de la *Manihot esculenta* como biomarcador sedentario por cadmio. Adquirir este conocimiento será de gran utilidad, porque a través de este estudio se puede identificar elementos de contaminación en lugares que no pueden medirse con precisión y componentes ambientales que suelen ser fáciles de medir, pero difíciles de explicar.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar a la *Manihot esculenta* como biomarcador sedentario de contaminación ambiental por cadmio mediante la cuantificación de la expresión de peróxido de hidrógeno por medio de un sensor electroquímico en suspensiones celulares de la planta.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Optimizar las mejores condiciones para la obtención de suspensiones celulares de *Manihot esculenta* (Yuca) como explantes por cultivo in vitro.

Cuantificar peróxido de hidrógeno por voltametría de pulso diferencial como señal de la acumulación de cadmio en suspensiones celulares de *Manihot esculenta* expuestas a niveles citotóxicos de este metal.

Valorar a la *Manihot esculenta* como bioindicador sedentario a través de la interpretación de los resultados.

4. MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 REACTIVOS

Agar (Plan Cell Technology), murashige and skoog MS (Phytotechnology ®), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Loba Chemie), 6-Bencilaminopurina (Loba Chemie), fosfato de sodio monohidratado (J.T. Baker ®), fosfato de sodio heptahidratado (J.T. Baker), peróxido de hidrógeno 30 % V/V (Scharlau), alúmina 0,05 µm, ácido sulfúrico (Merck), sulfato de Cadmio (Loba Chemie).

4.1.2 EQUIPOS

Cabina de flujo laminar (Esco), autoclave (Tuttnauer); Microscopio óptico (Olympus BX-41), agitador orbital (WiseSheak); cámara de Neubauer (Marienfeld), galvanostato potenciostato (Metrohm Autolab), software Nova 2.1.5, electrodo de carbono vítreo (GC, por sus siglas en inglés) como electrodo de trabajo, electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y mina de grafito como contraelectrodo.

4.2. MÉTODOS

4.2.1 OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES DEL TUBERCULO DE LA MANIHOT ESCULENTA

4.2.1.1 ETAPA DE CAMPO

Se recogieron cuatro tubérculos de *Manihot esculenta* en el oriente del Ecuador, en la provincia de Morona Santiago en el poblado de Sevilla de Oro. Los tubérculos fueron llevados al laboratorio en una nevera portátil.

4.2.1.2 PROCESOS DE DESINFECCIÓN

Para el proceso de desinfección del tubérculo, se inició por retirar la cascarilla. Posteriormente, se sumergió y agitó por 15 min en una solución de detergente al 2 %, luego se lavó con etanol al 70% con 6 gotas de tween 20 por 5 min. Luego se sumergió en fungicida al 2% (Naturam) por 10 min, se sumergió en HgCl₂ 0,1 % por 2 min y finalmente se enjuagó con agua destilada estéril. Todo el proceso de desinfección se llevó a cabo dentro de la cabina de flujo laminar.

4.2.1.3 INDUCCIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO

Para inducir a callo se utilizó el medio Murashige y Skoog (MS) con macro y micronutrientes, vitaminas y aminoácidos, sacarosa 30 g/L, 6 BAP 2 mg/L, 2,4-D 2 mg/L y 6,5 gramos de agar.

4.2.1.4 SIEMBRA

Se sembró tres explantes por reactor de vidrio en medio MS, luego se almacenó en un lugar con temperatura controlada y en oscuridad.

4.2.1.5 MULTIPLICACIÓN DE CALLO

Para la multiplicación del callo se esperó 30 días hasta la formación de callo embriogénico en el mismo medio de la siembra.

4.2.1.6 OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES

Se introdujo los callos en el medio descrito exceptuando el agar. En 50 mL del medio se colocó aproximadamente un gramo de callo.

4.2.1.7 ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES

Al medio móvil con el callo se lo sometió a agitación orbital constante por el periodo de tres meses hasta cumplir con el correcto establecimiento de las suspensiones celulares.

4.2.1.8 CONTEO CELULAR

El conteo de células se realizó en 2 μ L aproximadamente de muestra de suspensiones celulares, dentro de la cabina de flujo para luego ser introducida en la cámara de Neubauer. Se logró observar las células por medio del microscopio Olympus BX-41.

Para el cálculo de la concentración celular se empleó de la ecuación 1.

$$\text{Concentración celular} = \frac{\text{Número de células} * 10000}{\text{Número de cuadrantes}}, \quad \text{Ecuación 1}$$

4.2.2 MÉTODO ANALÍTICO

4.2.2.1.1. LIMPIEZA DEL ELECTRODO DE TRABAJO

La limpieza del electrodo de GC se realizó mediante un pulido superficial sucesivo durante 5 min, utilizando alúmina de tamaño de partícula de 0,05 μm . Posteriormente se realizó una limpieza electroquímica, empleando voltamperometría cíclica (VC) en ácido sulfúrico 0,5 M en un rango de potencial de -0,7 a 2,0 V por 20 ciclos a una velocidad de barrido de 50 mV/s.

4.2.2.2. ACTIVACIÓN DEL ELECTRODO DE TRABAJO

Previo a la medición de peróxido de hidrógeno, se llevó a cabo la activación del electrodo de GC por medio de VC, en un medio de ácido sulfúrico 0,1 M. La CV se realizó en rangos de potencial de -0,7 a 2,0 V por 10 ciclos a una velocidad de barrido de 50 mV/s.

4.2.2.2.1. OBTENCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se construyó una curva de calibración midiendo por voltametría de pulso diferencial en soluciones estándar de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en solución de buffer de fosfato (PBS) 0,15 M, a pH 7.4; en un rango de concentración de 100 a 1000 μM de H_2O_2 .

4.2.2.2.2. CUANTIFICACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LAS SUSPENSIONES CELULARES

En tubos Falcón se colocaron 15 mL de suspensión celular con cantidades de sulfato de cadmio (CdSO_4) en un rango de 0,0030 a 0,0075 mg, para el respectivo estrés celular.

Para la cuantificación de H_2O_2 se utilizó el método de adición estándar. Se añadieron alícuotas de 2 μL de una solución estándar de H_2O_2 0,1 M por cada medición de un punto de la curva.

Para la cuantificación de H_2O_2 en las suspensiones celulares se utilizó la ecuación de la recta, demostrada ecuación 2 y para la corrección de la concentración la ecuación 3.

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{y-b}{m} \quad , \quad \text{Ecuación 2}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{Real}} = \frac{(\text{Blanco} - [\text{H}_2\text{O}_2]) * V_{\text{total}}}{V_{\text{muestra}}} \quad , \quad \text{Ecuación 3}$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. DESINFECCIÓN DE EXPLANTES DEL TUBÉRCULO DE LA MANIHOT ESCULENTA

La etapa de desinfección de los explantes extraídos del tubérculo de la *Manihot esculenta* fue estableciéndose mediante varios cambios que se realizó a la metodología inicial; y así llegar a un protocolo óptimo. En la Tabla 1, se presenta la variación en la composición de los tratamientos (T) utilizados.

Para la selección del proceso de desinfección más eficiente se consideró el desarrollo en el explante de contaminación bacteriana y contaminación fúngica a las dos semanas de realizado el ensayo de desinfección e inducción del callo. Las imágenes presentadas en la Figura 1, muestran el desarrollo dentro de un medio de cultivo de la contaminación bacteriana y fúngica respectivamente. Ambas se diferencian dependiendo de dos parámetros; el aspecto del crecimiento y la velocidad de crecimiento, las colonias bacterianas suelen caracterizarse por exhibirse de manera viscosa y amarillenta formando un aspecto mucoso o pegajoso y se forman a partir de la primera semana de cultivo. Por el contrario, las colonias fúngicas suelen ser más voluminosas con textura algodonosa, presentando tonalidades verdes o negras su velocidad de formación es generalmente más lenta a comparación de la contaminación bacteriana, suelen aparecer a las dos semanas de cultivarse. Los porcentajes en cada contaminación se detallan en la Tabla 2.

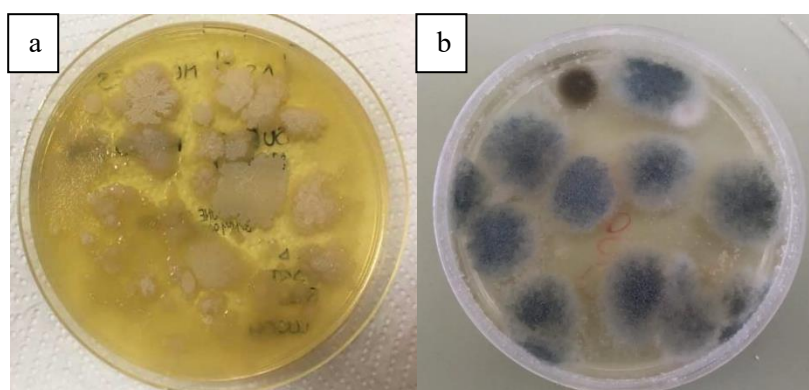


Figura 1 Ejemplos de contaminación a) bacteriana y b) fúngica. *Imágenes obtenidas de: kapitalinteligente biocuriosidades respectivamente.*

Tabla 1. Resultados para la determinación del mejor protocolo de desinfección.

Tratamiento	Detergente (%)	Etanol (%)	Fungicida (%)	HgCl₂ (%)
T1	-	70	-	0,1
T2	2	70	-	0,1
T3	2	70	2	0,1

Tabla 2. Comparación de los resultados para la determinación del mejor protocolo de desinfección.

Variables	Tratamiento		
	T1	T2	T3
% Contaminación bacteriana	8,89	5,56	3,33
% Contaminación fúngica	38,89	25,00	20,00

Mediante la evaluación de los resultados presentados en la Tabla 2, se determinó como método más eficiente para la desinfección es el proceso del T3, siguiendo los siguientes pasos: una vez retirada la cascarilla, tubérculo se sumergió y agitó por 15 min en una solución de detergente al 2 %, seguido de un lavado con etanol al 70 % + 6 gotas de tween 20 por 5 min, para luego sumergirlo en fungicida al 2 % (Naturam) por 10 min y finalmente en HgCl₂ 0,1 % por 2 min y agua destilada estéril. Todo el proceso de desinfección se llevó a cabo dentro de la cabina de flujo laminar. La Figura 2, indica el ejemplo de la muestra considerada viable para la inducción al protocolo de callogénesis, se considera óptima porque no presenta signos de tener algún indicio de tener algún interferente dentro del medio que pueda establecer una posible contaminación.



Figura 2. Muestra obtenida después del tratamiento de desinfección T3.

5.2. PROTOCOLO DE INDUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO

El tiempo para el crecimiento óptimo de callo embriogénico de los explantes del tubérculo de *Manihot esculenta* sembrados en el medio MS fue de 15 días de siembra, los cuales se debieron mantener, estrictamente, en un ambiente protegido de luminosidad. Al cabo de los 15 días de siembra se determinó que el medio en el que se encontraban los explantes era el adecuado, por el efectivo crecimiento del callo que se logró, Figura 1. Posterior a 30 días de haber introducido los explantes se realizó la multiplicación en el medio MS debido a que, se obtuvo un crecimiento óptimo del callo.

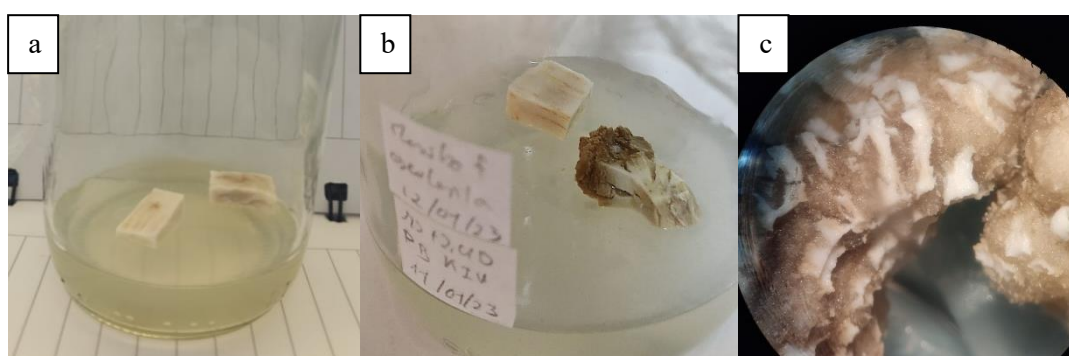


Figura 3. Explantes sembrados del tubérculo de la *Manihot esculenta* (a), callo a los 20 días (b), callo a los 60 días (c).

Para el crecimiento del callo embriogénico, el medio MS fue el adecuado, lo cual se asocia al contenido de macro y micronutrientes, vitaminas y citoquinas que forman el medio favorable para el crecimiento de callo embriogénico en condiciones in vitro. A su vez, la suplementación de este medio con las fitohormonas 2,4-D y 6 BAP fue altamente positiva para el crecimiento y multiplicación del callo. Estas fitohormonas al ser auxinas, están predispuestas a favorecer la formación del callo embriogénico, logrando un crecimiento en el proceso fisiológico y molecular del callo.

5.3. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES

Para las suspensiones celulares se utilizó el medio MS previamente descrito junto con las fitohormonas utilizadas en la etapa de inducción a callogénesis. En doce matraces Erlenmeyer de 100 mL, se colocó aproximadamente 1 g de callo embriogénico en 75 mL del medio. Los doce matraces fueron llevados a agitación orbital por 110 rpm en un lugar oscuro, al cabo de 15 días se notó el pardeamiento de las suspensiones. Tras 30 días de haber obtenido las suspensiones celulares se evidenció que en el 50 % de los matraces se

presentó una coloración blanquecina, indicativo de una posible contaminación bacteriana, Figura 2. Dicha contaminación inhibe el crecimiento de células vegetales dentro del medio debido a que las bacterias utilizan los nutrientes que se encontraban predispuestos para el sustento de las células vegetales, por lo cual, estas suspensiones fueron descartadas para el análisis posterior.

Tres meses después del establecimiento de las suspensiones se evidenció aún más el pardeamiento, Figura 4. La coloración parda dorada se le atribuye al crecimiento paulatino de las células vegetales en suspensión.



Figura 4. Suspensiones celulares de *Manihot esculenta* contaminadas.



Figura 5. Suspensiones celulares de *Manihot esculenta* a los tres meses.

5.4. CONTEO CELULAR

El conteo celular se realiza con el fin de determinar la concentración de células presentes dentro de una muestra previa a un análisis (Gallego Albiach, V., & Pérez Igualada, L. M. 2020). Al tratarse de una suspensión celular que pasó por el tiempo mínimo de establecimiento de tres meses, la cantidad de células presentes en una pequeña alícuota de suspensión (2 μ L), era la adecuada para poder proseguir con el método analítico

Para el conteo celular se tomó 2 μ L de cada suspensión. Se colocó la alícuota de suspensión dentro de la cámara de Neubauer, dicha cámara fue llevada al microscopio óptico para el respectivo conteo, como se indica en la Figura 6. La concentración celular se determinó el conteo de células mediante la ecuación 1:

$$\text{Concentración celular} = \frac{14 * 10000}{4}$$

$$\text{Concentración celular en la suspensión} = 35000$$



Figura 6. Vista con la ayuda de un microscopio en 40x, de la concentración celular presente en la suspensión celular.

5.5. MÉTODO ANALÍTICO

5.5.1. LIMPIEZA DEL ELECTRODO DE TRABAJO

La limpieza del electrodo de trabajo fue necesaria antes y después de cada medición en la celda electroquímica ya que es posible que la superficie del electrodo se inactivara, debido a la formación de películas superficiales generadas por la presencia de material orgánico. La inactivación que puede evidenciarse por la disminución de corriente en la curva Corriente vs. Potencial.

Para la limpieza electroquímica se realizó una voltametría cíclica sobre el electrodo de GC en ácido sulfúrico 0,5 M en una ventana de potencial de -0,700 a 2,000 V (vs. Ag/AgCl), a una velocidad de barrido de 50 mV/s durante 20 ciclos. En la figura 7, se

muestra el voltagrama obtenido. El voltagrama obtenido fue clásico de un GCE (Naseri A & Majidi MR, 2011).

A potenciales mayores a 1,4 V se muestra la región de formación de óxidos superficiales, a un potencial de -0,1 V la reducción de estos óxidos y a potenciales menores a 0,4 V la región de evolución de hidrógeno. A medida que el número de ciclos incrementan las corrientes disminuyeron, lo que indica el cambio superficial del electrodo de trabajo.

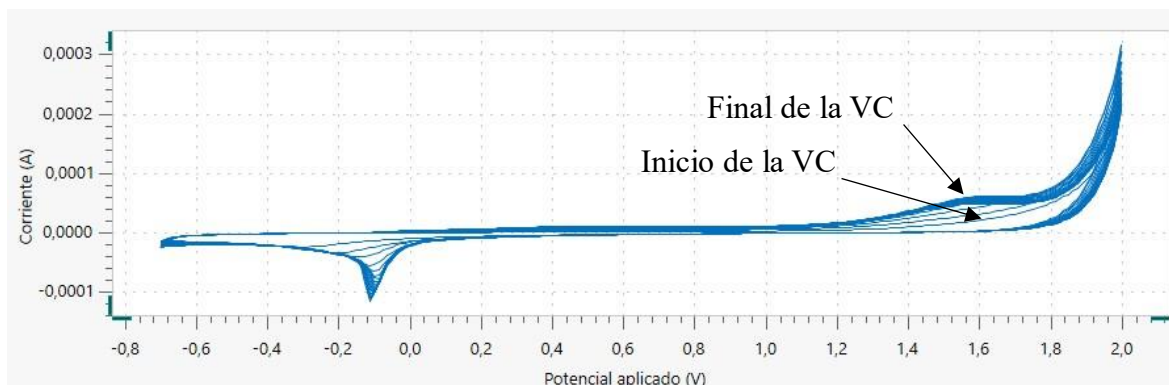


Figura 7. Voltagrama cíclico del electrodo GC en H_2SO_4 0,5 mol/L, velocidad de barrido 50 mV/s durante 20 ciclos para la respectiva limpieza electroquímica.

5.5.2. ACTIVACIÓN DEL ELECTRODO DE TRABAJO

Luego de la limpieza del electrodo de trabajo descrita en la sección anterior, se realizó la activación del electrodo por voltametría cíclica en un rango de -0,700 a 2,000 V (vs. Ag/AgCl), velocidad de barrido de 50 mV/s en H_2SO_4 0,1 M durante 15 ciclos, Figura 8. Como puede observarse en el voltagrama presentado, se lograron picos más definidos y nítidos, y corrientes menores en comparación del voltagrama de limpieza del GCE, lo cual indica que la limpieza superficial del electrodo de GC se logró vía electroquímica (Murugan, Preethika & Nagarajan, Ramila & Sundramoorthy, Ashok & Ganapathy, Dhanraj & Atchudan, Raji & Veeraiyan, Deepak & Khosla, Ajit, 2022).

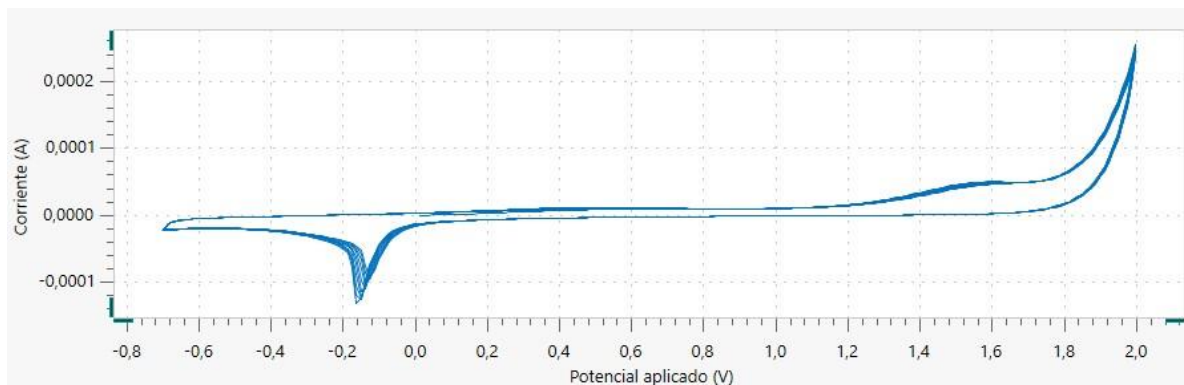


Figura 8. Voltagrama cíclico del electrodo GC en H_2SO_4 0,1 mol/L, velocidad de barrido 50 mV/s durante 15 ciclos para la respectiva activación electroquímica.

5.5.3. CURVA DE CALIBRACIÓN

Para la detección de H_2O_2 , se construyeron curvas de calibración por voltametría de pulso diferencial, en una ventana de potencial de 0,800 a 1,500 V a una velocidad de barrido de 16 mV/s en una solución PBS pH de 7,4. Se trabajó durante tres días, y se construyó una curva de calibración para cada día de análisis. Las Figura 9, 10 y 11 muestran los voltagramas obtenidos para la construcción de cada curva de calibración. La Figura 12, muestra la curva de calibración obtenida luego del análisis de regresión lineal.

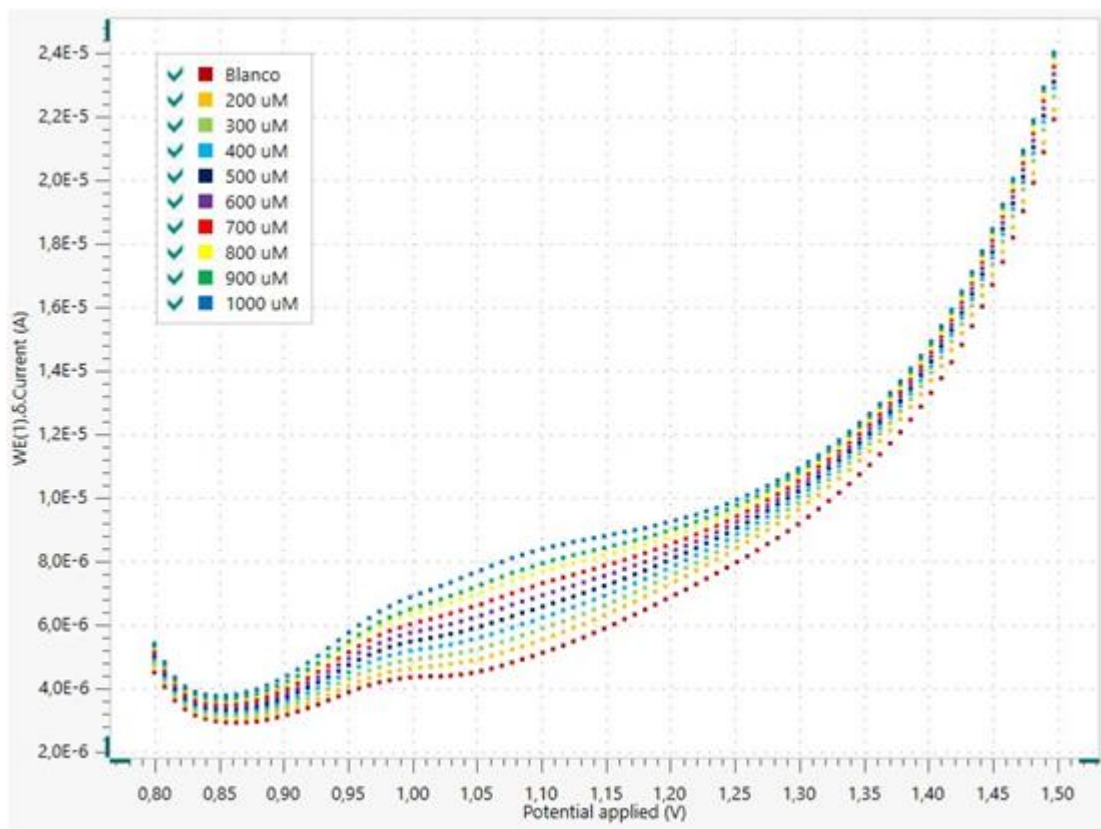


Figura 9. Voltagrama para la curva de calibración para la detección de H_2O_2 sobre el electrodo GC (1ra. réplica).

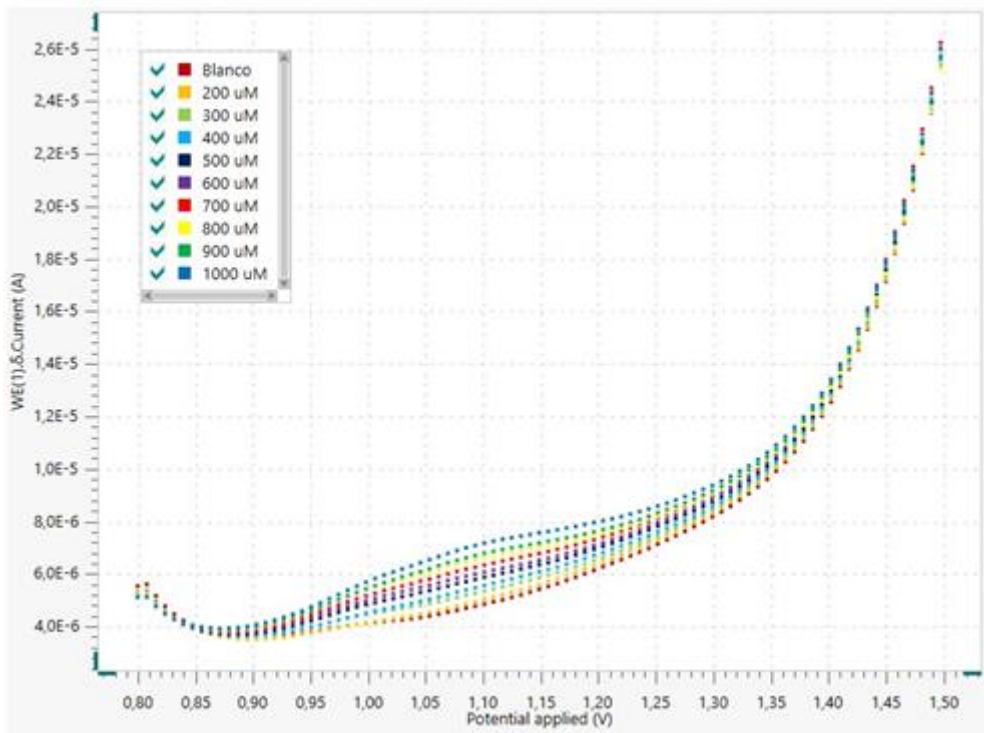


Figura 10. Voltagrama para la curva de calibración para la detección de H₂O₂ sobre el electrodo GC (2da. réplica).

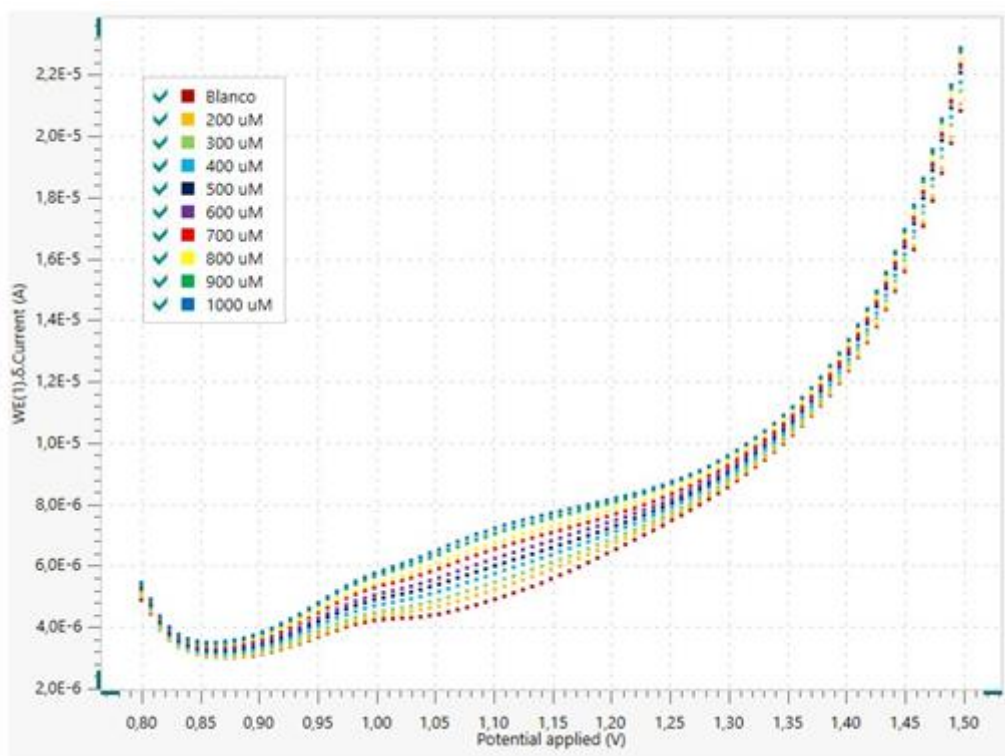


Figura 11. Voltagrama para la curva de calibración para la detección de H₂O₂ sobre el electrodo GC (3era. réplica).

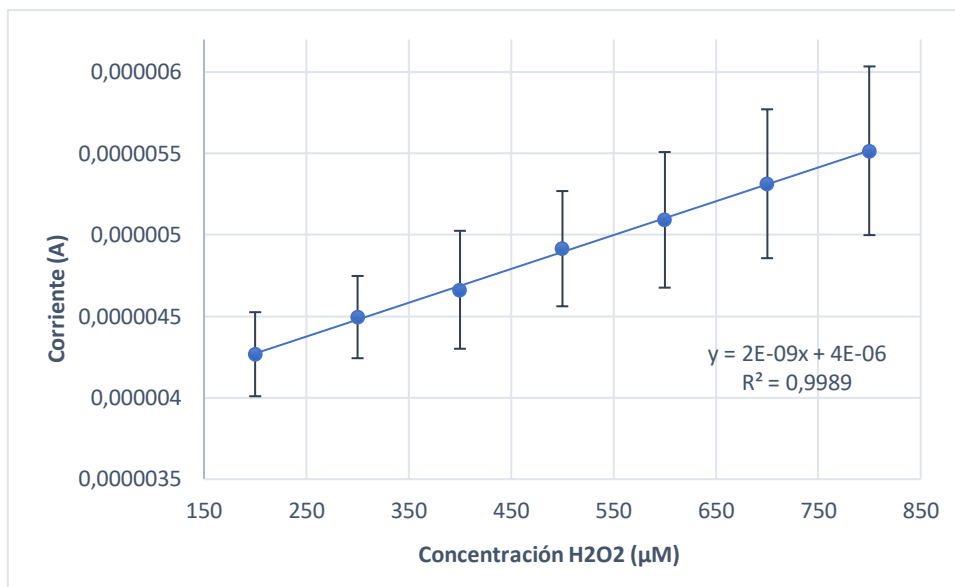


Figura 12. Curva de calibración para la detección de H₂O₂ sobre el electrodo GC obtenida mediante regresión lineal.

Tabla 3. Figuras de mérito obtenidas para la curva de calibración

	Figuras de mérito
Sensibilidad	0,9989
Límite de Cuantificación	362,69 µM ± 3,74E-07
Límite de Detección	36,27 µM ± 3,74E-07
Precisión	3,74031E-07
% R	98,41%

5.5.4. CUANTIFICACIÓN DE H₂O₂ EN LAS SUSPENSIONES CELULARES

Las mediciones voltamétricas para la cuantificación de H₂O₂ fueron realizadas en 15 mL de suspensión celular en la celda electroquímica de 20 mL mediante curvas de calibración de adición estándar.

Se realizaron medidas en la suspensión celular sin estrés (solución control) y estresadas con sulfato de cadmio.

La cuantificación de peróxido de hidrógeno se obtuvo con las ecuaciones 2 y 3 presentadas previamente en la metodología y se presentan en la Tabla 4, las mediciones de cada muestra se realizaron durante tres días. En la Figura 13 se presenta un ejemplo de la voltamperometría de pulso diferencial que se obtienen durante cada medida.

Se repitió el mismo procedimiento para cada concentración en la suspensión celular con sus respectivas variables de tiempo, Figura 14.

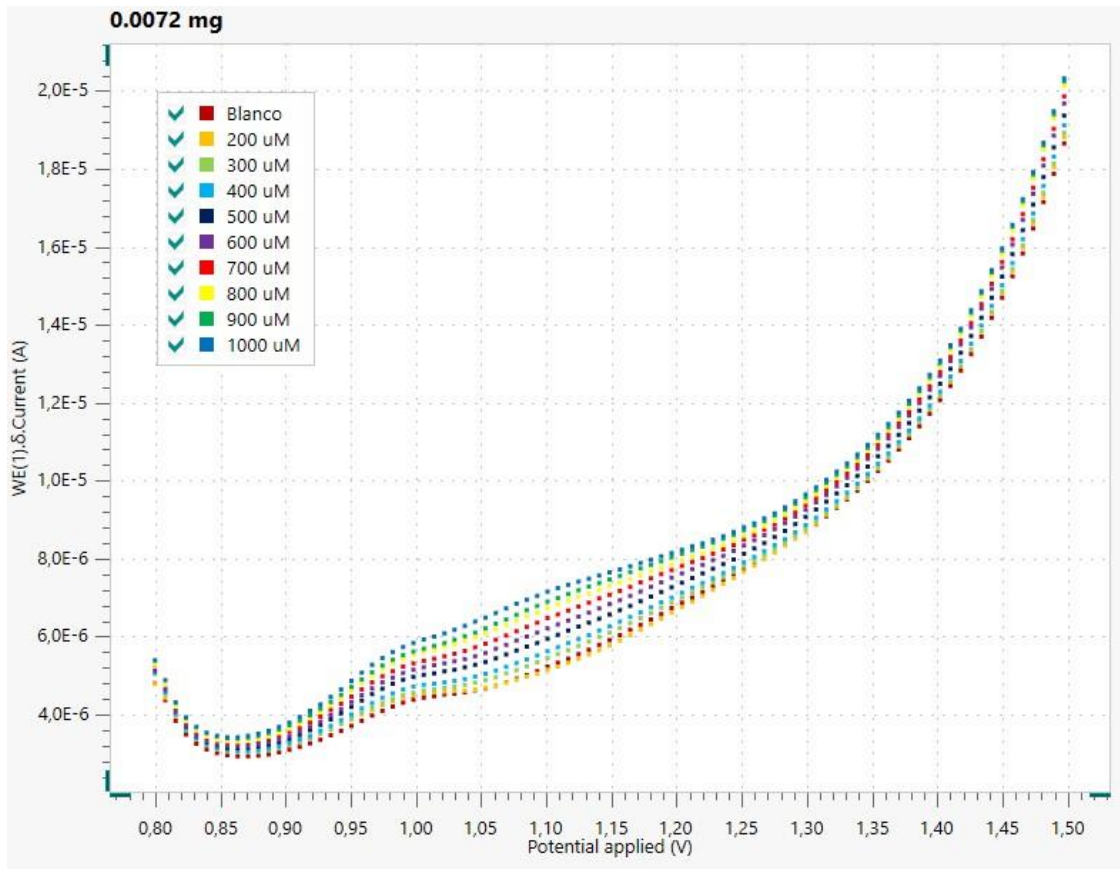


Figura 13. Voltametría de pulso diferencial de muestra en 0,0075 mg de sulfato de cadmio a las 72h.

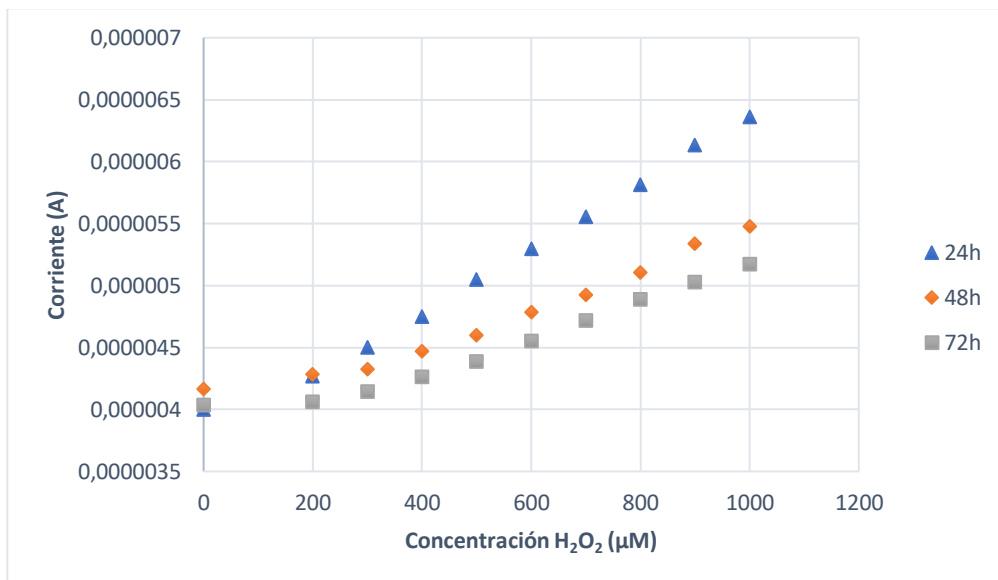


Figura 14 Curva de calibración para la detección de H_2O_2 al cabo de 24, 48 y 72 horas en muestras con 0,0030 mg de sulfato de cadmio.

Una vez obtenidas las curvas se procedió a calcular el valor inicial del peróxido de hidrógeno en cada muestra, Tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones iniciales de H₂O₂ en muestras de suspensiones celulares con las respectivas concentraciones de CdSO₄ a diferentes tiempos de exposición

Tiempo de exposición [h]	Miligramos de CdSO ₄				
	0,0000 mg	0,0030 mg	0,0045 mg	0,0060 mg	0,0075 mg
	H ₂ O ₂ [μM]				
24	237,8	30,76	382,56	81,04	688,84
48	443,72	48,32	285,16	114,56	127,28
72	380,96	226,2	43,92	618,4	340,08

La Figura 15 muestra la expresión de H₂O₂ en la suspensión celular estresadas con iones Cd(II). La solución control, sin estrés con iones Cd(II) a diferentes concentraciones, indica la concentración de H₂O₂ que mantiene la célula vegetal en equilibrio, cualquier modificación de esta concentración en presencia de iones Cd(II) indica el “estallido oxidativo (EO)” en la célula. En otras palabras, en condiciones normales la concentración de H₂O₂ en la planta se mantiene en equilibrio, concentración a un valor constante mientras la planta no sea sometida al efecto del contaminante, Figura 16. Cuando la planta se somete a estrés por Cd (II), se produjo un desequilibrio que dio como resultado un aumento en la concentración de H₂O₂ en el sistema celular, desequilibrio que se monitoreó por el electrodo con un aumento en la corriente, Figura 13. La respuesta en corriente en presencia de Cd(II) es causada por la liberación rápida de H₂O₂, lo que se denomina EO, el cual está representado en la curva con cada valor máximo de corriente. Los valores mínimos de corriente corresponden al valor de concentración de H₂O₂ al cual es capaz de volver a reestablecer la célula por su mecanismo de defensa.

En todas las tendencias obtenidas para la curva de la Figura 15, la exposición con cadmio dio como resultado un aumento de la concentración de H₂O₂. Este comportamiento descarta la posibilidad de que las células del tubérculo de la Manihot esculenta sufran apoptosis en estas condiciones de contaminación y tiempos de exposición, debido a que antes de la muerte celular, se produce una cantidad máxima de H₂O₂ debido al estrés máximo causado por las células que interactuaron con el contaminante.

Por otro lado, en la Figura 16, se describe la variación de la concentración de H₂O₂ en función de la concentración de iones Cd(II) usada para el respectivo estrés. Este comportamiento describe que a medida que transcurren los días la capacidad de acumulación

de la planta va disminuyendo, es por ello que al primer día de exposición al cadmio se observa los mayores valores de producción de H_2O_2 . De acuerdo a la Figura 16, el primer EO se genera alrededor de las 24 y 48h donde la cantidad $CdSO_4$ fue de 0,0045 mg, seguido por el segundo estallido a las 72h donde la cantidad fue de 0,0060 mg y finalmente el tercer estallido ocurrió alrededor de las 24h donde la cantidad fue de 0,0075 mg (Xu Q, Wei F, Wang Z, Yang Q, Zhao YD, Chen H., 2010).

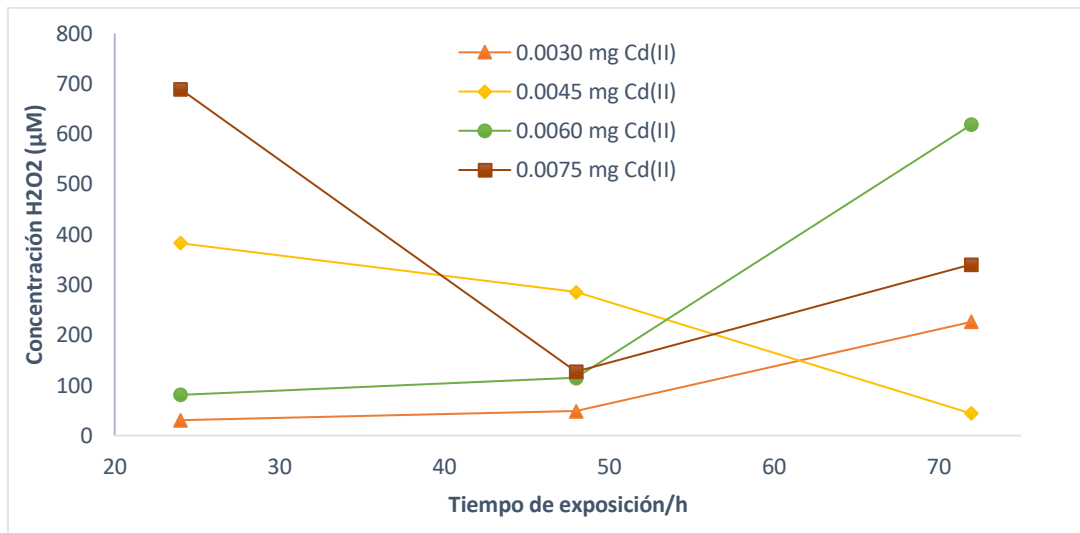


Figura 15. Expresión de peróxido de hidrógeno en la suspensión celular vs. tiempo de exposición a $CdSO_4$.

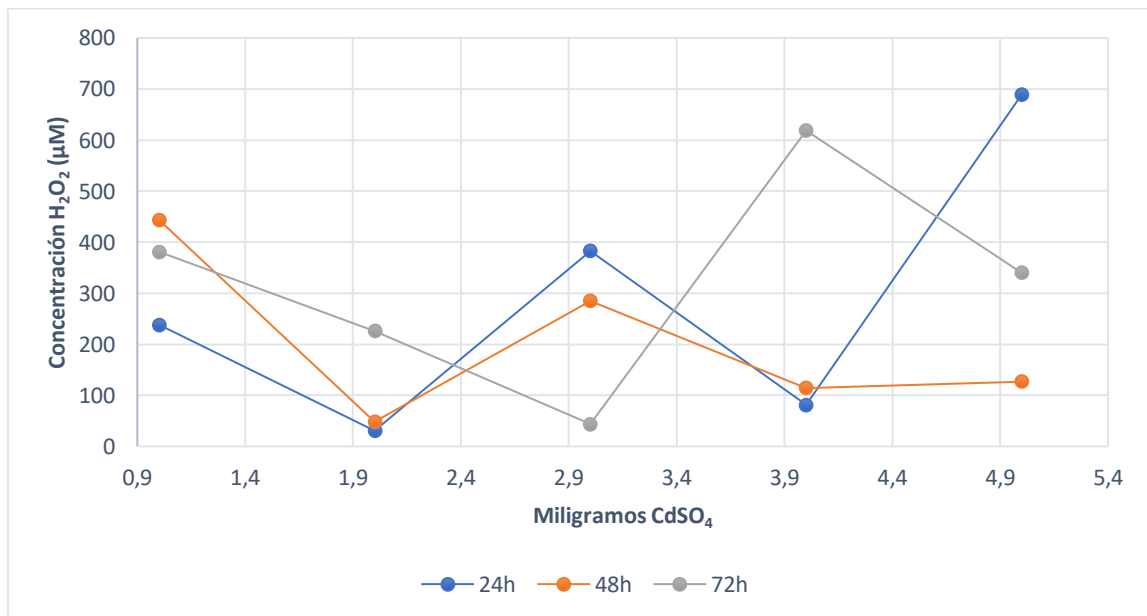


Figura 16. Expresión de peróxido de hidrógeno en la suspensión celular vs. miligramos de $CdSO_4$.

6. CONCLUSIONES

Se logró la optimización del método experimental para la cuantificación de peróxido de hidrógeno en suspensiones celulares de tubérculo de *Manihot esculenta*. La determinación de peróxido de hidrógeno por voltamperometría de pulso diferencial utilizando GC como electrodo de trabajo demostró ser una metodología adecuada, ofreciendo un límite de cuantificación y detección de 326,69 y 36,26 μM , respectivamente. Los resultados indican que, la *Manihot esculenta* es buen candidato como biomarcador sedentario. Se logró cuantificar cómo varía la concentración de peróxido de hidrógeno cuando se aumenta la concentración de iones Cd(II) en las suspensiones celulares, demostrando de esta manera, que las células de tubérculo de *Manihot esculenta* poseen mecanismos de defensa funcionales que pueden utilizarse como indicadores de contaminación ambiental por este tipo de metal.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB. (2022). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications 3e: Fundamentals and Applications* (3rd ed.). Wiley-Blackwell.

Gallego Albiach, V., & Pérez Igualada, L. M. (2020). *Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento*.

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/169378/GallegoPerez%20-%20Estimacion%20de%20la%20Densidad%20Celular.pdf?sequence=1>

Inteligente, K. (2020). *Cultivo de microorganismos*. Kapital Inteligente.

<https://www.kapitalinteligente.es/cultivo-de-microorganismos/>

Juan, Q. A., Montiel León, M., Giaan, D. R., Romero, A. Á., María, D., & Silva, T. R. (2013, Enero). *Desarrollo de un método de análisis voltamperométrico para la cuantificación de acetaminofén empleando electrodos modificados con polipirrol*. Edu.Mx:8080. Recuperado el 14 de octubre, del 2022 de:

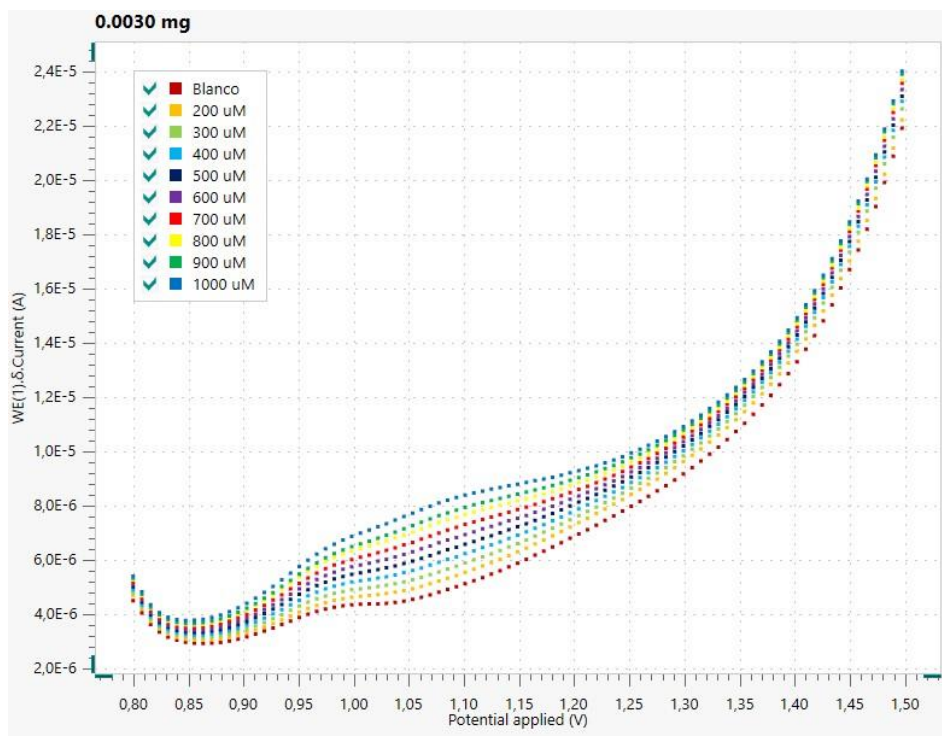
<http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/1884/Tesis%20-UAEH-QUIMICA-DESARROLLO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Quintero, S. M. (2019). Análisis de los microorganismos de nuestro entorno. *Biocuriosidades*. <https://www.biocuriosidades.com/recursos-docentes/analisis-de-los-microorganismos-de-nuestro-entorno/>
- León, E. A. R., Carballo, M. M., Sánchez, B. P., & del Socorro Fernández, M. (s.f.). Biomonitores: desenmascarando a los tóxicos - Volumen XXIII - Número 3 - Revista: La ciencia y el hombre - Universidad Veracruzana. *La Ciencia y el Hombre*. Recuperado el 14 de octubre, del 2022 de: <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol23num3/articulos/biomonitores/index.html>
- Murugan, Preethika & Nagarajan, Ramila & Sundramoorthy, Ashok & Ganapathy, Dhanraj & Atchudan, Raji & Veeraiyan, Deepak & Khosla, Ajit. (2022). Electrochemical Detection of H₂O₂ Using an Activated Glassy Carbon Electrode. *ECS Sensors Plus*. 1. 034401. 10.1149/2754-2726/ac7c78.
- Naseri A, & Majidi MR. (2011). Cheap and easy modification of glassy carbon electrode for voltammetric determination of dopamine in the presence of ascorbic acid.
- Perea, M. (2010). *Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro*. Edu.Co. Recuperado el 14 de octubre, del 2022 de [http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad de Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas Libros/Biologia/Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro/Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro.pdf](http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro.pdf)
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991, Mayo). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamento y aplicaciones*. Cgiar.org. Recuperado el 14 de octubre, del 2022 de [http://ciat-library.cgiar.org/Articulos Ciat/biblioteca/Cultivo de tejidos en la agricultura.pdf](http://ciat-library.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf)
- Toro-Restrepo, B. (2011). Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Luna Azul*, (32), 121-127. Recuperado el 14 de octubre, del

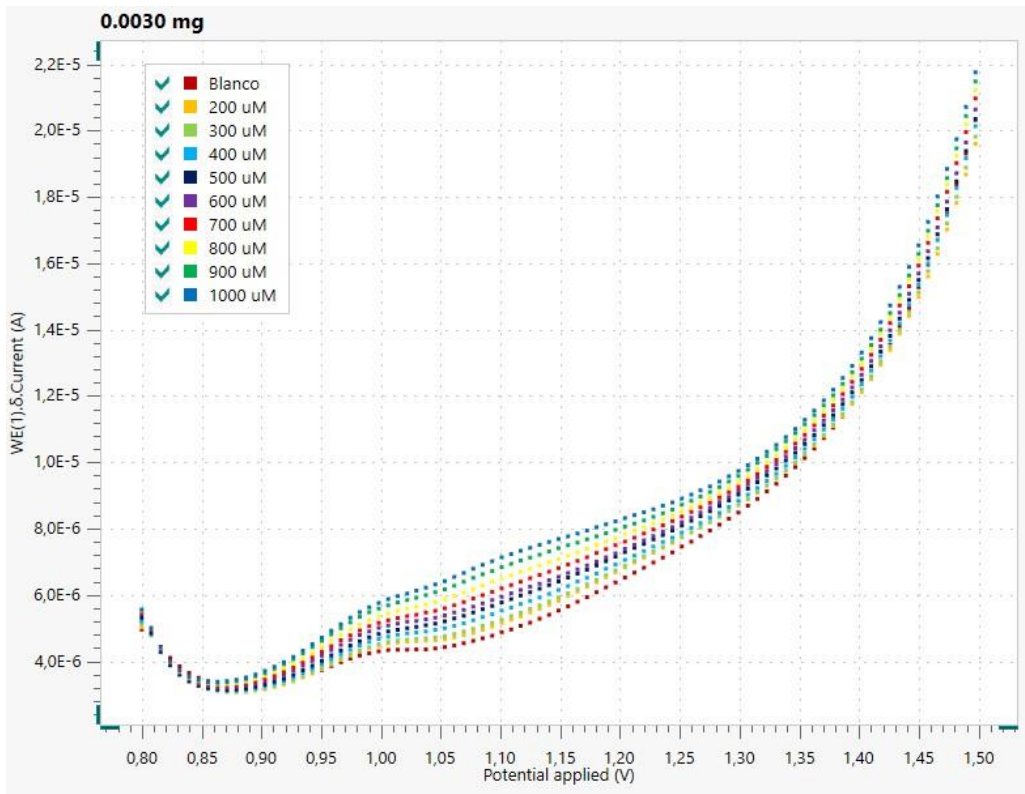
2022 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-24742011000100011&lng=en&tlng=es.

Xu Q, Wei F, Wang Z, Yang Q, Zhao YD, Chen H. In vivo monitor oxidative burst induced by Cd²⁺ stress for the oilseed rape (*Brassica napus* L.) based on electrochemical microbiosensor. *Phytochemical*. 2010 Mar-Apr;21(2):192-6. doi: 10.1002/pca.1178. PMID: 19908213.

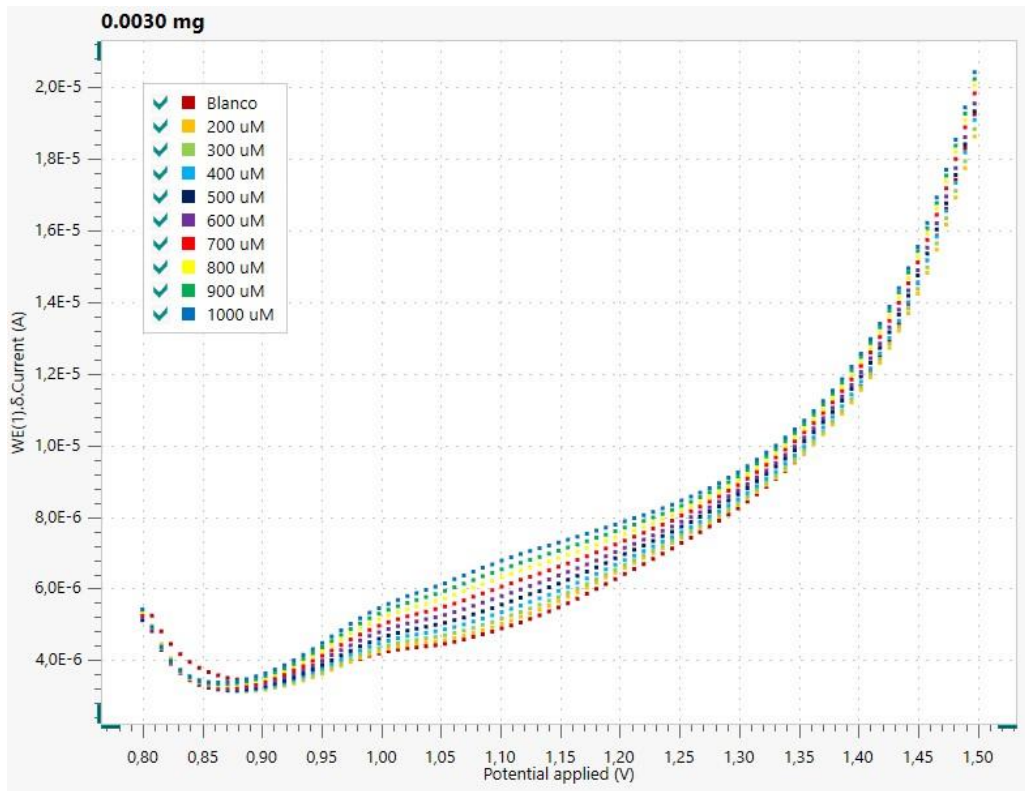
8. ANEXOS



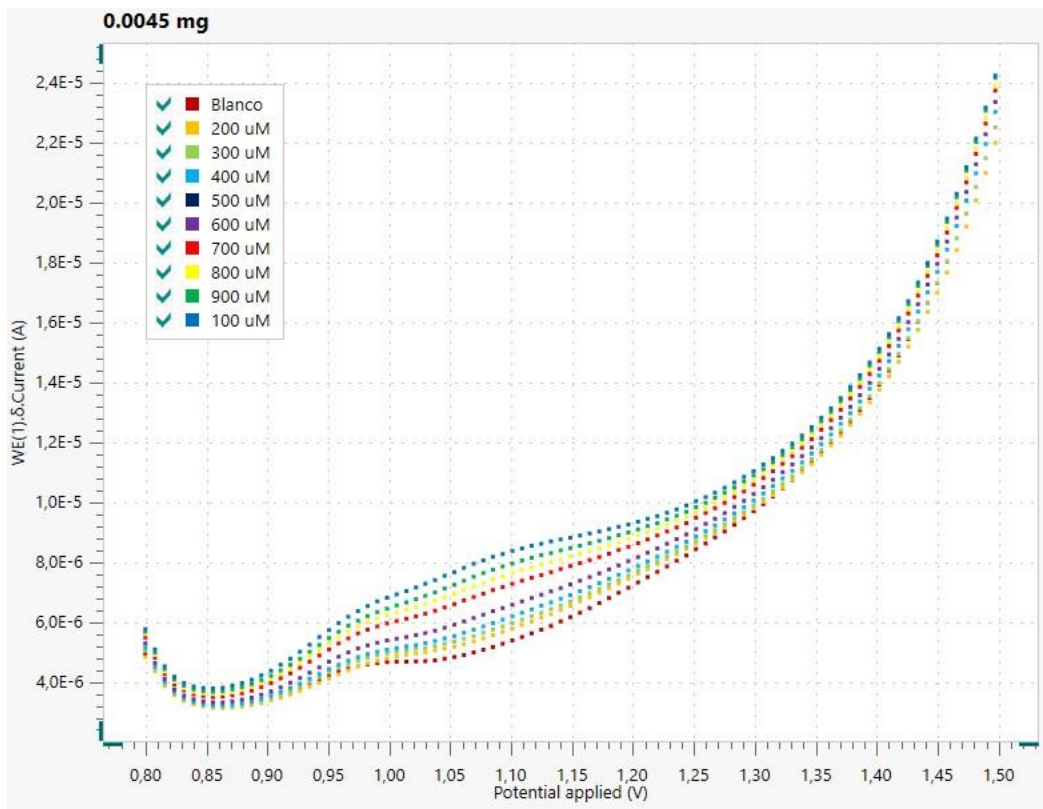
Anexo 1. Voltametría de 0,0030 mg a 24 horas de exposición.



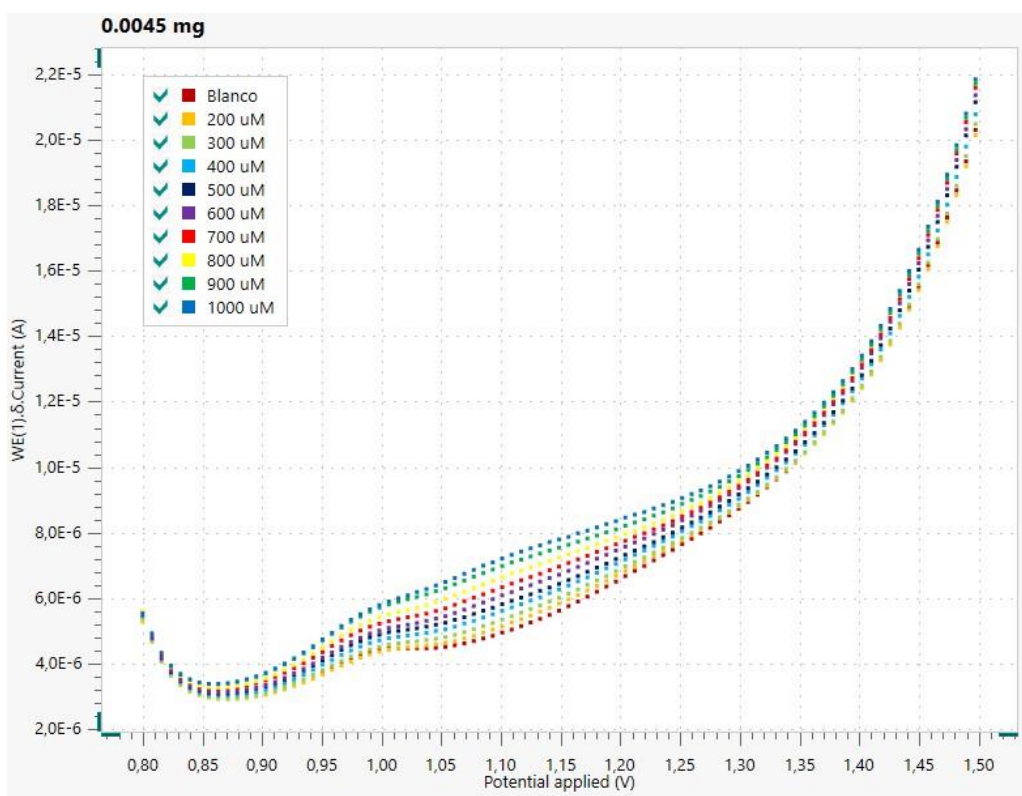
Anexo 2. Voltametría de 0,0030 mg a 48 horas de exposición.



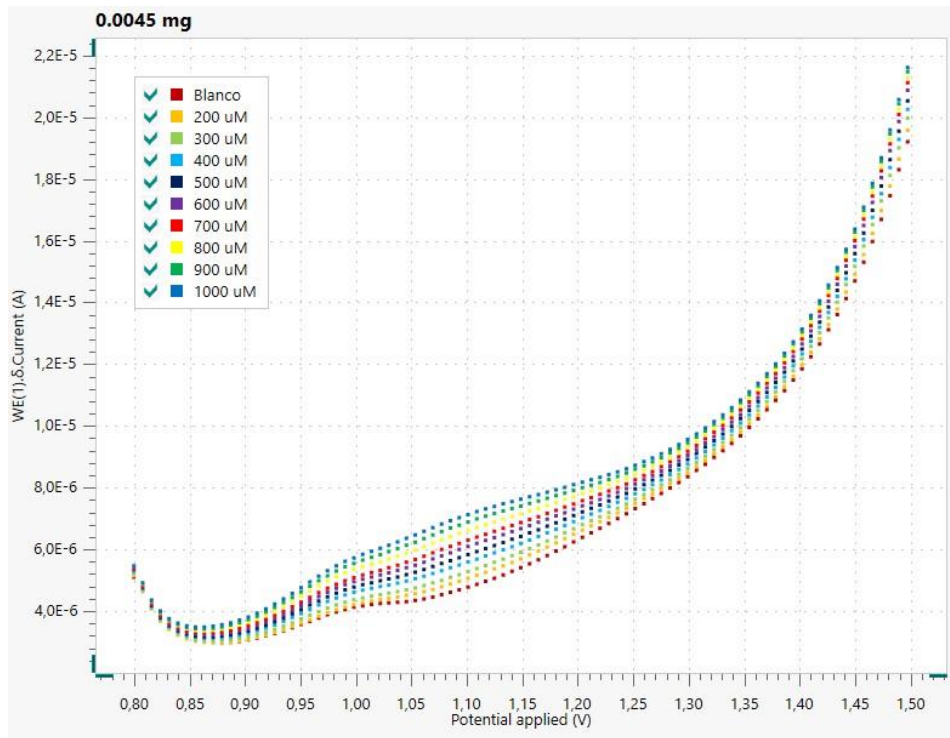
Anexo 3. Voltametría a de 0,0030 mg a 72 horas de exposición.



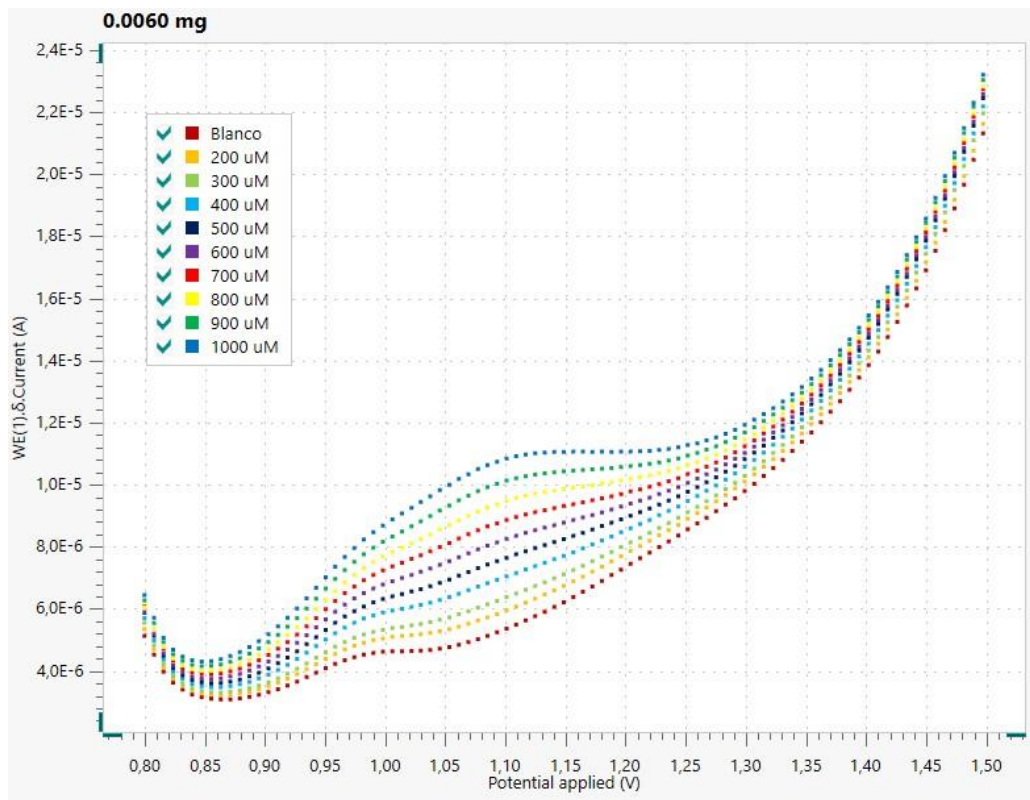
Anexo 4. Voltametría de 0,0045 mg a 24 horas de exposición.



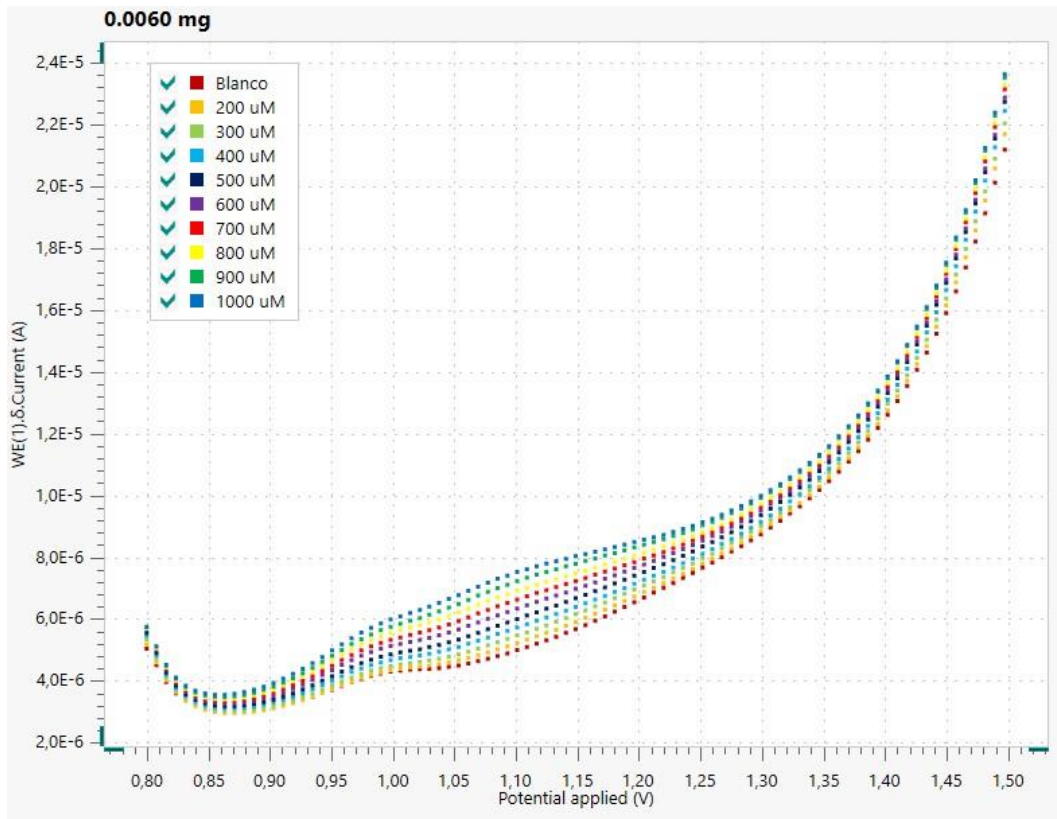
Anexo 5. Voltametría de 0,0045 mg a 48 horas de exposición.



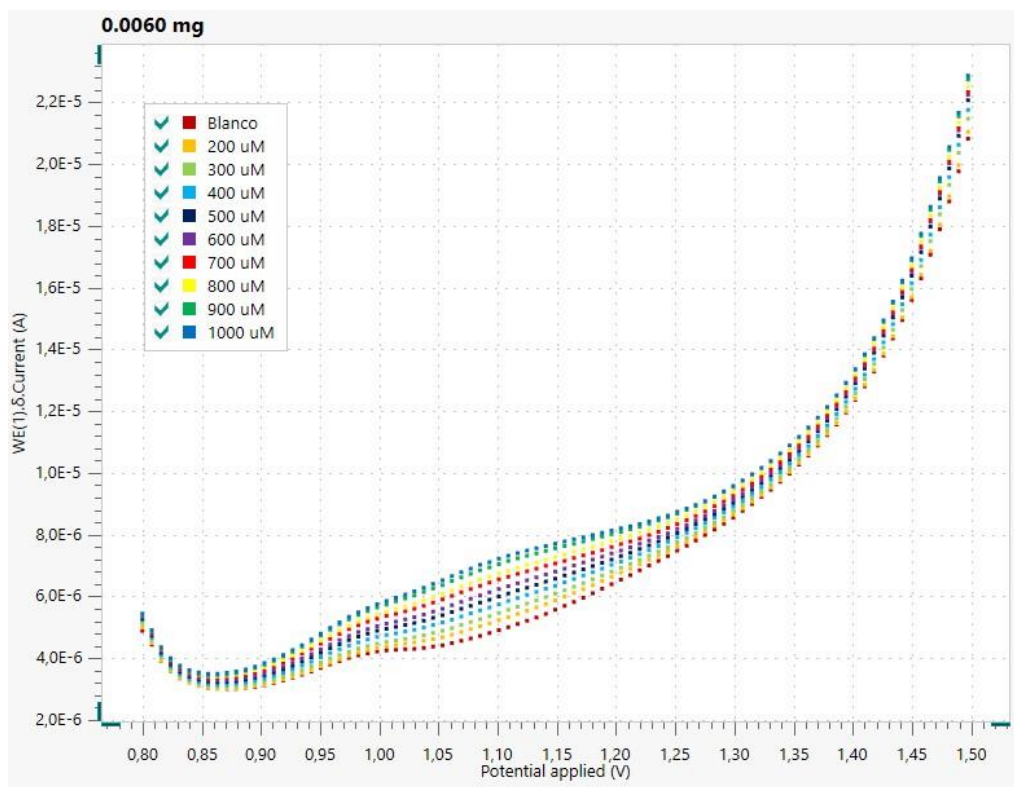
Anexo 6 Voltametría de 0,0045 mg a 72 horas de exposición.



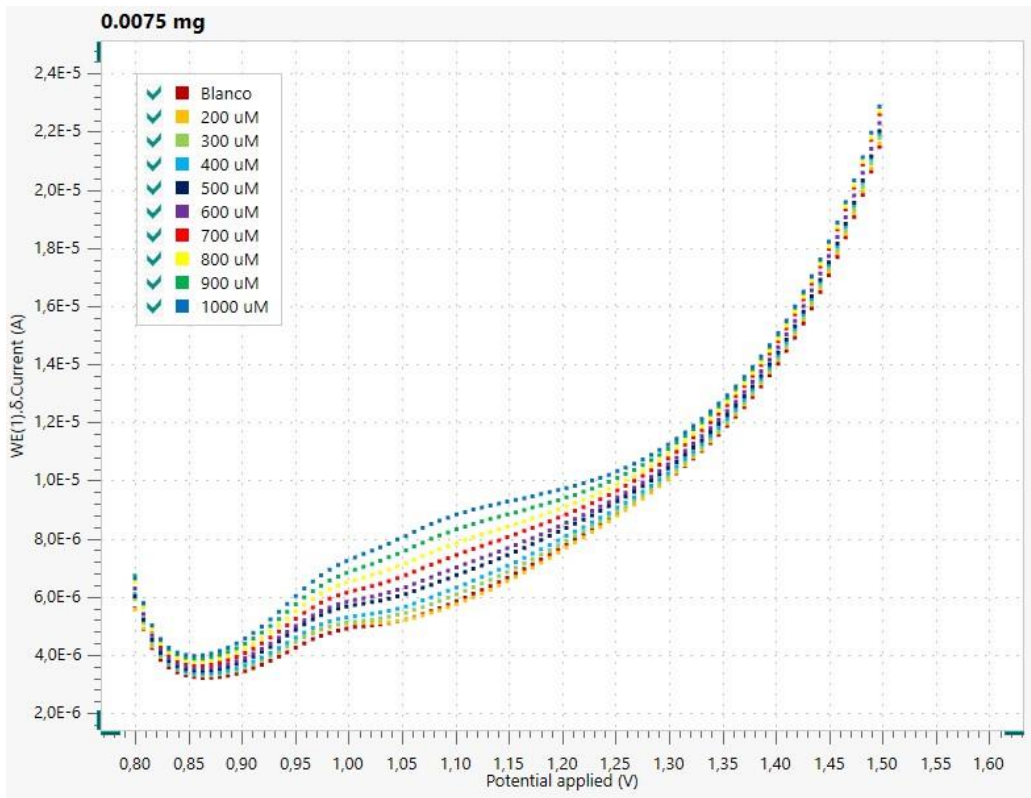
Anexo 7. Voltametría de 0,0060 mg a 24 horas de exposición.



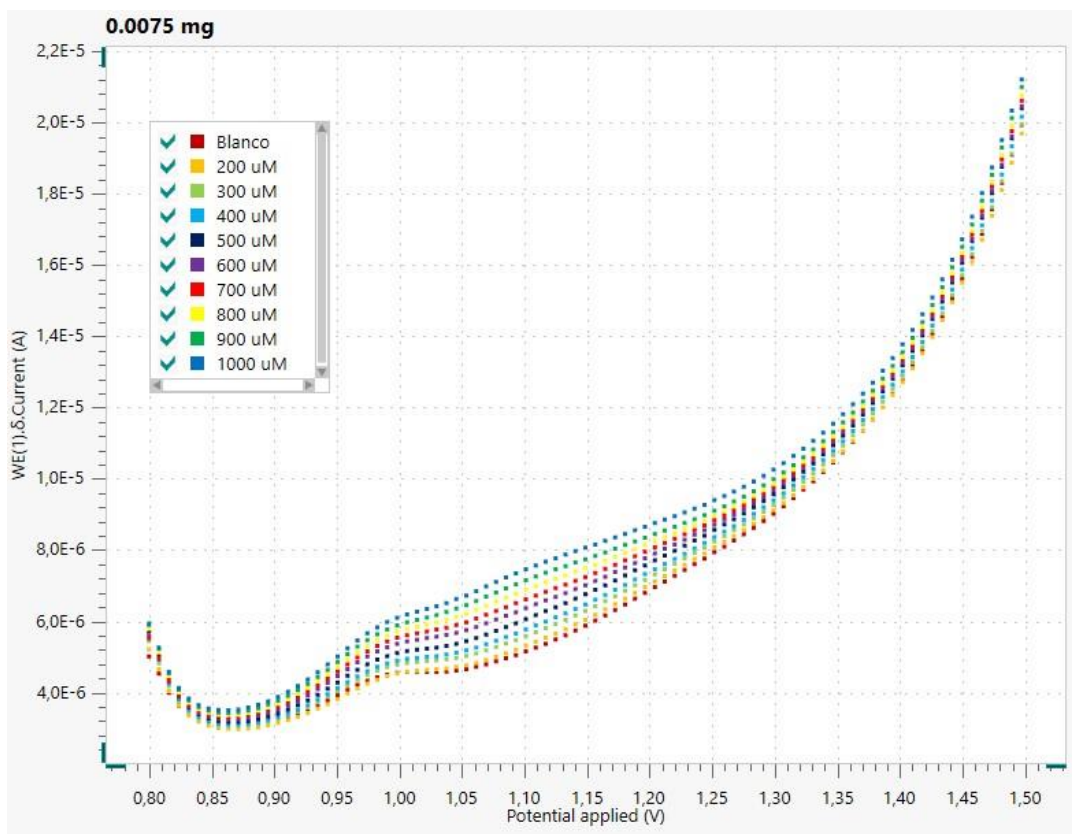
Anexo 8 Voltametría de 0,0060 mg a 48 horas de exposición.



Anexo 9 Voltametría de 0,0060 mg a 72 horas de exposición.



Anexo 10 Voltametría de 0,0075 mg a 24 horas de exposición.



Anexo 11 Voltametría de 0,0075 mg a 48 horas de exposición.

Para el cálculo de la concentración de H_2O_2 en la suspensión sin estresar:

$$[H_2O_2] = \frac{4,27551 \times 10^{-06} - 4,133 \times 10^{-06}}{2,397 \times 10^{-09}}$$

$$[H_2O_2] = 59,45 \mu M$$

$$[H_2O_2]_{Blanco} = \frac{59,45 \mu M * 20 mL}{5 mL}$$

$$[H_2O_2]_{Blanco} = 237,8 \mu M$$

Para el cálculo de la concentración de H_2O_2 en la suspensión estresada:

$$[H_2O_2] = \frac{3,9978 \times 10^{-06} - 3,831 \times 10^{-06}}{2,48414 \times 10^{-09}}$$

$$[H_2O_2] = 67,14 \mu M - [H_2O_2]_{Blanco}$$

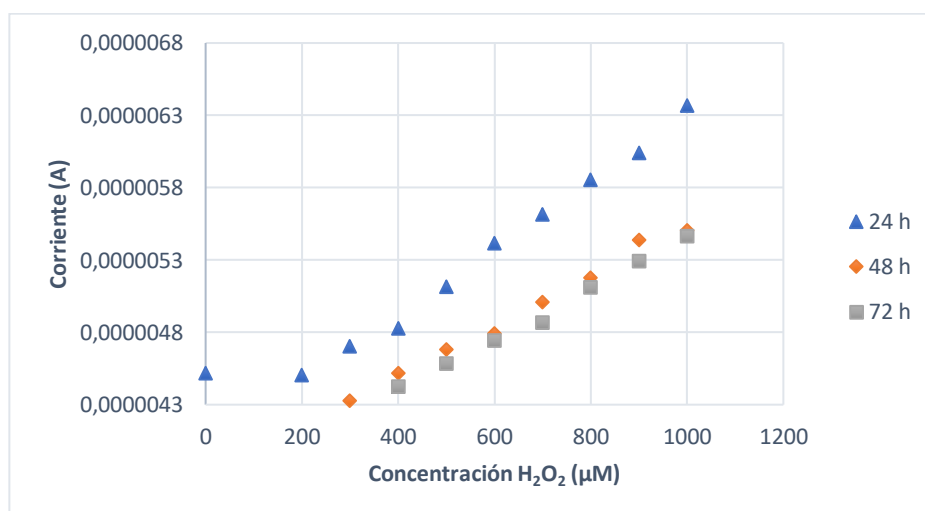
$$[H_2O_2] = 67,14 \mu M - 59,45 \mu M$$

$$[H_2O_2] = 7,69 \mu M$$

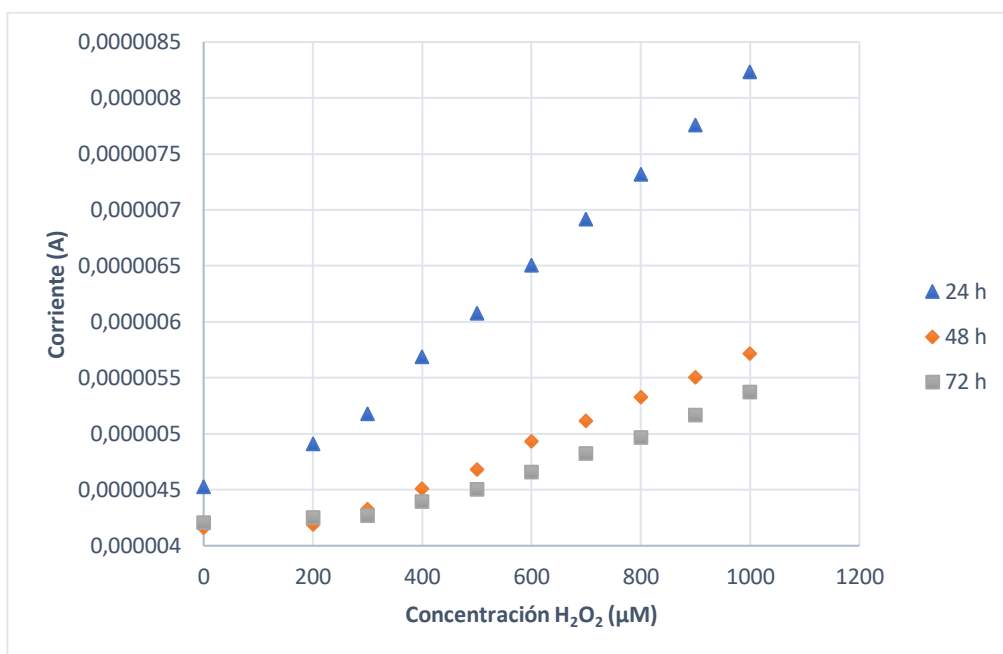
$$[H_2O_2]_{Real} = \frac{7,69 \mu M * 20 mL}{5 mL}$$

$$[H_2O_2]_{Real} = 30,76 \mu M$$

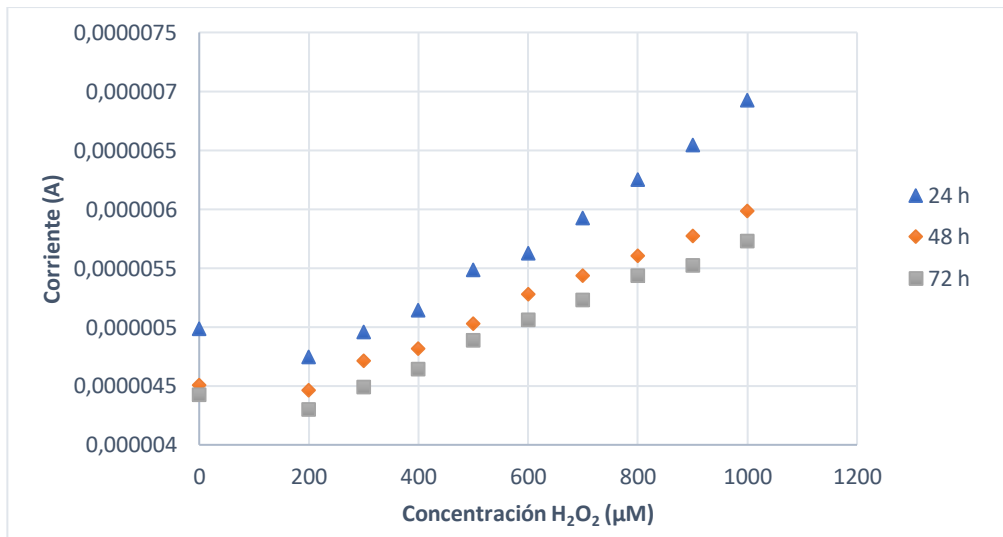
Anexo 12 Cálculo para cuantificar la concentración de H_2O_2 en μM .



Anexo 13 Curva de calibración para la detección de H_2O_2 al cabo de 24, 48 y 72 horas en muestras con 0,0045 mg de sulfato de cadmio.



Anexo 14 Curva de calibración para la detección de H₂O₂ al cabo de 24, 48 y 72 horas en muestras con 0,0060 mg de sulfato de cadmio.



Anexo 15 Curva de calibración para la detección de H₂O₂ al cabo de 24, 48 y 72 horas en muestras con 0,0075 mg de sulfato de cadmio.

Resumen								
Estadísticas de la regresión								
Coefficiente	0,99880315							
Coefficiente	0,99760774							
R^2 ajusta	0,99726599							
Error típico	2,8524E-08							
Observaciones	9							
ANÁLISIS DE VARIANZA								
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Medio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>			
Regresión	1	2,375E-12	2,375E-12	2919,106199	1,95058E-10			
Residuos	7	5,6954E-15	8,1362E-16					
Total	8	2,3807E-12						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	3,8921E-06	2,4054E-08	161,808011	9,08686E-14	3,83519E-06	3,9489E-06	3,8352E-06	3,9489E-06
Variable X	1,9896E-09	3,6824E-11	54,0287534	1,95058E-10	1,9025E-09	2,0767E-09	1,9025E-09	2,0767E-09
					LD	LC		
					36,2694245	362,694245		
Análisis de los residuales								
<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para</i>	<i>Residuos</i>						
1	4,29E-06	-2,2606E-08						
2	4,4889E-06	6,3013E-09						
3	4,6879E-06	-2,481E-08						
4	4,8869E-06	2,8511E-08						
5	5,0858E-06	6,5556E-09						
6	5,2848E-06	2,9359E-08						
7	5,4837E-06	3,2835E-08						
8	5,6827E-06	-3,6932E-08						
9	5,8816E-06	-1,9215E-08						

Anexo 16 Análisis ANOVA para la obtención de la curva de calibración ajustada.

Porcentaje de recuperación del método:

$$\%R = \frac{C_f - C_{sf}}{C} \times 100$$

Donde:

Cf: concentración del analito medido en la muestra fortificada

Csf: concentración del analito medido en la muestra sin fortificar

C: concentración del analito adicionada

$$\%R = \frac{546,28 \mu M - 54,24 \mu M}{500 \mu M}$$

$$\%R = \mathbf{98,41 \%}$$

Anexo 17 Cálculo para evaluar el porcentaje de recuperación del método.