

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Nombre del estudiante: Juan Diego Sampedro Ortiz

Nombre del director de la disertación: Dra. Lenys Mercedes Fernández Martínez

Título de disertación: Optimización de un método por cronoamperometría para la cuantificación de peróxido de hidrógeno en suspensiones celulares de semillas de *Theobroma Cacao* estresadas con iones Cd(II)

Área en la que inscribe la investigación: Química Analítica

Certifico que la Disertación de Química Analítica del Sr. Juan Diego Sampedro Ortiz -ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra.: Lenys Mercedes Fernández Martínez

Directora de la Disertación

Quito, de 2022

DEDICATORIA

Para Iván, Margarita, Anapaula y Bruno, mi razón de vivir.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, el sustento de mi vida.

A mi papá, mamá y hermana, por siempre creer en mí y por estar para mí en todo momento.

A mi familia, por el apoyo y las palabras de ánimo, por motivarme a terminar esta etapa de gran importancia en mi vida.

A mis amigos, por estar conmigo en todo momento, por hacer más felices estos años y por estar ahí en las buenas y en las malas.

A mis profesores, por su esfuerzo para mi aprendizaje académico, laboral y personal.

A mi directora de tesis, por su compañía, consejos y ayuda durante toda la carrera y sobre todo en este trabajo de titulación

Al Laboratorio de Electroquímica de la PUCE por darme la oportunidad de realizar este trabajo experimental para así generar nuevos conocimientos y experiencias.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN | 8 |
| 2. ABSTRACT | 9 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 10 |
| 4. OBJETIVOS | 12 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 12 |
| 5.1. Materiales | 12 |
| 5.2. Métodos | 13 |
| 5.2.1 Obtención suspensiones celulares | 13 |
| 5.2.2. Método analítico | 13 |
| 5.2.2.1. Limpieza del electrodo de Pt..... | 13 |
| 5.2.2.2. Selección de potencial de trabajo | 13 |
| 5.2.2.3. Activación del electrodo de Pt | 13 |
| 5.2.2.4. Obtención de la curva de calibración..... | 14 |
| 5.2.2.5. Cuantificación del peróxido de hidrógeno en suspensiones celulares | 14 |
| 6. Resultados y Discusión | 14 |
| 7. CONCLUSIONES | 23 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 23 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Suspensiones celulares de Theobroma cacao | 15 |
| Figura 2. Voltamperograma obtenido para la limpieza electroquímica del electrodo de Pt en H ₂ SO ₄ 0.5M mediante voltamperometría cíclica a una velocidad de barrido 100 mV/s..... | 16 |
| Figura 3. Voltametría cíclica utilizada para la selección del potencial de trabajo, a una velocidad de barrido de 50 mV/s añadiendo 0.05mM H ₂ O ₂ | 17 |
| Figura 4. Voltametría cíclica de las activaciones del electrodo de trabajo Pt con buffer PBS pH 5.7 a 50 y 100 mV/s..... | 18 |
| Figura 5. Curva de calibración para la detección de H ₂ O ₂ sobre un electrodo de Pt.... | 19 |
| Figura 6. Curva de calibración para la detección de H ₂ O ₂ sobre un electrodo de Pt sin añadir Cd ⁺² | 21 |
| Figura 7. Relación del tiempo de exposición con la concentración de peróxido de hidrógeno..... | 22 |

Lista de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Concentraciones de H ₂ O ₂ en suspensiones celulares estresadas con Cd ²⁺ a 5 μM a distintos tiempos de exposición | 20 |
| Tabla 2. Concentraciones de H ₂ O ₂ en suspensiones celulares estresadas con Cd ²⁺ a 20 μM a distintos tiempos de exposición | 20 |
| Tabla 3. Concentraciones de H ₂ O ₂ en suspensiones celulares estresadas con Cd ²⁺ a 50 μM a distintos tiempos de exposición | 20 |
| Tabla 4. Concentraciones de H ₂ O ₂ en suspensiones celulares estresadas con Cd ²⁺ a 100 μM a distintos tiempos de exposición..... | 21 |

1. RESUMEN

En el presente estudio se realizó la optimización de un método por cronoamperometría para la cuantificación de peróxido de hidrógeno en suspensiones celulares de semillas de *Theobroma cacao* estresadas con iones Cd(II). Se cuantificó la concentración de peróxido de hidrógeno, que determina el estallido oxidativo del proceso de estrés producido por el Cd(II), en las suspensiones celulares de semillas de *Theobroma cacao*. Las muestras estresadas con Cd(II) fueron medidas en concentraciones de 5, 10, 20, 50 y 100 μM , a tiempos de exposición de 24, 48, 72, 100, 120 horas. Los resultados indican que a medida que pasa el tiempo y según la concentración de Cd(II), la producción de peróxido aumenta. El tiempo óptimo de trabajo en la detección de peróxido son 72 horas.

Los resultados obtenidos muestran que las suspensiones celulares de *Theobroma cacao*, tienen mecanismos de defensa eficaces, ya que indican en el momento que están siendo contaminados por Cd(II).

2. ABSTRACT

In the present study, the optimization of a chronoamperometry method for the quantification of hydrogen peroxide in cell suspensions of *Theobroma cacao* seeds stressed with Cd(II) ions was carried out. The concentration of hydrogen peroxide, which determines the oxidative burst of the stress process produced by Cd(II), was quantified in the cell suspensions of *Theobroma cacao* seeds. The samples stressed with Cd(II) were measured at concentrations of 5, 10, 20, 50 and 100 μM , at exposure times of 24, 48, 72, 100, 120 hours. The results indicate that as time passes and depending on the concentration of Cd(II), the production of peroxide increases. The optimum working time in peroxide detection is 72 hours.

The results obtained show that the cell suspensions of *Theobroma cacao* have effective defense mechanisms, since they indicate at the moment that they are being contaminated by Cd(II).

3. INTRODUCCIÓN

El cadmio es un elemento químico que puede ser encontrado en el ambiente, así mismo, como en fertilizantes químicos y pesticidas. El ion cadmio (Cd^{2+}) es una de las maneras en la cuales el cadmio se encuentra en solución, por esto existe una gran facilidad de que exista presencia de cadmio en las plantas por su capacidad de ser absorbido fácilmente por las raíces, para posteriormente generar una reserva del elemento en toda la planta (Heiss et al., 2003).

Las plantas en presencia de Cd^{2+} sufren diversas alteraciones; morfológicamente puede paralizar el correcto crecimiento de las plantas generando que estas sufran de clorosis; fisiológicamente perjudica en la transpiración de nutrientes y en la fotosíntesis; a nivel celular produce alteración en la membrana celular, generando daños en el ADN de la planta y ocasiona estrés oxidativo.

El estrés oxidativo impulsa el estallido oxidativo (EO, por sus siglas en inglés) y la peroxidación lipídica, desencadenando en la inhibición de la actividad de la enzima antioxidante. En la planta, debido a la acumulación de Cd^{2+} se incrementa la concentración de malodialdehído (MDA), compuesto indicativo de la expresión de radicales libres existentes en la planta, ya que mientras mayor sea la concentración de MDA existe una mayor producción de radicales libres, como $\text{OH}\cdot$ (Ruscitti et al., 2015).

Estudios sobre la toxicidad de metales pesados (Vargas, 2017), comprobó que el estrés producido por estos elementos en hojas de avena es producto de la acción de radicales libres de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés).

Las especies ROS son un producto de los procesos de metabolización de la planta como la respiración, la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno. Con la ayuda de los captadores de ROS, enzimas como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y el glutatión reductasa (GR), la concentración de ROS en las plantas llega a un equilibrio dinámico y se conserva en un nivel en el cual es inocuo en un estado normal de crecimiento.

Las plantas poseen sistemas de desintoxicación, con los cuales pueden defenderse del estrés generado por las condiciones ambientales adversas y por supuesto, del estrés producido por la invasión de metales pesados. Cuando se produce el estrés, se ve afectado el equilibrio, posteriormente las especies ROS, principalmente H_2O_2 y O_2 , se sobre producen velozmente para formar un EO, el cual es la actividad más importante con la cual la planta se desintoxica. No obstante, la

planta sufre daños debido a la producción excesiva de H_2O_2 , por esto se ejecuta un procedimiento de eliminación de ROS en el cual se descarta el exceso y conservación de los niveles normales de ROS. Así, las especies reactivas de oxígeno cumplen un rol principal en la transducción de señales antiestrés, refuerzo de la pared celular, en las tareas de defensa y en la oxidación de lípidos de membrana (Beltrán y Gómez, 2016).

Para entender la toxicidad del estrés por Cd^{2+} , se han realizado estudios principalmente por medio de cultivo *in vitro* (Montero et al., 2019). Lo que usualmente se hace es seguir la producción de fitoquilinas en diversos intervalos de tiempo de estrés con el fin de determinar el nivel de Cd^{2+} que puede soportar la planta junto con el mecanismo antioxidante investigado. El desarrollo de estos análisis *in vitro* puede derivarse en un descenso de la actividad enzimática, siendo de igual manera técnicas de operación complejas que ocupan kits de alto costo (Molina et al., 2008; Smeets et al., 2008).

Por lo anterior, es fundamental el desarrollo de herramientas de diagnóstico sencilla, de bajo costo para poder dar seguimiento del estrés producido por Cd^{2+} en las plantas a tiempo real. A pesar de que se han creado algunos métodos para monitorear las especies ROS, como por espectrofotometría (Jeff et al., 2007), fluorescencia (Lindfor e Ivaska, 2002) y luminiscencia (Dahlberg et al., 2007), ninguno de estos métodos cumple con la condición de detección a bajo costo y fácilmente portable. Por esto, debido a la simplicidad y la sensibilidad que los caracteriza los métodos electroquímicos para la detección de H_2O_2 , componente principal de especies ROS, pueden ser tomados en cuenta como alternativa. Particularmente, la cronoamperometría es un método electroquímico apropiado para la realización de este tipo de ensayos, teniendo algunas ventajas en cuanto a los métodos tradicionales previamente mencionados; de igual manera al poder de monitorear la variación de la concentración de H_2O_2 en las plantas y que este monitoreo se pueda realizar en tiempo real puede ayudar a que los mecanismos de defensa de las plantas al estrés producido por Cd^{2+} pueda estudiarse de una manera más profunda y certera (Dai et al., 2009). Si bien, para realizar este tipo de medidas, comúnmente se utilizan electrodos de carbono, este tipo de electrodo no es apropiado para la medición especies ROS en plantas, debido a su alta capacidad de absorción de especies no deseadas en su superficie y su ductilidad es deficiente (Grace y Pandia, 2006; Wang et al., 2009). Por esta razón en la presente propuesta se reporta el uso de electrodo de platino (Pt), el cual posee buena ductilidad y actividad electrocatalítica hacia el H_2O_2 , a fin de obtener información fiable sobre la

respuesta de la planta al estrés por Cd^{2+} ; representando la cronoamperometría una técnica sencilla para la investigación de la defensa y el mecanismo de las especies ROS, como el H_2O_2 , contra el estrés.

4. OBJETIVOS

GENERAL

Optimizar un método por cronoamperometría para la detección de H_2O_2 en cultivos celulares de semillas *Theobroma cacao*

ESPECÍFICOS

- 1.6 Seleccionar los parámetros cronoamperométricos adecuados para la detección de peróxido en un sistema acuoso.
- 2.6 Obtener los parámetros de desempeño del método que faciliten la detección de peróxido en un sistema acuoso.
- 3.6 Cuantificar peróxido en las suspensiones celulares de semillas de *Theobroma cacao*, mediante cronoamperometría

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Reactivos

Peróxido de hidrógeno, 30% V/V (Sigma-Aldrich Sigma); Alumina para limpieza 1 μm , 0,3 μm y 0,05 μm (CH-Instruments, Inc); Fosfato dipotásico 99% (Merck, grado analítico); fosfato monopotásico 99.05% (Merck, grado analítico); Ácido sulfúrico (Fischer, grado analítico).

5.1.2. Equipos

Potenciostato (Biologic SP-150); Software ECLab V11.26; Electrodo de Pt como electrodo de trabajo; Electrodo de referencia de Ag/AgCl (KCl 3M) y contraelectrodo con una mina de grafito.

5.2. Métodos

5.2.1 Obtención suspensiones celulares

Las suspensiones celulares de *Theobroma Cacao* fueron obtenidas de la facultad de Ingeniería en biotecnología de la Universidad de las fuerzas armadas del Ecuador. Estas consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio en movimiento y que pueden ser permanentes a través de un suministro de nutrimentos; es la introducción de callos de *Theobroma cacao* en el medio. Se realizó el conteo celular de las suspensiones en una cámara de Neubauer con un microscopio.

5.2.2. Método analítico

5.2.2.1. Limpieza del electrodo de Pt

Se pulió el electrodo de Platino (Pt) antes de cada medición con alúmina de 1; 0,3; 0,05 μm por 3 minutos, consecutivamente, y se enjuagó con agua destilada (Alvarez et al., 2019). Se realizó una limpieza electroquímica por voltametría cíclica en ácido sulfúrico 0,5 M entre potenciales de -0,300 a 1,800 V, a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

5.2.2.2. Selección de potencial de trabajo

Se realizó voltametría cíclica en solución de buffer de fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), pH 5,7, junto con 5 mL de suspensiones celulares; en un rango de potencial de -0,350 a 1,200 V a una velocidad de 50 mV/s. Con el fin de seleccionar el potencial de trabajo que se utilizó para la detección del peróxido de hidrógeno en suspensiones celulares, antes de cada medición se añadió alícuotas de una solución H_2O_2 0,02M hasta lograr una concentración del analito en el medio electrolítico de 0,5 mM.

5.2.2.3. Activación del electrodo de Pt

El electrodo de Pt pasó por dos procesos de activación en solución de buffer de fosfato (PBS), pH 5,7, mediante dos ciclos voltamétricos, de -0,250 a 0,700 V. Se realizó una variación en la velocidad de barrido de cada activación, siendo la primera de 50 mV/s y la segunda de 100 mV/s.

5.2.2.4. Obtención de la curva de calibración

Se fabricó una curva de calibración al medir mediante cronoamperometría soluciones estándar de peróxido de hidrógeno en PBS, pH de 5,7, en un rango de concentración de 0,04 a 0,76 mM de H₂O₂. Parámetros de desempeño a obtenidos para el método: sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud.

Se calculó para las medidas (n=5), la media aritmética, desviación estándar y el porcentaje de recuperación para la cuantificación de H₂O₂. Los valores de porcentaje de coeficiente de variación (CV %), se evaluaron tomando como referencia a los límites aceptables descritos en las directrices de la AOAC para validación de métodos químicos en laboratorios en suplementos dietéticos y productos botánicos (AOC, 2002): límites de aceptación para CV% < 11 %, para reproducibilidad y para precisión, y exactitud entre 80 y 115% para valores de porcentaje de recuperación (R%).

5.2.2.5. Cuantificación del peróxido de hidrógeno en suspensiones celulares

Se realizó una curva de calibración con la medición por cronoamperometría a soluciones estándar de peróxido de hidrógeno en PBS, pH 5,7, en un rango de concentración de 0,04 a 0,52 mM de H₂O₂. La cuantificación del H₂O₂ en las suspensiones estresadas con CdSO₄ en concentraciones de 5, 10, 20 50 y 100 μM, se realizó con la siguiente ecuación.

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{b}{m} \cdot \frac{25\text{mL}}{5\text{mL}}$$

6. Resultados y Discusión

6.1. Obtención de suspensiones celulares

Las suspensiones celulares fueron obtenidas de la facultad de Ingeniería en biotecnología de la Universidad de las fuerzas armadas del Ecuador. Las suspensiones celulares fueron utilizadas con el medio Murashige & Skoog (MS) completo, en el cual

no se utilizó ningún tipo de suplemento ni tratamiento extra. El procedimiento realizado fue de depositar 1 mg de callo en 50 mL de medio en nueve Erlenmeyer de 125 mL. Estos matraces se colocaron en agitación orbital a 120 rpm en un lugar donde no reciba luz, después de 14 días se observó una coloración amarillenta y café en las soluciones los cuales nos indican la correcta iniciación y crecimiento de callo y suspensiones celulares de *Theobroma cacao*. Al pasar cuatro meses, se observó una coloración café, Figura 1, la cual ocurre debido a polifenoles localizados en el tejido cotiledóneo de las semillas, en el que las antocianinas contenidas en los granos de cacao otorgan una coloración amarilla a las suspensiones celulares (Florez et al.,2011).

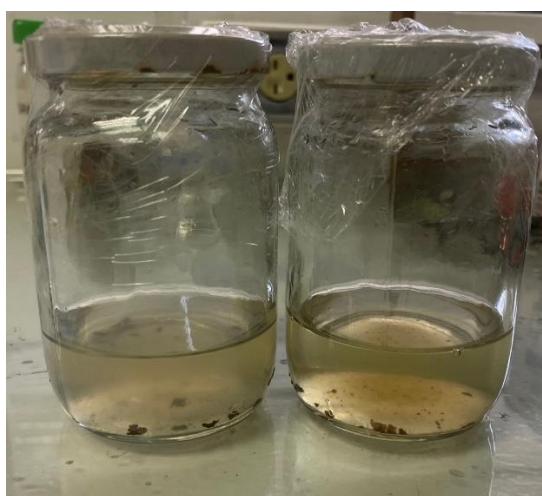


Figura 1. Suspensiones celulares de *Theobroma cacao*

Se realizó el conteo celular en el cual se tomaron alícuotas aleatoriamente de cada suspensión celular y fueron situadas en la cámara de Neubauer y fue puesta en el microscopio para el conteo de células, dando un resultado de la concentración de las células de la suspensión de 49602500.

6.2. Método analítico

6.2.1. Limpieza del electrodo de trabajo

Antes de realizar cada medición, se consideró necesario el pulir el electrodo de trabajo debido a que existe la posibilidad de que este posea analitos con tendencia a ser adsorbidos en la superficie del electrodo, esto podría considerarse como impurezas, afectando directamente a las respuestas en las lecturas electroquímicas (*Elgrishi et al*).

En la Figura 2, se observa el voltamperograma obtenido para una limpieza electroquímica mediante voltamperometría cíclica, se utilizó ácido sulfúrico 0.5 M con potenciales de -0.300 V a 1.800 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

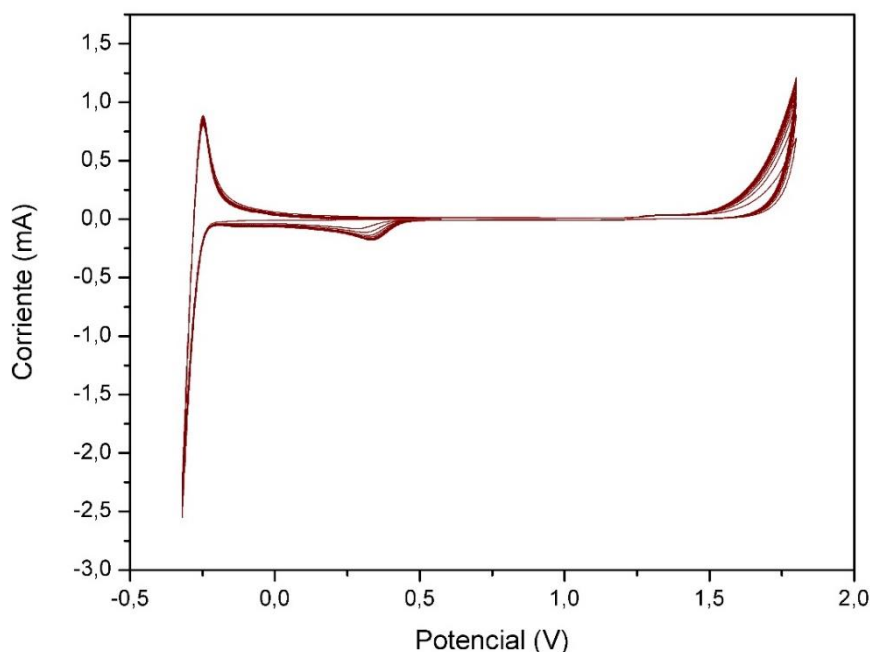
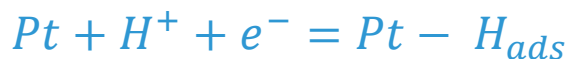


Figura 2. Voltamperograma obtenido para la limpieza electroquímica del electrodo de Pt en H₂SO₄ 0.5M mediante voltamperometría cíclica a una velocidad de barrido 100 mV/s

La voltamperometría cíclica realizada muestra picos característicos del H₂SO₄ sobre un electrodo de Pt, Figura 2, (Méndez et al., 2017). A potenciales mayores a -0,25 V se muestra la región de hidrógeno, donde esta especie se adsorbe/desorbe en la interfase Pt/H₂SO₄, de acuerdo a la siguiente reacción:



La región de doble capa (carga y descarga) se presenta entre los potenciales 0,5 y 1,0 V y el intervalo de potencial donde se forman óxidos de Pt, durante el barrido anódico, se encuentra a partir de 1,5 V, mientras el potencial de la reducción de los óxidos, en el barrido catódico, a 0,25 V. Toda la descripción anterior llamada la región de oxígeno.

6.2.2. Selección potencial de trabajo

Para seleccionar el potencial de trabajo, se ejecutó voltamperometrías cíclicas a la solución buffer PBS pH 5,7 en un rango de potencial de -0,350 a 1,200 V y a una velocidad 50 mV/s. Primeramente, la medida se realizó solamente en la solución buffer como blanco, posteriormente para seleccionar el potencial se realizaron voltametrías en las cuales se añadió 25 μ L de una solución 0,5 mM de H_2O_2 en cada medición, de esta manera se podía evidenciar el aumento o disminución de la señal de corriente generada por el aumento en la concentración de H_2O_2 añadido

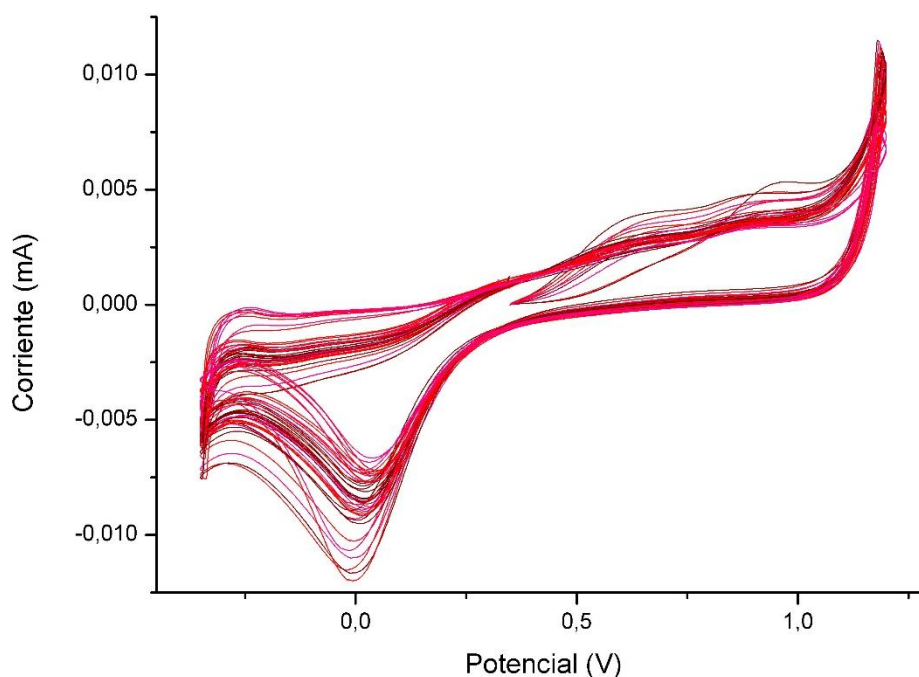


Figura 3. Voltametría cíclica utilizada para la selección del potencial de trabajo, a una velocidad de barrido de 50 mV/s añadiendo 0,05mM H_2O_2

En la voltametría cíclica realizada se puede observar que en presencia de peróxido de hidrógeno existe un aumento en la señal de la corriente mA en el potencial de -0,05V, siendo esta zona la característica de la reducción de H_2O_2 (Sandoval-Rojas, 2015). Una vez analizado el voltagrama se seleccionó un potencial de -0,05 V para las cronoamperometrías.

6.2.3. Actividades del electrodo de trabajo

Se realizaron dos activaciones del electrodo de trabajo (Pt) que se hicieron en buffer PBS pH 5,7 a distintas velocidades de barrido siendo estas 50 y 100 mV/s, con un rango de potencial de -0,250 a 0,700 V. En la Figura 4. Se puede observar el voltamperograma obtenido en ambas activaciones.

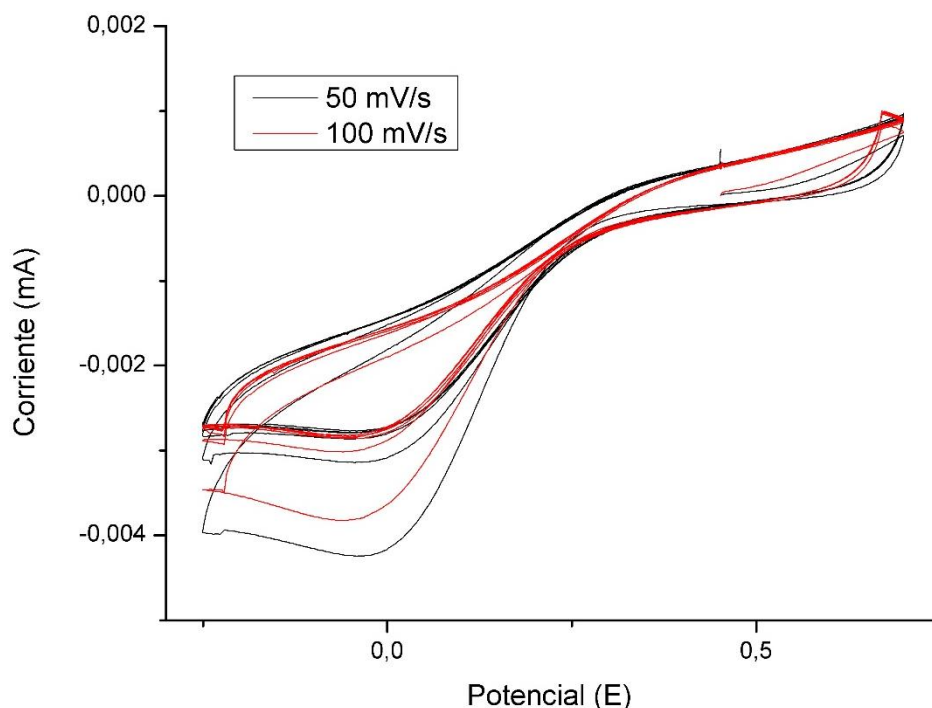


Figura 4. Voltametría cíclica de las activaciones del electrodo de trabajo Pt con buffer PBS pH 5,7 a 50 y 100 mV/s.

En el **voltagrama** de activación se observa que a medida que aumentan los ciclos en la voltametría cíclica la corriente disminuye. Las activaciones son beneficiosas para el trabajo debido a que de esta manera podemos limitar que las impurezas del solvente sean adsorbidas por el electrodo de trabajo, modificando los resultados obtenidos (Hendel & Young, 2017).

6.2.4. Curva de calibración

Para poder realizar la curva de calibración, se utilizó cronoamperometría, utilizando el potencial antes seleccionado, siendo este -0050 V, por un tiempo de 15 minutos, en los cuales los primeros 4 minutos son utilizados para la estabilización de la técnica en el equipo, para de esta manera poder trabajar en el potencial seleccionado sin que este

tenga variaciones. La Figura 5, muestra la curva de calibración obtenida y el resultado de un ejemplo de las cronoamperometrías obtenidas.

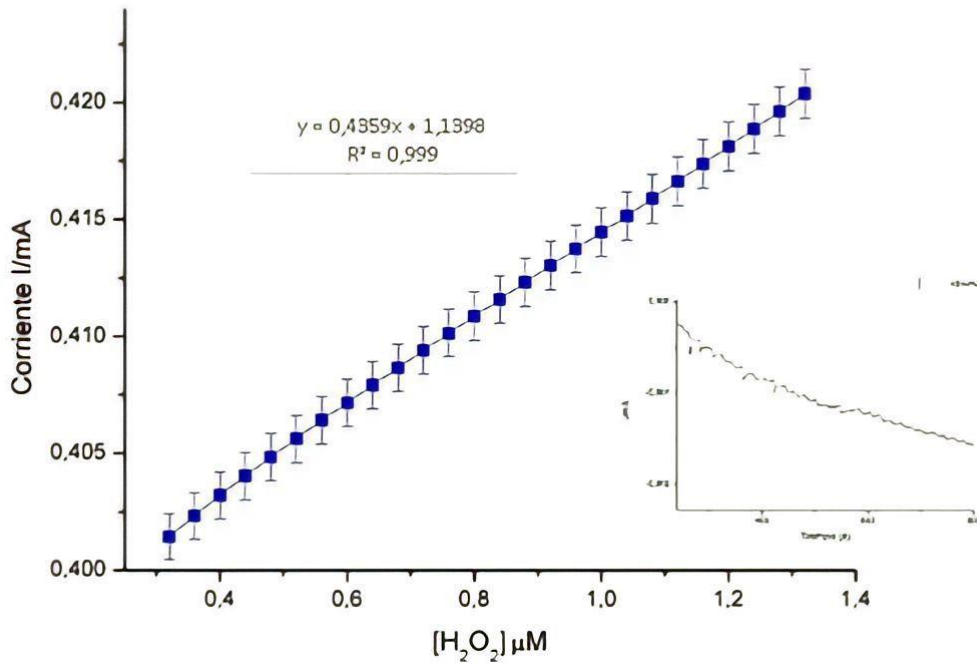


Figura 5. Curva de calibración para la detección de H₂O₂ sobre un electrodo de Pt

A partir de la curva obtenida se calcularon los límites de detección y de cuantificación utilizando las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{3 * Error\ Típico}{Pendiente}$$

$$LD = \frac{3 * 0,0000723}{0,018610}$$

$$LD = 0,116549 \mu M$$

$$LC = \frac{10 * Error\ Típico}{Pendiente}$$

$$LC = \frac{10 * 0,0000722963142}{0,0186092965}$$

$$LC = 0,3884957 \mu M$$

6.2.5. Cuantificaciones de H₂O₂ en las suspensiones celulares

Se realizaron cronoamperometrías con diluciones 1:10 de la muestra de suspensiones celulares estresadas a distintas concentraciones de Cd²⁺ (5, 20, 50, 100 μM), cada 24, 48, 72, 100 y 120 horas. Se utilizó el método de edición estándar para cuantificar la presencia de H₂O₂ y la manera en la cual este aumenta o disminuye al transcurrir el tiempo. Los resultados obtenidos se encuentran en las Tablas 1, 2, 3 y 4.

Tabla 1. Concentraciones de H₂O₂ en suspensiones celulares estresadas con Cd²⁺ a 5 μM a distintos tiempos de exposición

| Tiempo (h) | [H ₂ O ₂]/ (μM) | desv.est |
|------------|--|----------|
| 24 | 0,56 | 0,40 |
| 48 | 0,19 | 0,10 |
| 72 | 0,68 | 0,13 |
| 100 | 0,22 | 0,09 |
| 120 | 0,32 | 0,11 |

Tabla 2. Concentraciones de H₂O₂ en suspensiones celulares estresadas con Cd²⁺ a 20 μM a distintos tiempos de exposición

| Tiempo (h) | [H ₂ O ₂]/ (μM) | desv.est |
|------------|--|----------|
| 24 | 0,88 | 0,40 |
| 48 | 0,80 | 0,38 |
| 72 | 0,81 | 0,22 |
| 100 | 0,24 | 0,05 |
| 120 | 0,46 | 0,12 |

Tabla 3. Concentraciones de H₂O₂ en suspensiones celulares estresadas con Cd²⁺ a 50 μM a distintos tiempos de exposición

| Tiempo (h) | [H ₂ O ₂]/ (μM) | desv.est |
|------------|--|----------|
| 24 | 0,97 | 0,42 |
| 48 | 0,88 | 0,23 |
| 72 | 0,23 | 0,01 |
| 100 | 0,43 | 0,11 |
| 120 | 0,48 | 0,14 |

Tabla 4. Concentraciones de H₂O₂ en suspensiones celulares estresadas con Cd²⁺ a 100 μM a distintos tiempos de exposición

| Tiempo (h) | [H ₂ O ₂]/ (μM) | desv.est |
|------------|--|----------|
| 24 | 0,80 | 0,25 |
| 48 | 0,17 | 0,41 |
| 72 | 0,52 | 0,09 |
| 100 | 0,27 | 0,02 |
| 120 | 0,52 | 0,07 |

Para comparar los resultados, se realizó un experimento en el cual no se colocó Cd²⁺, la medición fue realizada solamente con Buffer PBS pH 5,7 y medio de las suspensiones celulares, el resultado obtenido al cuantificar la cantidad de peróxido fue de 0,16 μM. En la Figura 6 se puede observar la curva de calibración con la cual se determinó la concentración de peróxido en buffer sin Cd²⁺ añadido, el cálculo se realizó con la ecuación mencionada previamente.

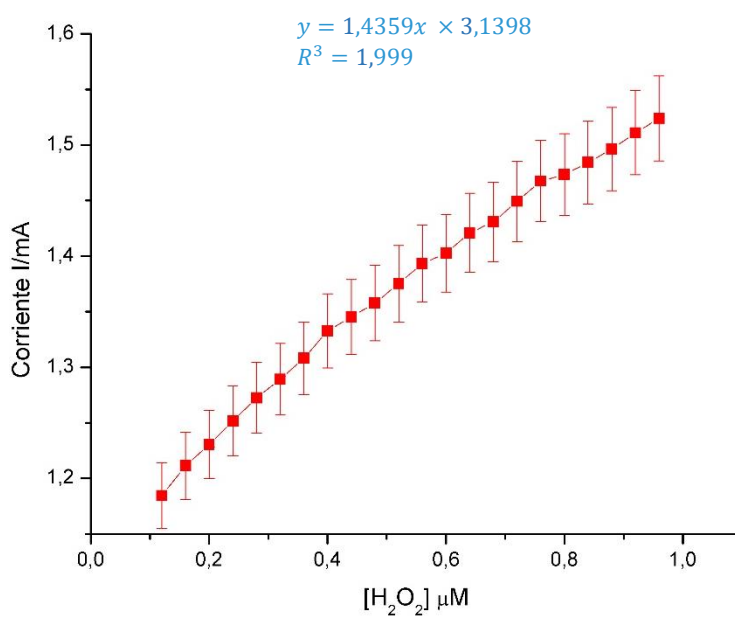


Figura 6. Curva de calibración para la detección de H₂O₂ sobre un electrodo de Pt sin añadir Cd⁺²

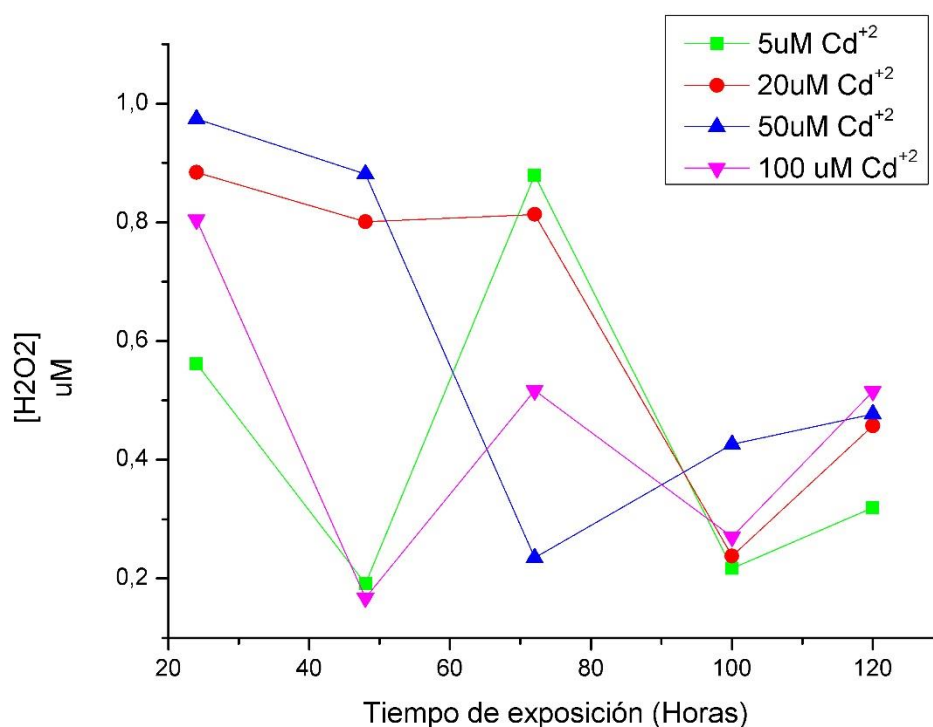


Figura 7. Relación del tiempo de exposición con la concentración de peróxido de hidrógeno.

En la Figura 7, podemos observar de manera global la variación existente en la concentración de H₂O₂ en el medio celular al estar estresado con Cd²⁺. Si bien no se estableció una tendencia lineal, los resultados obtenidos nos indican que la concentración de H₂O₂ disminuyó al comparar la concentración obtenida al inicio de las mediciones (24 horas) con el final de estas (120 horas).

Analizando separadamente cada suspensión podemos observar que se cumple lo reportado en la literatura, donde según la cantidad de Cd²⁺ que se ha agregado al medio va a depender la producción de H₂O₂ (Guo, et al., 2019), por esta razón la suspensión de 5 μM produce la menor cantidad al transcurrir el tiempo, siendo las 72 horas tiempo en el cual alcanzó su mayor producción de H₂O₂.

La suspensión de 20 μM es la que produce cantidades más altas de peróxido de hidrógeno durante las primeras 72 horas, esto fue algo recurrente en las suspensiones de otras concentraciones, ya que se puede ver en el gráfico de la Figura 6 que con excepción de la cantidad que se produce a las 24 horas, la mayoría de suspensiones aumentan su concentración de peróxido a las 72 horas.

El comportamiento de las suspensiones celulares a las 120 horas sugiere que las células de semillas de *Theobroma cacao* a este tiempo están cercanas a la muerte celular, esto debido a que todas las suspensiones incrementan la producción de peróxido de hidrogeno al compararlos con la medición realizada a las 100 horas. Lo que puede indicar que al pasar las 72 horas comienza la apoptosis en las células de las semillas que genera una producción máxima de H₂O₂ por el estrés que causa el metal contaminante que conducen a la célula a su muerte.

7. CONCLUSIONES

La optimización de un método por cronoamperometría para la cuantificación de peróxido de hidrógeno H₂O₂ en suspensiones celulares de semillas de *Theobroma cacao* estresadas con Cd⁺²(II) resultó efectivo. Con el transcurso del tiempo y según la concentración de Cd(II) la producción de peróxido aumenta, indicándonos que el tiempo óptimo para el trabajo en la detección de peróxido son 72 horas.

De igual manera, los resultados obtenidos muestran que las suspensiones celulares de *Theobroma cacao* tienen mecanismos de defensa eficaces, ya que indican en el momento que están siendo estresadas por el Cd(II).

8. BIBLIOGRAFÍA

- Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172-197.
- Dai Z, Xiao Y, Yu XZ, Mai ZB, Zhao XJ, Zou XY. 2009. Electroquímica directa de mioglobina basada en películas compuestas de arcilla líquida iónica. *Biosens Bioelectron* 24:1629–1634
- Dahlberg M, Dahlgren C, Hellstrand K, Movitz C. 2008. Una nueva paradoja de la quimioluminiscencia: los péptidos derivados del dominio N-terminal de la anexina A1 inhiben la quimioluminiscencia mejorada con isoluminol.
- Flórez, C., Rojas, L. F., Londoño, J., & Atehortúa, L. (2011). Efecto del metil jasmonato sobre la producción de polifenoles totales en cultivos celulares de *Theobroma cacao*. In *XIV National Congress of Biotechnology and Bioengineering, Juriquilla, Queretaro* (Vol. 14, p. 53).
- Grace AN, Pandian K. 2006. Las nanopartículas de Pt, Pt–Pd y Pt–Pd/Ru atrapan electrodos de polianilina, un electrocatalizador potente para la oxidación del glicerol. *Electrochem Commun* 8: 1340–1348
- Guo, B., Liu, C., Liang, Y., Li, N., & Fu, Q. (2019). Salicylic Acid Signals Plant Defence against Cadmium Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12),

2960. <https://doi.org/10.3390/ijms20122960>

Heiss S, Wachter A, Bogs J, Cobbett C, Rausch T. 2003. La proteína fitoquelatina sintasa (PCS) se induce en hojas de *Brassica juncea* después de una exposición prolongada a Cd. *J Exp Bot* 54: 1833–1839

Hendel, S. J.; Young, E. R. Introduction to Electrochemistry and the Use of Electrochemistry to Synthesize and Evaluate Catalysts for Water Oxidation and Reduction. *J. Chem. Educ.* 2016, 93 (11), 1951–1956.

Jeffers P, Kerins S, Baker CJ, Kieran PM. 2007. Generación de oxígeno reactivo y especies antioxidantes por suspensiones estresadas hidrodinámicamente de *Morinda citrifolia*

Lindfor T, Ivaska A. 2002. Sensibilidad al pH de la polianilina y sus derivados sustituidos. *J Electroanal Chem* 531: 43–52

Méndez, M., Peña, M., Briceño, R., & Márquez, J. (2017). Diseño de Electro catalizadores de Platino modificados con Óxidos de Vanadio (V₂O_x) para la Cátodos de Baterías. *Ciencia e Ingeniería*, 38(1), 53-64.

Molina AS, Nievas C, Chaca MVP, Garibotto F, González U, Marsa SM, Luna C, Giménez MS, Zirulnik F. 2008. Daño oxidativo inducido por cadmio y mecanismos de defensa antioxidante en *Vigna mungo* L. *Plant Growth Regul* 56: 285– 295

Montero-Jiménez, M., Fernández, L., Alvarado, J., Criollo, M., Jadán, M., Chuquer, D., & Espinoza-Montero, P. (2019). Evaluation of the cadmium accumulation in Tamarillo cells (*Solanum betaceum*) by indirect electrochemical detection of cysteine-rich peptides. *Molecules*, 24(12), 2196.

Ruscitti, M., Garita, S., Arango, M. C., & Beltrano, J. (2015). Inoculación con aislamientos seleccionados de hongos vesículo-arbusculares como alternativa para moderar el estrés hídrico en plantas de tomate platense bajo condiciones de invernáculo. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 114.

Sandoval-Rojas, A. P. (2015). Reacciones electroquímicas modelo en la interfaz líquido iónico-electrodo monocristalino de platino (Doctoral dissertation, Universitat d'Alacant-Universidad de Alicante).

Smeets K, Ruytinx J, Semanea B, Van Belleghemc F, Remansa T, Van Sanden S, Vangronsveld J, Cuypers A. 2008. Alteraciones transcripcionales y enzimáticas inducidas por cadmio relacionadas con el estrés oxidativo

Vargas Estofanero, D. R. (2017). Metales pesados en suelos cultivados con riego y sin riego en la comunidad de Ñaupapampa del distrito de Asillo-Puno.

Wang J, Qi X, Meng F, Ning Y, Chen SF, Pang D, Wen YF. 2009. Nanofibras de polianilina: acción inductora del óxido de neodimio y efecto inhibitor sobre la degradación electroquímica y aplicación de electrodos de platino modificados para la oxidación electrocatalítica de metanol. *J Phys Chem C* 113: 1459–1465.