

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Evaluación De La Acumulación De Cadmio En Células De *Theobroma Cacao* L

Por Espectroscopia De Absorción Atómica

Disertación previa a la obtención del título de Químico

Wendy Daniela Carvajal Erazo

Directora: Lenys Mercedes Fernández Martínez

Quito, junio 2023

Certificación

Certifico que el trabajo de disertación para Químico: **“Evaluación de la acumulación de cadmio en células de *Theobroma cacao* L por espectroscopia de absorción atómica”** fue realizado y culminado por mi tesista Wendy Daniela Carvajal Erazo conforme las normas establecidas; por tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Ph.D. Lenys Fernández Martínez

Directora de la disertación

Quito, 30 de junio 2023

Dedicatoria

A mi madre porque ha sido mi mayor inspiración, porque no existe un ser humano mejor que ella, porque gracias a su amor, apoyo y esfuerzo soy la persona y mujer que siempre quise ser.

A Mau por creer en mí, por su apoyo y cariño en cada etapa de mi vida.

A mi hermana Carlita por ser mi compañera en cada paso y a mi hermano Johitan por ser la razón por la que quiero ser mejor cada día.

Wendy Daniela Carvajal

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por guiar mi camino y ponerme en el lugar correcto para que pudiera descubrirme y cumplir mis sueños.

A mi familia, por sostenerme en todo momento, por darme las herramientas necesarias para cumplir mis objetivos y por todo el amor que me han brindado en este camino. No cabe duda de que sin ustedes nada de esto sería posible.

Al CESAQ, por ser el lugar donde conocí a grandes personas y profesionales que compartieron sus conocimientos y me enseñaron a ser una buena profesional. A la MSc. Pamela Vélez, MSc. Gabriela Yáñez y MSc. David Romero por ayudarme en mi trabajo de titulación, pero más que nada gracias por su amistad y apoyo en los buenos y malos momentos, se han convertido en mi familia.

A la PhD. Mónica Jadán, por permitirme ser parte del laboratorio de Cultivo de tejidos en la ESPE y compartirme sus conocimientos para la elaboración de mi trabajo de titulación. Gracias por su cariño y motivación para seguir adelante.

A mi tutora Lenys Fernández por permitirme realizar este trabajo de investigación porque sin duda ha sido una experiencia nutritiva.

A mis amigos, Cristina Mayorga, Andrés Gómez y Esteban Gonzáles por todo su cariño, por los buenos momentos y por su ayuda dentro y fuera de las aulas.

Wendy Daniela Carvajal

Índice de contenido

Certificación	2
Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
1. RESUMEN	9
2. ABSTRACT	9
3. INTRODUCCIÓN	10
4. OBJETIVOS	13
4.1 Objetivo general	13
4.2 Objetivos específicos	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1 Recolección de la muestra.....	13
5.2 Selección del explante.....	13
5.3 Protocolos de desinfección de explantes.....	14
5.4 Inducción a la callogénesis.....	15
5.5 Suspensiones celulares.....	17
5.6 Contaminación de suspensiones celulares	18
5.7 Cuantificación de cadmio por espectroscopia de absorción atómica por llama	19
6. RESULTADOS.....	22
6.1 Desinfección de Explantes	22

6.2	Inducción a Calogénesis in vitro	25
6.3	Cuantificación de cadmio en callo in vitro mediante el método de espectroscopia de absorción atómica por llama	27
7.	DISCUSIÓN	30
8.	CONCLUSIONES	36
9.	RECOMENDACIONES	37
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
11.	ANEXOS	41

Índice de figuras

Figura 1. Suspensiones celulares de callo de explante de tallo	18
Figura 2. Suspensiones celulares contaminadas con estándar de cadmio	19
Figura 4. Explantes de tallo contaminados por hongo	23
Figura 5. Porcentajes de contaminación presentes en el protocolo de desinfección de los explantes de tallo de cacao.	23
Figura 6. Explantes de tallo contaminados.....	24
Figura 7. Explante de hoja contaminado por hongo	24
Figura 8. Porcentajes de contaminación presentes en el protocolo de desinfección de los explantes de hoja de cacao	25
Figura 9. Explantes de hoja contaminados	25
Figura 10. Calogénesis en explantes de tallo.....	26
Figura 11. Explantes de hoja sin formación de callo	27
Figura 12. Curva de calibración.....	27

Índice de tablas

Tabla 1. Medio de cultivo Murashige y Skoog usado para la inducción de callogénesis para explantes de tallo y hoja de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	16
Tabla 2. Concentraciones y volumen de estándar de cadmio.....	19
Tabla 3. Datos para la curva de calibración	21
Tabla 4. Concentraciones de estándar de sensibilidad y de control.....	22
Tabla 5. Masa de cadmio retenido en callo de explantes de tallo contaminado con 0,5 mg L ⁻¹ de Cd a diferentes pH, agitación y tiempo	28
Tabla 6. Desviación estándar y coeficiente de variación de explantes de tallo contaminado con 0,5 mg L ⁻¹ de Cd a diferente pH y tiempo	28
Tabla 7. Masa de cadmio retenido en callo de explantes de tallo contaminado con 2 mg L ⁻¹ de Cd a diferentes pH, agitación y tiempo	29
Tabla 8. Desviación estándar y coeficiente de variación de explantes de tallo contaminado con 2 mg L ⁻¹ de Cd a diferente pH y tiempo	29
Tabla 9. Masa de cadmio retenido en callo de explantes de tallo contaminado con 5 mg L ⁻¹ de Cd a diferentes pH, agitación y tiempo	30
Tabla 10. Medio de cultivo WPM usado por Ortega, (2022).....	33
Tabla 11. Masa de cadmio retenido en callo de explantes de tallo contaminado con 11 mg L ⁻¹ de Cd a diferentes pH, agitación y tiempo.	36

RESUMEN

Los metales pesados como el cadmio representan un problema ambiental principalmente para las plantas, debido a que estos organismos tienen la capacidad de bioacumularlos. En la presente investigación se evaluó al *Theobroma cacao* L como bioindicador sedentario, por lo que se utilizó cultivo de tejido de vegetales *in vitro* para la inducción de callogénesis en explantes de tallo y hoja; obteniendo como resultado la formación completa de callo de explante de tallo a los 45 días de su introducción, mientras que en los explantes de hoja no se formó el callo. Mediante espectroscopia de absorción atómica se obtuvo que las células de *Theobroma cacao* L son capaces de retener cadmio. Sin embargo, no se pudo determinar el punto de saturación de cadmio en las células, ya que su comportamiento en respuesta a las diferentes concentraciones de cadmio varió bajo las mismas condiciones.

Palabras clave: Cadmio, cultivo *in vitro*, suspensiones celulares, espectroscopia de absorción atómica.

ABSTRACT

Heavy metals such as cadmium pose an environmental problem mainly for plants, as these organisms have the capacity to bioaccumulate these compounds. In the present research, *Theobroma cacao* L was evaluated as a sedentary bioindicator, using *in vitro* tissue culture to induce callus formation in stem and leaf explants. The complete formation of stem explant callus was observed 45 days after its introduction, while no callus formation occurred in leaf explants. By flame atomic absorption spectroscopy, revealing that *Theobroma cacao* L cells can retain cadmium. However, the saturation point of cadmium in the cells could not be determined, as their behavior in response to different concentrations of cadmium standard varied under the same conditions.

Keywords: Cadmium, in vitro culture, cell suspensions, atomic absorption spectroscopy.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales pesados es un problema ambiental que afecta a las plantas. Generalmente, estos organismos son capaces de absorber metales en su sistema, además, de crecer y sobrevivir en suelos contaminados, sin embargo, esto último depende de la especie vegetal y de las características de los metales presentes en el suelo (Llugany et al., 2007).

En los suelos, los metales se hallan presentes como parte de los minerales, dado que algunos de estos metales son necesarios para la nutrición de las plantas. Sin embargo, en concentraciones elevadas, pueden volverse perjudiciales para los organismos vivos ya que resultan tóxicos. El grado de toxicidad de los metales no solo depende de su concentración, sino también de su disponibilidad, movilidad y reactividad dentro de todo el ecosistema.

Los metales pesados pueden encontrarse en los suelos en diferentes formas, como iones libres o disponibles, compuestos de sales metálicas, compuestos insolubles y solubles como óxidos, carbonatos e hidróxidos (Méndez et al., 2009). Diversos factores influyen en la movilidad de los metales pesados en el suelo, como el pH, materia orgánica, composición iónica de la solución del suelo, arcillas, textura y otros más (Romero-Estévez et al., 2023).

Los metales pesados no son degradables y no pueden ser destruidos fácilmente ni química ni biológicamente por lo que se bioacumulan (Méndez et al., 2009). Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa a través de los cuales toleran la presencia de contaminantes para así evitar que sus células se oxiden. Por ejemplo, en presencia de metales pesados las hojas producen una clase específica de quelantes denominados fitoquelatinas (Zenk, 1996), (Clemens, 2001), (Iannelli et al., 2002) en las raíces se activa un sistema de defensa que suprime o elimina especies reactivas de oxígeno o la generación de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, catalasa y la ascorbato peroxidasa, que se

encargan de regular igualmente las especies reactivas del oxígeno molecular (Dixit et al., 2001).

Tomando en cuenta que se puede considerar bioindicador a aquel organismo cuya existencia, características estructurales, funcionamiento y reacciones sufren modificaciones debido a las perturbaciones externas ejecutadas sobre él por el medio en que se desarrollan, las plantas pueden considerarse como biomarcadores sedentarios, especialmente, como herramienta de diagnóstico ambiental (Gil Vargas, 2015).

El *Theobroma cacao* L, es uno de los productos de mayor exportación y tiene una gran relevancia en la economía del Ecuador debido a que sus características de sabor y aroma lo convierten en el mejor cacao del mundo, por lo que, es utilizado para la preparación de varios subproductos de interés internacional (Morales Intriago et al., 2018). Las plantas de *Theobroma cacao* L pueden absorber metales que se encuentran presentes en el suelo de cultivo de forma natural por erupciones volcánicas (Mite et al., 2010), pero también por la acción de actividades antropogénicas debido a la explotación minera, quema de desechos, uso de fertilizantes y riego con agua contaminada (Catalina Gonzáles, 2019). Por lo expuesto y, además, por la ubicación y cantidad de las plantaciones de *Theobroma cacao* L en el Ecuador, se ha considerado en la presente investigación la evaluación de esta planta como potencial bioindicador de contaminación por cadmio (Cd).

Particularmente, debido a su naturaleza no biodegradable y persistente, el Cd daña recursos naturales como el suelo y el agua (Kumar et al., 2021) ya que en forma de Cd (II) se disuelve en agua, incorporándose fácilmente a los sistemas biológicos de plantas y humanos (Hussain & Kecili, 2020). El cadmio puede llegar a los sistemas antes mencionados a través de compostaje urbano, riego de aguas residuales, desechos de industrias metalúrgicas, fertilizantes a base de fosfatos, meteorización de rocas e incendios forestales (Masindi & Muedi, 2018) (Hanmugaraj et al., 2018). Anualmente, se liberan a la atmósfera unas 30 000 toneladas de cadmio, de las cuales entre 4 000 y 13 000 toneladas son provocadas por actividades humanas (Méndez-Armenta & Ríos, 2007), por lo que el Cd está

incluido en la Lista de Prioridades de Sustancias Peligrosas proporcionada por la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR) (Bhalla & Pannu, 2022).

En la presente propuesta, la acumulación de cadmio se cuantificó en células de *Theobroma cacao* L cultivadas *in vitro* y expuestas a niveles citotóxicos de este metal bajo condiciones controladas de laboratorio. Los cultivos se obtuvieron a partir de explantes de tallo y hoja de la planta de cacao con la finalidad de identificar cuál explante posee mayor capacidad de acumular cadmio. Se utilizó el cultivo *in vitro* ya que, el crecimiento normal de la planta demanda demasiado tiempo.

El cultivo *in vitro* es la clonación de plantas en reactores de vidrio con un medio estéril y condiciones ambientales controladas para optimizar la micropropagación del tejido vegetal, generalmente llamada explante (Castillo, 2008). Este método exige un control físico y químico del ambiente de crecimiento del explante, por lo que, es necesario identificar el protocolo de desinfección, medio de cultivo y reguladores de crecimiento y así obtener un callo, es decir, el material diferenciado (Lallana & Lallana, 2003) y posteriormente una suspensión celular.

Existen varios métodos para la detección de metales pesados incluyendo los análisis fisicoquímicos (Acosta, 2007). En la presente investigación se utilizó espectroscopia de absorción atómica para la cuantificación de cadmio ya que es una técnica analítica selectiva que permite cuantificar un determinado analito que generalmente se encuentra en forma de vapor atómico y absorbe luz a una longitud de onda específica para cada metal (Cahuasqui, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de acumulación de cadmio en células de *Theobroma Cacao* L para ser utilizado como biomarcador de contaminación ambiental por metales pesados.

2.2 Objetivos específicos

Optimizar las mejores condiciones para obtener células madre a partir de explantes de tallo y hoja de plantas de *Theobroma cacao* L cultivadas in vitro.

Cuantificar por espectroscopia de absorción atómica cadmio en suspensiones celulares de explantes de tallo y hoja de *Theobroma cacao* L cultivadas in vitro.

Interpretar los resultados para definir si la planta de *Theobroma cacao* L puede ser utilizada como biomarcador sedentario.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Recolección de la muestra

Las plantas de cacao fino de aroma de mazorca amarilla fueron adquiridas en la institución INIAP en la ciudad de Santo Domingo de los Tsáchilas y trasladadas al laboratorio de cultivos vegetales de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Se utilizaron plantas jóvenes de 80 cm de altura.

3.2 Selección del explante

Se seleccionó el tallo de las plantas de cacao de color verde ya que era más fácil de cortar e introducir. Las hojas de cacao seleccionadas se limpiaron con papel toalla para quitar el polvo y suciedad, después, se procedió a cortar, con tijeras asépticas el péndulo de la hoja para separarla del tallo. Posteriormente, se introdujeron las hojas y tallos de cacao en vasos de precipitación separados para continuar con el protocolo de desinfección.

3.3 Protocolos de desinfección de explantes

Desinfección de hojas de cacao

Se utilizó el protocolo de desinfección detallado por Fernández (2018); sin embargo, se realizó algunas modificaciones ya que se presentó contaminación por hongo. La hoja se lavó durante 2 minutos con agua de grifo para eliminar cualquier residuo, luego, se colocó en detergente al 1 % (p/v) y se lavó por 10 minutos con agitación constante; transcurrido el tiempo se enjuagó 3 veces con agua destilada y se retiró completamente el detergente. A continuación, la hoja se colocó en alcohol al 70 % (v/v) por 10 segundos y se realizó 3 lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, los explantes se sumergieron en una solución de fungicida-bactericida NATURAM al 3 % (v/v) durante 15 minutos en agitación constante y se enjuagó 3 veces con agua destilada. Luego se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 1 % más 10 gotas de Tween 20, durante 5 minutos y se enjuagó 3 veces dentro de cámara de flujo laminar con agua destilada estéril. Finalmente, cada hoja se sumergió en una solución de cloruro de mercurio al 0,5 % (p/v) durante 10 segundos y se enjuagó con agua destilada. Nuevamente, se volvió a sumergir en una solución de ácido nítrico al 1 % (v/v) por otros 10 segundos para evitar la oxidación del explante y luego se lavó con agua destilada dentro de la cámara de flujo laminar.

Desinfección de tallo de cacao

Se utilizó el protocolo de desinfección reportado por (Roca & Mroginski, 1993), sin embargo, se realizó algunas modificaciones ya que se presentó contaminación por hongo. El tallo se lavó durante 2 minutos con agua corriente para eliminar cualquier residuo, después, se colocó en detergente al 1 % (p/v) y se lavó por 10 minutos con agitación constante, transcurrido el tiempo se enjuagó 3 veces con agua destilada y se retiró completamente el detergente. A continuación, el tallo se colocó en alcohol al 70 % (v/v) por 10 segundos y se

realizó 3 lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, los explantes se sumergieron en una solución de fungicida-bactericida NATURAM al 3 % (v/v) durante 15 minutos en agitación constante y se enjuagó 3 veces con agua destilada. Luego se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 1 % más 10 gotas de Tween 80, durante 5 minutos y se enjuagó 3 veces dentro de cámara de flujo laminar con agua destilada estéril. Después, cada tallo se sumergió en una solución de cloruro de mercurio al 0,5 % (p/v) durante 10 segundos y se enjuagó con agua destilada. Finalmente, se volvió a sumergir en una solución de ácido nítrico al 1 % (v/v) por otros 10 segundos para evitar la oxidación del explante y luego se lavó con agua destilada dentro de la cámara de flujo laminar.

3.4 Inducción a la callogénesis

Una vez terminados los protocolos de desinfección, en una cámara de flujo laminar marca ESCO modelo SHC-4A2 la cual fue previamente desinfectada con etanol al 70 % y esterilizada con radiación ultravioleta durante 1 hora, se realizó la introducción del material vegetal.

Explantes de hoja

Con pinza y bisturí estériles se cortó los bordes de la hoja ya que estos se oxidaron por efecto del alcohol, luego se cortó el resto de la hoja en pequeños cuadrados los cuales fueron sumergidos en la solución de cloruro de mercurio y ácido nítrico como se indicó anteriormente. A continuación, cada explante fue introducido en medios de cultivo Murashige and Skoog (MS) completo (Tabla 1), suplementado con 7,5 g/L agar, y como regulador de crecimiento 0,002 mg/L de Tidiazurón (TDZ) (Fernández, 2018). El medio de cultivo se ajustó a un pH de 5,7 – 5,8 y auto clavado por 120 minutos a 115 °C.

Posteriormente, los explantes introducidos se colocaron en el banco de germoplasma a temperatura ambiente y luz natural. Cada ocho días se evaluaba el estado de los explantes para determinar el porcentaje de contaminación por hongo o bacteria y la formación de callo. Una vez que los explantes produjeron callo, se realizó una

multiplicación de brotes, para lo cual se realizó subcultivos bajo las mismas condiciones que la siembra de las muestras.

Tabla 1. Medio de cultivo Murashige y Skoog usado para la inducción de callogénesis para explantes de tallo y hoja de cacao (*Theobroma cacao* L).

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650,000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1900,000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370,000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440,000
	KH ₂ PO ₄	Sulfato de potasio	170,000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6,200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0,025
	KI	Yoduro de potasio	0,830
	MnO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22,300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0,250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8,600
	FeNaEDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50,000
	Vitaminas	Inositol	
Tiamina			0,100
Piridoxina			0,500

	Ácido nicotínico	0,500
Carbohidratos	Sacarosa	30000,000

Nota: (Ortega, 2022)

Explantos de tallo

Con pinza y bisturí estériles se cortó los extremos del tallo ya que estos estaban necrosados por efecto del alcohol, después, se dividió el tallo en pequeñas partes las cuales fueron cortadas transversalmente para luego ser sumergidas en la solución de cloruro de mercurio y ácido nítrico como se indicó anteriormente. A continuación, cada explante fue introducido en medios de cultivo Murashige and Skoog (MS) completo (Tabla 1), suplementado con 20 g/L de sacarosa y 7,5 g/L agar, y como regulador de crecimiento para la inducción de callo 3 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Roca & Mroginski, 1993). El medio de cultivo se ajustó a un pH de 5,7 – 5,8 y auto clavado por 120 minutos a 115 °C.

Posteriormente, los explantes introducidos se colocaron en el banco de germoplasma a temperatura ambiente y completa oscuridad ya que el regulador de crecimiento es fotosensible. Cada ocho días se evaluaba el estado de los explantes para determinar el porcentaje de contaminación por hongo o bacteria y la formación de callo. Una vez que los explantes produjeron callo, se realizó una multiplicación de brotes, para lo cual se realizó subcultivos bajo las mismas condiciones que la siembra de las muestras.

3.5 Suspensiones celulares

Los callos obtenidos de los explantes de tallo se colocaron en medio líquido MS (Tabla 1) suplementado con la sacarosa y auxinas de crecimiento en las mismas condiciones en las que se produce el callogénesis (Figura 1) y fueron expuestos a agitación orbital. Para formar la suspensión celular se pesó un gramo de callo friable y se colocó en

el medio de cultivo líquido. Finalmente, las suspensiones se contaminaron con estándar de cadmio (Certipur, 1000 mg L⁻¹).

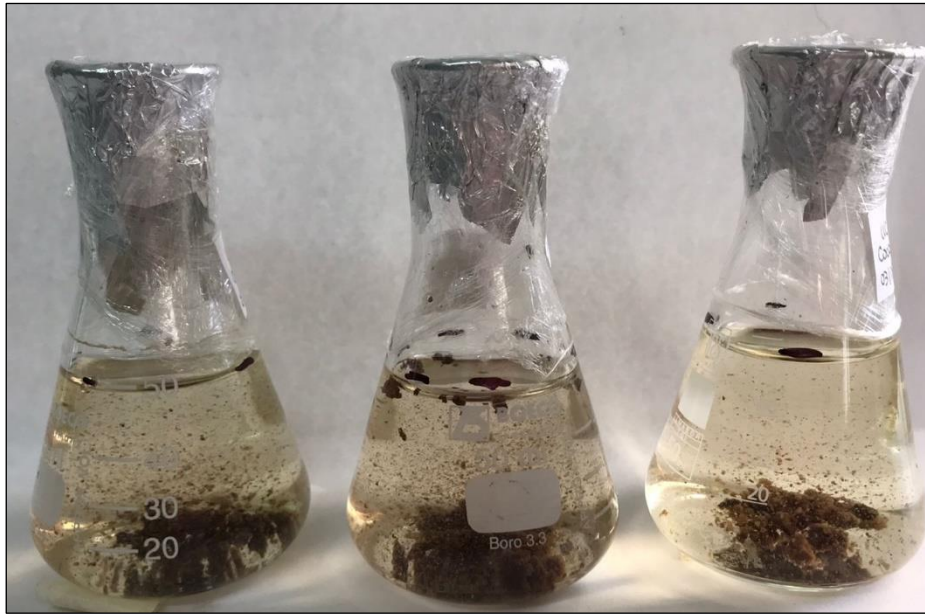


Figura 1. Suspensiones celulares de callo de explante de tallo

3.6 Contaminación de suspensiones celulares

Al igual que en la introducción de explantes se utilizó una cámara de flujo laminar la cual fue previamente desinfectada con etanol al 70 % y esterilizada con radiación ultravioleta durante 1 hora. Se pesó un gramo de callo friable y se colocó dentro de un tubo falcón estéril con un determinado volumen de estándar de cadmio (Tabla 2) y medio de cultivo líquido MS suplementado con sacarosa y 2,4-D en agitación orbital (Figura 2). El estrés se realizó a diferentes concentraciones de estándar de cadmio, Tabla 2.

El volumen de aforo fue de 25 mL con medio de cultivo MS líquido. La contaminación a partir de una solución madre de 50 mg L⁻¹, la cual fue preparada con el estándar de cadmio en un volumen de 100 mL. La agitación orbital se mantuvo durante diferentes rangos de tiempo, como 24, 48, 96 y 120 horas para evaluar cómo actúan las células madre (Figura 2).

Tabla 2. Concentraciones y volumen de estándar de cadmio

Cd (mg/L)	Cd (mL)
0,50	0,25
2,0	1,0
5,0	2,5
11,0	5,5

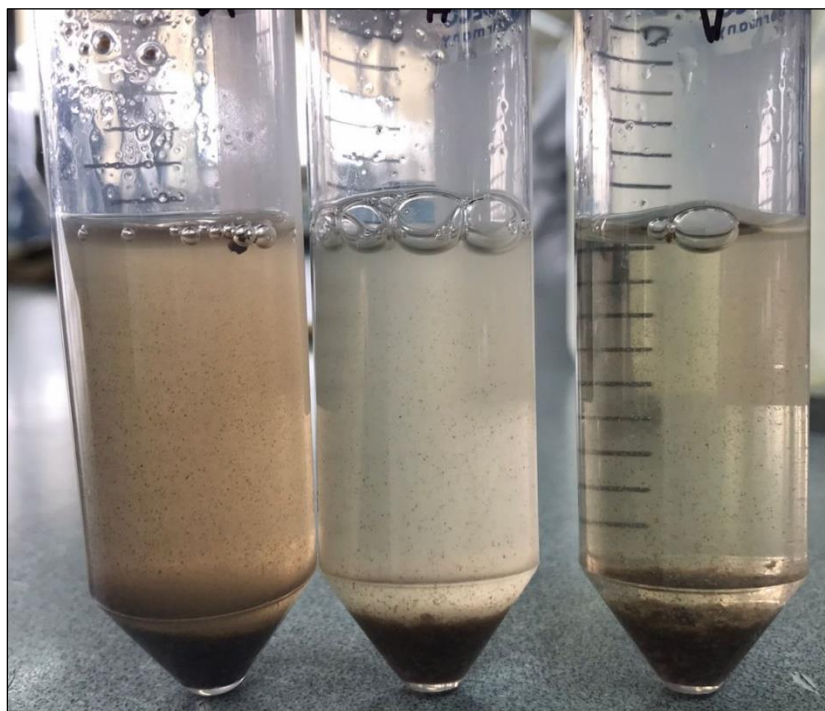


Figura 2. Suspensiones celulares contaminadas con estándar de cadmio

3.7 Cuantificación de cadmio por espectroscopia de absorción atómica por llama

Para cuantificar el cadmio retenido en los explantes de tallo de cacao se usó el método de espectroscopia de absorción atómica por llama. La muestra fue previamente centrifugada para asegurar que el medio líquido se haya separado totalmente del callo y obtener datos confiables de la retención de cadmio. La muestra que se analiza es líquida por lo que es absorbida por el tubo capilar y llevada al nebulizador donde se transforma en pequeñas gotas

como una especie de aerosol, estas gotas se dirigen hacia la flama donde los átomos absorben la radiación emitida por una lámpara a una longitud de onda determinada, la cantidad de radiación absorbida es proporcional a la concentración del metal presente en cada muestra (Vega, 2022).

Preparación de muestras

Después del tiempo de contaminación transcurrido las suspensiones celulares se centrifugaron a 5000 rpm para separar el caldo del medio líquido (Figura 2); medio que fue analizado mediante espectroscopia de absorción atómica por llama en las instalaciones del CESAQ-PUCE donde se siguió la metodología establecida por (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2012) para determinar la cantidad de cadmio retenido en las células madre del explante de tallo.

Preparación del equipo

El Equipo utilizado fue un espectrofotómetro modelo AAnalyst 400, marca Perkin Elmer (Figura 3). Se abren las válvulas del gas acetileno, luego se enciende el equipo y el monitor para abrir el software WinLab 32 y se selecciona el modo Flame. Después, se colocan las lámparas de cobre y cadmio. Con la lámpara de cobre se alineó el quemador, mientras que con la lámpara de cadmio de cátodo hueco se leyeron las muestras a una longitud de onda de 288,800 nm y una energía de 43.



Figura 3. Espectrofotómetro de absorción atómica

Preparación de curva de calibración

Los estándares para la construcción de la curva de calibración (Tabla 3) se prepararon en balones aforados de 50 mL a partir de la solución madre de 50 mg L⁻¹ de estándar de cadmio. En cada solución se añadió una gota de ácido nítrico antes de aforar ya que se obtiene mayor sensibilidad a pH ácidos. Los cálculos de los volúmenes a tomar de la solución madre se determinaron mediante la fórmula:

$$C_1V_1=C_2V_2 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

C_1 = Concentración de la solución madre, 50 mg L⁻¹.

V_1 = Volumen a tomar de la solución madre.

C_2 = Concentración de cada punto de la curva de calibración (Tabla 3).

V_2 = Volumen de aforo de la disolución, 50 mL.

Tabla 3. Datos para la curva de calibración

Concentración	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Desviación
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,03	0,0158	0,0047	0,0083	0,0069	0,0048
0,05	0,0251	0,0099	0,0145	0,0139	0,0065
0,10	0,0538	0,0229	0,033	0,0322	0,0130
0,30	0,1705	0,1142	0,1232	0,1257	0,0252
1,00	0,5539	0,4409	0,4085	0,4152	0,0676

El límite de cuantificación es el primer estándar de la curva de calibración (Tabla 3) y rango lineal de determinación es de 0,03 – 10 mg L⁻¹, sin embargo, cuando la concentración de la solución sobrenadante obtenida después de la centrifugación de las suspensiones celulares estuvo fuera del máximo punto del rango lineal se procedió hacer una dilución máxima de 10 veces. Por otro lado, también fue necesario preparar un estándar de sensibilidad y estándares de control para asegurar la veracidad de los datos, por lo que se leyeron cada 10 lecturas verificando que la linealidad de la recta de calibración se

mantuviera. A continuación, en la Tabla 4 se detallan las concentraciones del estándar de sensibilidad y de control los cuales fueron preparados a partir de la solución madre de 50 mg L⁻¹ de estándar de cadmio.

Tabla 4. Concentraciones de estándar de sensibilidad y de control

Metal	Estándar de sensibilidad	Estándar de control
	mg L⁻¹	mg L⁻¹
Cadmio	0,50	Bajo: 0,07
		Alto: 0,50

4. RESULTADOS

4.1 Desinfección de Explantes

Tallo

En la primera etapa de desinfección de los tallos de *Theobroma Cacao L* se aplicó el protocolo de desinfección sugerido por (Roca & Mroginski, 1993) y el porcentaje de contaminación que presentaron los explantes fue del 100 % debido a que todo el material introducido fue contaminado por hongo (Figura 4). La contaminación se pudo observar desde el tercer día después de la introducción, por lo que se modificó el protocolo y se usó fungicida al 3 % (v/v), cloruro de mercurio al 0,5 % (p/v) y ácido nítrico al 1 % (v/v). Después de estas modificaciones se obtuvo un porcentaje de contaminación del 25 % mediante hongo (20 %) y bacteria (5 %) como se muestra en las Figuras 5 y 6; mientras que el 75 % de los explantes fueron viables para continuar con la inducción a callogénesis ya que los explantes no presentaron necrosamiento ni oxidación al ejecutar el protocolo modificado.



Figura 4. Explantes de tallo contaminados por hongo

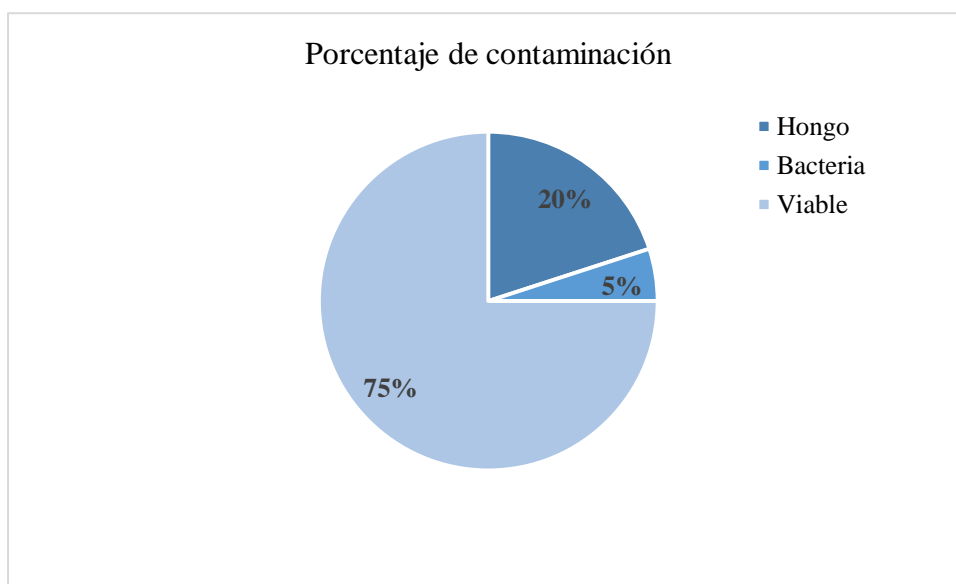


Figura 5. Porcentajes de contaminación presentes en el protocolo de desinfección de los explantes de tallo de cacao.

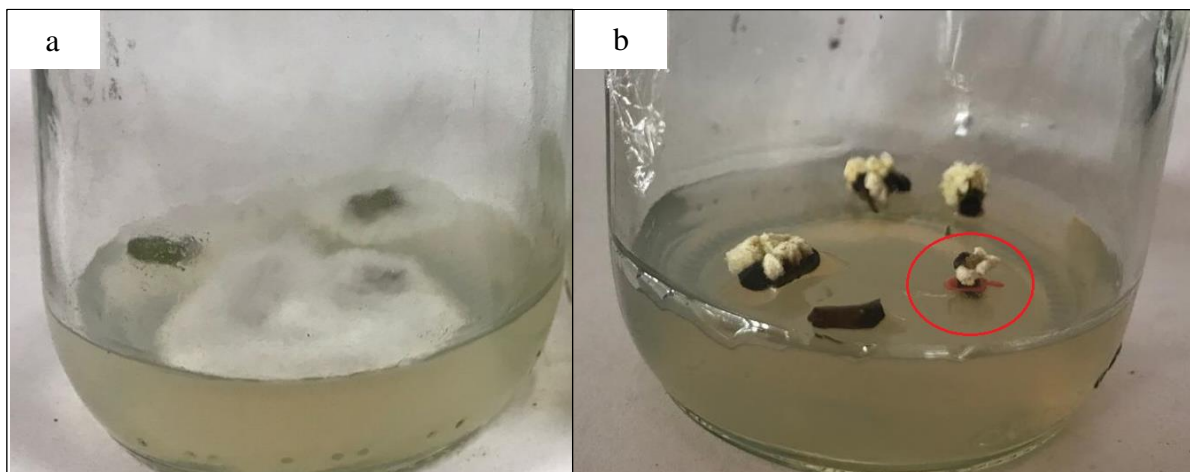


Figura 6. Explantes de tallo contaminados

- a) Explantes de tallo contaminados por hongo, b) explantes de tallo contaminados por bacteria.

Hoja

En la primera etapa de desinfección de las hojas de *Theobroma Cacao* L se aplicó el protocolo de desinfección sugerido por (Fernández, 2018) y el porcentaje de contaminación que presentaron los explantes fue del 100 % debido a que todo el material introducido fue contaminado por hongo (Figura 7). La contaminación se pudo observar desde el tercer día después de la introducción, por lo que al igual que con el explante de tallo se modificó el protocolo y se usó fungicida al 3 % (v/v), cloruro de mercurio al 0,5 % (p/v) y ácido nítrico al 1 % (v/v). Después de estas modificaciones se obtuvo un porcentaje de contaminación del 20 % mediante hongo (15 %) y bacteria (5 %) como se muestra en la Figura 8 y 9; mientras que el 80 % de los explantes fueron viables para continuar con la inducción a callogénesis ya que los explantes no presentaron necrosamiento ni oxidación al ejecutar el protocolo modificado.



Figura 7. Explante de hoja contaminado por hongo

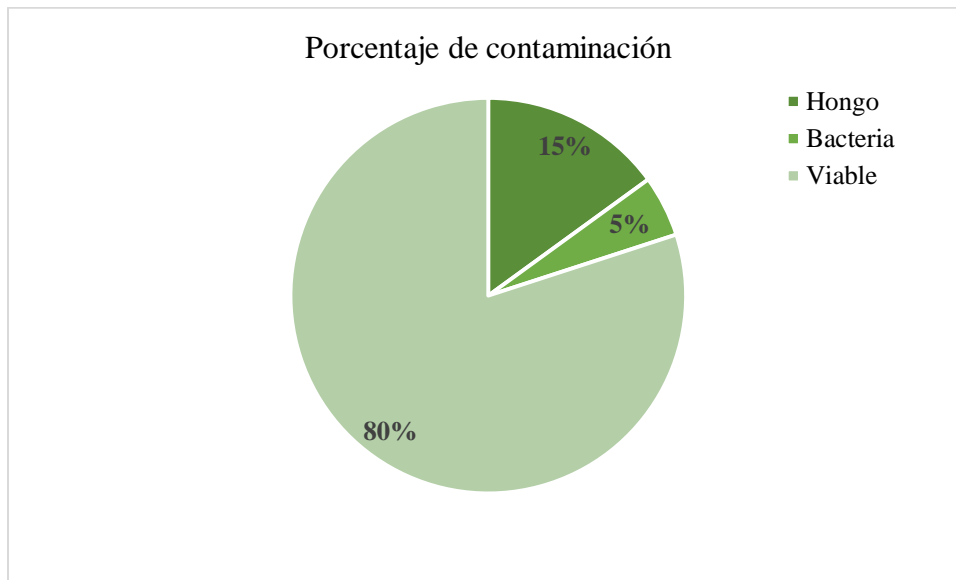


Figura 8. Porcentajes de contaminación presentes en el protocolo de desinfección de los explantes de hoja de cacao

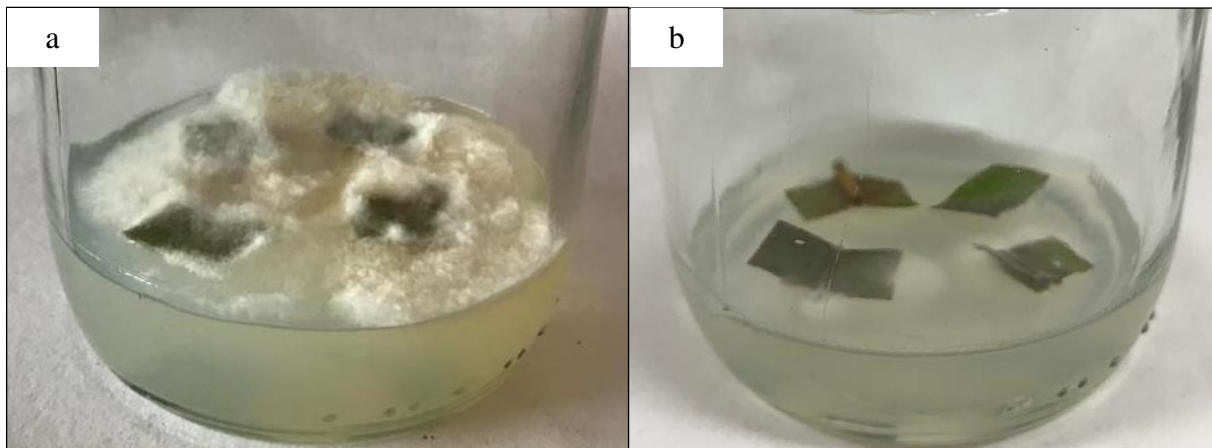


Figura 9. Explantes de hoja contaminados

- a) explantes de hoja contaminados por hongo, b) explantes de hoja contaminados por bacteria ya que se observa un halo lechoso.
b)

4.2 Inducción a Calogénesis in vitro

Tallo

El medio de cultivo MS suplementado con sacarosa y 2,4-D como regulador de crecimiento indujo la formación de callo friable en los explantes de tallo de *Theobroma Cacao* L. La formación de callo se observó a partir de los 15 días (Figura 10a), mientras se realizaba el cambio de medio de cultivo cada 30 días el tamaño del callo aumentó (Figura

10b) y se produjo callo nuevo el cual presenta un color cremoso a diferencia del callo viejo que presenta color café oscuro (Figura 10c).

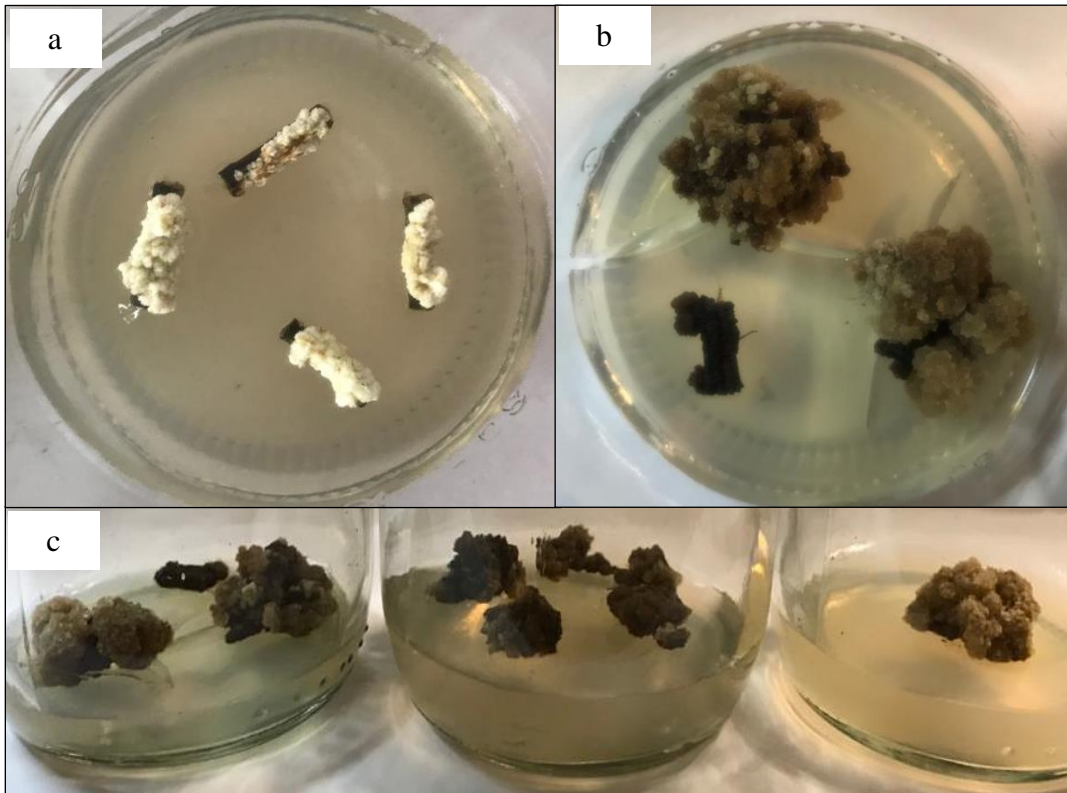


Figura 10. Callogénesis en explantes de tallo

- a) Formación de callo en explantes de tallo después de 15 días, b) crecimiento de nuevo callo friable el cual presenta un color cremoso, c) callo viejo el cual presenta un color café oscuro y necesita cambio de medio de cultivo.

Hoja

A diferencia de los explantes de tallo el medio de cultivo MS suplementado con Tidiazurón como regulador de crecimiento no fue efectivo para la inducción de callo en explantes de hoja. Los explantes mantuvieron su estado inicial sin necrosamiento (Figura 11) y aun cuando se hicieron cambios regulares del medio de cultivo durante 6 meses no hubo formación de callo.

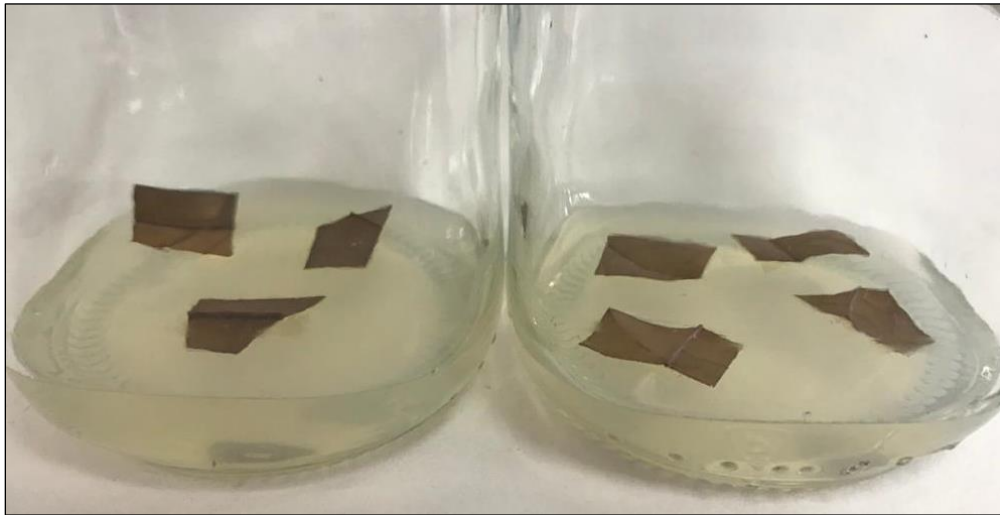


Figura 11. Explantes de hoja sin formación de callo

4.3 Cuantificación de cadmio en callo in vitro mediante el método de espectroscopia de absorción atómica por llama

Para la cuantificación de cadmio se contaminó el callo de *Theobroma Cacao* L formado a partir del explante de tallo. Se construyó una curva de calibración a partir de la solución madre de estándar de cadmio de 50 mg L^{-1} con los puntos establecidos en la Tabla 3. La curva de calibración presento un R^2 de 0,9999 como se observa en la Figura 12.

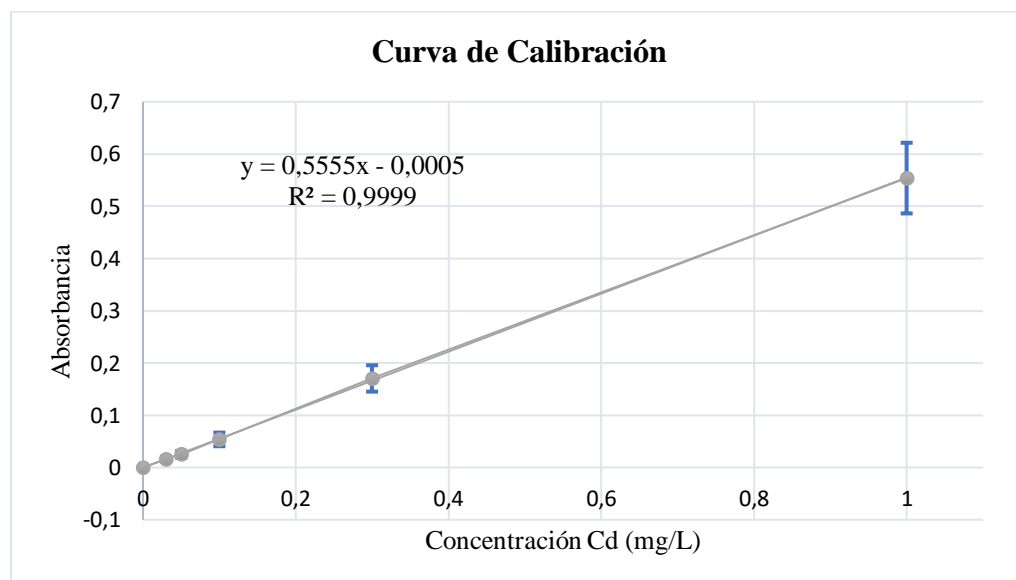


Figura 12. Curva de calibración

Durante este proceso algunas variables de control fueron cambiando para establecer las condiciones de trabajo optimas, sin embargo, no se pudo fijar un comportamiento

equivalente en las células ya que a pesar de estar bajo las mismas condiciones el porcentaje de masa de cadmio retenido fue muy variable, es decir, no presentó una tendencia representativa que permitiera establecer una relación. En la Tabla 5, 7 y 9 se presentan los datos obtenidos después de analizar el sobrenadante obtenido después de la centrifugación de las suspensiones celulares contaminadas bajo las diferentes condiciones, mientras que en la Tabla 6 y 8 se presentan la desviación estándar y el coeficiente de variación de la masa de cadmio retenido a diferente pH y tiempo.

Tabla 5. Masa de cadmio retenido en callo de explantes de tallo contaminado con 0,5 mg L⁻¹ de Cd a diferentes pH, agitación y tiempo

pH	Agitación	Tiempo (h)	Cd inicial (µg)	Cd no retenido (µg)	Cd retenido (µg)	% Retenido
4	Horizontal	24	12,5	8,5	4,00	32,0
4	Vertical	96	12,5	10,825	1,675	13,4
5,7	Horizontal	24	12,5	11,15	1,35	10,8
5,7	Horizontal	96	12,5	10,5	2	16
5,7	Horizontal	504	12,5	8,05	4,45	35,6

Tabla 6. Desviación estándar y coeficiente de variación de explantes de tallo contaminado con 0,5 mg L⁻¹ de Cd a diferente pH y tiempo

pH	Tiempo (h)	Desviación	CV
4,0	24	1,8738	70,050
5,7			
4,0	96	0,2298	12,507
5,7			

Tabla 7. Masa de cadmio retenido en callo de explantes de tallo contaminado con 2 mg L⁻¹ de Cd a diferentes pH, agitación y tiempo

pH	Agitación	Tiempo (h)	Cd inicial (µg)	Cd no retenido (µg)	Cd retenido (µg)	% Retenido
4	Vertical	24	50	38,70	11,30	22,6
4	Horizontal	48	50	38,90	11,10	22,2
4	Horizontal	96	50	41,00	9,00	18
4	Vertical	120	50	43,80	6,20	12,4
4	Horizontal	120	50	47,05	2,95	5,9
5,7	Horizontal	24	50	37,90	12,10	24,2
5,7	Horizontal	24	50	41,20	8,80	17,6
5,7	Horizontal	48	50	47,45	2,55	5,1
5,7	Horizontal	96	50	47,90	2,10	4,2
5,7	Vertical	120	50	48,00	2,00	4
5,7	Horizontal	120	50	48,05	1,95	3,9
5,7	Horizontal	504	50	48,75	1,25	2,5

Tabla 8. Desviación estándar y coeficiente de variación de explantes de tallo contaminado con 2 mg L⁻¹ de Cd a diferente pH y tiempo

pH	Tiempo (h)	Desviación estándar	CV
4			
5.7	24	1,721	16,03
5.7			
4	48	6,046	88,583
5.7			
4	96	4,879	87,911
5.7			
4	120	2,004	61,177
5.7			

Tabla 9. Masa de cadmio retenido en callo de explantes de tallo contaminado

con 5 mg L⁻¹ de Cd a diferentes pH, agitación y tiempo

pH	Agitación	Tiempo (h)	Cd inicial (µg)	Cd no retenido (µg)	Cd retenido (µg)	% Retenido
4	Horizontal	96	125	97,2	27,8	22,24

5. DISCUSIÓN

Las especies bioindicadoras presentan sensibilidad a las perturbaciones ambientales y a la disponibilidad de los estresores, por lo que son usadas como estimadoras de las condiciones de otras especies ya que representa un método más sencillo y menos costoso (Pernía et al., 2008). Existen diferentes tipos de bioindicadores, pero en este caso nos centraremos en los acumuladores. Estos son organismos que presentan resistencia a ciertos contaminantes ya que son capaces de acumular concentraciones considerables en sus tejidos provocando cambios fisiológicos y morfológicos en su estructura (César Gonzáles et al., 2014).

La necesidad de estudiar el comportamiento del cacao *Theobroma cacao* L como bioindicador y evaluar su capacidad de acumulación frente a estresores como el cadmio a impulsado a implementar técnicas como el cultivo *in vitro* de células vegetales de diferentes explantes como el tallo y hoja. En la presente investigación, se establecieron protocolos de desinfección y medios de cultivo para optimizar el crecimiento de callogénesis *in vitro*.

Desinfección de explantes de cacao (*Theobroma cacao* L)

La desinfección de los explantes es el primer paso para la introducción de material vegetal en cultivo *in vitro* ya que al no tener un protocolo de desinfección eficiente la proliferación de microorganismos como hongos y bacterias puede aumentar, lo que da paso a la destrucción de los cultivos ya que los microorganismos compiten con los explantes por el medio de cultivo (Mroginski & Roca, 1991).

Explante de tallo

Es difícil obtener cultivos totalmente estériles por lo que es necesario desinfectar superficialmente los explantes evitando causarles daño. Existen diferentes compuestos químicos que se pueden usar como desinfectantes, lo más común es usar etanol e hipoclorito de sodio, aunque en algunas ocasiones se usa cloruro de mercurio (Mroginski & Roca, 1991). Después de la aplicación del protocolo de desinfección de los explantes de tallo se obtuvo un porcentaje de contaminación del 25 % mediante hongo (20 %) y bacteria (5 %) (Figura 5). Existe poca información referente a la micro propagación de cacao a partir de explantes de tallo, sin embargo, al aplicar el protocolo de desinfección establecido por (Roca & Mroginski, 1993) se presentaron tasas de infección más altas (Figura 4), posiblemente debido a la existencia de hongos y bacterias endógenas por lo que se modificó el protocolo añadiendo soluciones de fungicida-bactericida al 3 % (v/v), cloruro de mercurio al 0,5 % (p/v) y ácido nítrico al 1 % (v/v).

Explante de hoja

Al aplicar el protocolo de desinfección establecido por Fernández (2018) se obtuvo un porcentaje de contaminación alto (Figura 7) por la presencia de hongo, por lo que se modificó el protocolo añadiendo soluciones de fungicida-bactericida al 3 % (v/v), cloruro de mercurio al 0,5 % (p/v) y ácido nítrico al 1 % (v/v), disminuyendo el porcentaje de infección al 20 % (Figura 8) y haciendo viable el protocolo de desinfección.

El uso de cloruro de mercurio logró la desinfección de los explantes, según Abdelnour et al. (2004) al usar hipoclorito de sodio seguido de cloruro de mercurio se observa un menor porcentaje de contaminación. Por otro lado, Azofeifa (2009) establece que el uso de este compuesto previene el oscurecimiento de los tejidos. Además, indica que la oxidación que sufren los explantes, suele estar potenciada por el uso de reguladores de crecimiento como las auxinas por lo que es necesario usar antioxidantes, en este caso se usó ácido nítrico para inhibir la oxidación. Finalmente, el fungicida-bactericida permitió

eliminar bacterias y hongos que la planta puede adquirir en los invernaderos y así disminuir la contaminación por estos microorganismos.

Inducción a la callogénesis

Al establecer protocolos de desinfección eficientes la introducción de los explantes se vuelve viable y están listos para ser inoculados en medios de cultivo semisólidos con los nutrientes apropiados para promover su desarrollo. Además, el medio de cultivo fue suplementado con auxinas como reguladores de crecimiento debido a que tienen capacidades mutagénicas capaces de formar agrupamientos de células conocidos como callo (Ubidia, 2019). Por otro lado, la incubación se realizó bajo condiciones ambientales controladas con el fin de proporcionar un ambiente similar a un ambiente natural (Llorente, 2005).

Explante de tallo

Después de aplicar el protocolo de desinfección se obtuvo un porcentaje de material viable del 75 % (Figura 5). La formación de callo se observó a partir del día 15 (Figura 10a) con medio de cultivo MS suplementado con sacarosa y 2,4-D; por otro lado, la formación completa del callo hasta el día 45 se puede observar en la Figura 10. Los callos se cambiaron de medio de cultivo bajo las mismas condiciones y suplementos cada 30 días lo que permitió que su tamaño aumente (Figura 10b) y se pudiera multiplicar.

Explante de hoja

Después de aplicar el protocolo de desinfección se obtuvo un porcentaje de material viable del 80 % (Figura 8). Sin embargo, el medio de cultivo MS suplementado con TDZ establecido por Fernández (2018) no fue efectivo ya que no se observó la formación de callo después de 6 meses de incubación a condiciones ambientales controladas. Como segundo recurso se modificó el medio de cultivo cambiando el TDZ por 2,4D, sin embargo, tampoco se indujo la callogénesis (Figura 11), pero los explantes se oscurecieron debido a la acción del 2,4-D y los compuestos fenólicos (Azofeifa, 2009). Según Fajardo et al., (2020), la

formación de callo puede ser interrumpida por la presencia de flavonoides en las hojas de cacao ya que estos compuestos son inhibidores del transporte de auxinas. Existen diferentes estudios donde se obtuvo callo a partir de explantes de hoja de cacao, pero con otra especie de cacao. Ortega (2022), establece el cultivo *in vitro* a partir del cacao híbrido CCN-51 en medio de cultivo MS suplementado con TDZ; sin embargo, a los 30 días se realiza un cambio de medio de cultivo a WPM (Tabla 8) y 2,4-D como regulador de crecimiento y se obtuvo un a formación de callo del 73 %.

Tabla 10. Medio de cultivo WPM usado por Ortega (2022)

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	400,000
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio dihidratado	96,000
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado	370,000
	KH_2PO_4	Sulfato de potasio	170,000
	$\text{Ca}[\text{NO}_3]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Nitrato de calcio tetrahidratado	556,000
	K_2SO_4	Fosfato de potasio	990,000
Microelementos	H_3BO_3	Ácido bórico	6,200
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22,300
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinc heptahidratado	8,600
	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sodio bihidratado	0,025
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre pentahidratado	0,025
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de hierro heptahidratado	27,800
	FeNaEDTA	Sal férrica sódica de ácido	37,300

Vitaminas	Inositol		0,100
	Tiamina		10,000
	Piridoxina		0,500
	Ácido nicotínico		0,500
	Agua de coco		50,000
	2,4-D	Ácido 2,4- diclorofenoxiacético	1,980
Carbohidratos	KIN	Kinetina	0,300
	Glucosa		20000,000

Cuantificación de cadmio retenido en callo de *Theobroma cacao* L.

Para la determinación de cadmio se usó una longitud de onda de 288.800 nm y la lámpara con una energía de 43. Se construyó una curva de calibración a partir de la solución madre realizada con estándar de cadmio de grado analítico (Tabla 3) donde estadígrafo R^2 indica que el modelo ajustado explica el 99,99 % de la variabilidad en la absorbancia (Figura 12). Según Quero et al., (2017), el coeficiente de correlación indica que existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración, es decir, la linealidad es adecuada.

La primera concentración de estándar de cadmio con la que se estresó el callo del explante de tallo fue $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabla 2), a diferentes condiciones (Tabla 5), por lo que se pudo observar que la agitación no representa una variable de alto impacto ya que al determinar el porcentaje de masa de cadmio retenido no presenta valores variables (Tabla 5). Por otro lado, al analizar el comportamiento de las células frente a dos tipos de pH se considera que esta es una variable de alto impacto ya que al trabajar con un pH menos ácido el porcentaje de masa de cadmio retenido por el callo aumentó (Tabla 5). Romero-Estévez et al., (2023) estable que la acumulación de cadmio esta influenciada por el pH ya que este

influye en la forma química del metal como ion libre o complejo soluble. Además, a pH ácido existe menor contenido de materia orgánica por lo que existe mayor biodisponibilidad de cadmio ya que este se encuentra como catión (Cd^{2+}) y es soluble, siendo fácil de absorber ya que en esta forma química presenta un comportamiento similar a los elementos esenciales como Ca^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} (Vega, 2022). Finalmente, el tiempo de agitación de contacto de la solución de cadmio con el callo es otra variable importante ya que a mayor tiempo existe un mayor porcentaje de retención de la masa de cadmio; en un tiempo de 504 horas el porcentaje de retención es de 35,6 %, mientras que el porcentaje de retención a las 24 horas es de 10,8 % (Tabla 5), Además, a medida que aumenta el tiempo la variabilidad de la masa de cadmio retenida por el callo es menor (Tabla 6), mientras que a 24 horas la dispersión de los datos es considerable.

La segunda concentración de estándar de cadmio con la que se estresó el callo del explante de tallo fue con 2 mg L^{-1} (Tabla 2), a diferentes condiciones (Tabla 7), por lo que se pudo determinar que la agitación no representa una variable de alto impacto ya que el porcentaje de masa de cadmio retenido por el callo no presenta valores variables. Por otro lado, el pH se considera una variable de alto impacto ya que al trabajar con un pH menos ácido el porcentaje de masa de cadmio retenido aumentó (Tabla 7), sin embargo, a diferencia del primer caso a medida que el tiempo de agitación aumenta el porcentaje de masa de cadmio retenido disminuye por lo que es difícil determinar cómo interactúan las células frente al cadmio. En la Tabla 8 se puede observar que la variabilidad de la masa de cadmio retenida cambia con el tiempo, sin embargo, a las 48 horas los datos de cadmio retenido están más dispersos que aun mayor rango de tiempo, mientras que en 24 horas la dispersión es menor. El porcentaje de retención máximo es de 24,2 % en un tiempo de 24 horas, mientras que el porcentaje mínimo de retención es de 2,5 % en un tiempo de 504 horas.

La tercera concentración de estándar de cadmio con la que se estresó el callo del explante de tallo fue con 5 mg L^{-1} (Tabla 2), a pH 4, agitación horizontal y un tiempo de 96

horas (Tabla 7). Se determinó que el porcentaje de retención es 22,24 %, por otro lado, al contaminar con concentraciones más altas como se indica en la Tabla 2, la cantidad de cadmio retenido fue nula (Tabla 9).

Tabla 11. Masa de cadmio retenido en callo de explantes de tallo contaminado con 11 mg L⁻¹ de Cd a diferentes pH, agitación y tiempo.

pH	Agitación	Tiempo (h)	Cd inicial (µg)	Cd no retenido (µg)	Cd retenido (µg)
4	Horizontal	504	275	286,2	-11,2
5,7	Horizontal	96	275	293.1	-18,10

6. CONCLUSIONES

Los protocolos de desinfección establecidos para explantes de tallo y hoja fueron eficientes ya que se obtuvo el 75 y 80 % de material viable, respectivamente, para inducir a la callogénesis y posteriormente establecer las suspensiones celulares. Por otro lado, el medio de cultivo establecido para tallo fue óptimo debido a que se formó callo a partir del día 15 y se completó su formación al día 45; mientras que el medio de cultivo establecido para explantes de hoja no fue el adecuado ya que no se indujo a callogénesis y los explantes introducidos no presentaron cambios durante seis meses.

El cadmio retenido en las muestras de callo del explante de tallo fue cuantificado mediante espectroscopia de absorción atómica, bajo el método validado por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2012). El explante es capaz de acumular cadmio, sin embargo, los porcentajes de masa del metal retenido varían con concentración, presentando un comportamiento diferente a concentraciones bajas y altas. Trabajos de investigación en la literatura, reportan al cacao como un bioacumulador de metales pesados, sin embargo, existen poca información acerca del cacao como bioacumulador a nivel celular. Después de realizar este trabajo de investigación se concluye

que el cadmio es capaz de alojarse en células de tallos de cacao, pero no se pudo determinar el punto de saturación de cadmio en las células, ya que su comportamiento en respuesta a las diferentes concentraciones del metal varió bajo las mismas condiciones; por lo que es necesario seguir realizando investigación al respecto.

7. RECOMENDACIONES

Establecer un nuevo medio de cultivo para explantes de hoja siguiendo la metodología establecida por Ortega, (2022) y determinar si influye de alguna manera el tipo de cacao con el que se realiza la introducción de explantes.

Estresar las plantas con callo nuevo, de color cremoso ya que al ser un callo joven necesita más nutrientes por lo que va a retener mayor cantidad de cadmio y se podrá conocer cómo actúan realmente las células de *Theobroma cacao* L frente al cadmio.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnour, A., Valverde, L., & Aguilar, M. (2004). *Micropropagación de tres especies maderables de importancia económica y ecológica para Costa Rica*. 44. http://www.iiap.org.pe/Archivos/publicaciones/Publicacion_1679.pdf
- Acosta, M. M. (2007). Determinación de metales pesados en suelos agrícolas del valle del mezquital, hgo. *Universidad Autónoma Del Estado de Hidalgo*, 1–91.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153–175. http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf
- Bhalla, A., & Pannu, A. (2022). Are Ayurvedic medications store house of heavy metals? *Toxicology Research*. 11, 179–183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/toxres/tfab124>
- Cahuasqui, S. (2011). *Determinación de metales pesados (plomo, cadmio y níquel) en el cilantro (Coriandrum sativum L) en Aloag, cantón Mejía, provincia de Pichincha por*

espectrofotometría de absorción atómica de llama.

- Castillo, A. (2008). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA* 8, 1.
- Clemens, S. (2001). *Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis*. 212, 475–486.
- Dixit, V., Pandey, V., & Shyam, R. (2001). *Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea*.
- Fajardo, L., Figueredo, Y., Rosabal, U., Guardia, Y., Rodríguez, S., Silva, J. J., & Viera, Y. (2020). Contenido de polifenoles totales en callos de *Theobroma cacao* L. clon 'UF-650.' *Biología Vegetal*, 20(1), 63–72. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2074-86472020000100063&script=sci_arttext&tlng=en
- Fernández, F. A. (2018). *Efecto de reguladores de crecimiento en la inducción de callo embriogénico en láminas foliares de cacao (Theobroma cacao L.) variedad CCN 51 establecidas in vitro*. <http://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/6314>
- Gil Vargas, P. (2015). *Biomarcadores de exposición a metales pesados en musgo de la ZMVT*.
- González, Catalina. (2019). *EVALUACION DE LA CONCENTRACION MINIMA ACEPTABLE E IDENTIFICACIÓN DE METALES PESADOS PRESENTES EN EL GRANO DE CACAO DEL ECUADOR*. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/14153>
- González, César, Vallarino, A., Pérez, J., & Pfeng, A. (2014). *Biomarcadores: Guardianes de nuestro futuro ambiental* (INECC). Ecosur.
- Hanmugaraj, B., Malla, A., & Ramalingam, S. (2018). Cadmium Stress and Toxicity in Plants: An Overview. In *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants: From Physiology to Remediation*. Elsevier Inc, 1–17. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12->

- Hussain, C., & Kecili, R. (2020). Environmental pollution and environmental analysis. In *Modern Environmental Analysis Techniques for Pollutions*. Elsevier, 1–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816934-6.00001-1>
- Iannelli, M., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L., & Massacci, A. (2002). Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. In *Plan Physiol Biochem* (Vol. 40).
- Kumar, A., Subrahmanyam, G., Mondal, R., Cabral-Pinto, M., Shabnam, A., Jigyasu, D., Malyan, S., Fagodiya, R., Khan, S., & Yu, Z. (2021). Bio-remediation approaches for alleviation of cadmium contamination in natural resources. *Chemosphere*, 268(128855). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128855>
- Lallana, V., & Lallana, M. (2003). Inducción De Callos, Utilizando La Técnica De Cultivo “in Vitro.” *Manual de Practicas de Fisiología Vegetal*, 81–84.
- Llorente, B. (2005). Cultivo in Vitro. Cultivo De Células Y Tejidos Vegetales: Generalidades. *Servicio de Difusión de La Creación Intelectual Es El Repositorio Institucional de La Universidad Nacional de La Plata. Argentina*, 1–15.
- Llugany, M., Tolrà, R., Poschnrieder, C., & Barceló, J. (2007). Hiperacumulación de metales: ¿una ventaja para la planta y para el hombre? *Ecosistemas*, 16(2), 4–9.
- Masindi, V., & Muedi, K. (2018). Environmental Contamination by Heavy Metals. In *Heavy Metals*, 115–133. <https://doi.org/https://doi.org/10.5772/intechopen.76082>
- Méndez-Armenta, M., & Ríos, C. (2007). Cadmium neurotoxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23, 350–358. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.11.009>
- Méndez, P., Ramírez, G., César, A., Gutiérrez, R., Alma, D., & García, P. (2009). Plant Contamination and Phytotoxicity Due To Heavy Metals From Soil and Water. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 19–44.

- Mite, F., Carrillo, M., & Durando, W. (2010). Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas de Ecuador. *Xii Congreso Ecuatoriano de La Ciencia Del Suelo*, 17–19.
- Morales Intriago, F., Carrillo Zenteno, M., Ferreira Neto, J., Peña Galeas, M., Briones Caicedo, W., & Albán Moyano, M. (2018). Cadena de comercialización del cacao nacional en la provincia de Los Ríos, Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 11(1), 63–69. <https://doi.org/10.18779/cyt.v11i1.222>
- Mroginski, L., & Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*.
- Ortega, M. (2022). *Establecimiento in vitro de Cacao (Theobroma cacao L.) híbrido CCN-51 usando explantes foliares*. 1–29.
- Pernía, B., De Sousa, A., Reyes, R., & Castrillo, M. (2008). Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia*, 33, 112–119.
- Quero, P., Zorrilla, M., Morales, S., & Rodríguez, M. (2017). Determinación de la contaminación por metales pesados en suelos aledaños a la Empresa Electroquímica de Sagua. *Centro Azúcar*, 44(December 2020), 53–63. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612017000300006
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura* (Vol. 148).
- Romero-Estévez, D., Yáñez-Jácome, G. S., & Navarrete, H. (2023). Non-essential metal contamination in Ecuadorian agricultural production: A critical review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 115(September 2022). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104932>
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (2012). *No Title* (ed (ed.); 22nd ed.). EUA, APHA-AWWA-WEF.
- Ubidia, A. (2019). *Cultivo “in vitro” de tejidos vegetales*. Universidad de Ingeniería y

Tecnología. <https://utec.edu.pe/blog-de-carreras/bioingenieria/cultivo-vitro-de-tejidos-vegetales>

Vega, M. (2022). *Determinación de cadmio por espectroscopía de absorción atómica en suelos de cultivo de cacao, provenientes de la parroquia Convento, Chone-Manabí.*

Zenk, M. (1996). *Heavy metal detoxification in higher plants.* 179, 21–30.

9. ANEXOS

Anexo 1

Fórmula para determinar el porcentaje de masa de cadmio retenido en las células de *Theobroma cacao* L.

$$\% \text{ retenido} = \frac{\text{Cd inicial} - \text{Cd no retenido}}{\text{Cd inicial}} * 100 \quad \text{Ec. 2}$$