

EVALUACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE CADMIO EN CÉLULAS DE TOMATE DE ÁRBOL A TRAVÉS DE DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA INDIRECTA DE PÉPTIDOS RICOS EN CISTEÍNA

EVALUATION OF THE CADMIUM ACCUMULATION IN TAMARILLO CELLS BY INDIRECT ELECTROCHEMICAL DETECTION OF CYSTEINE-RICH PEPTIDES

**Marjorie Montero-Jimenez¹, Patricio Espinoza-Montero^{2,3*},
Mauricio Criollo³, Mónica Jadán⁴ & Lenys Fernández^{5,6*}**

Recibido: 30 marzo 2018 / Aceptado: 11 junio 2018

DOI: 10.26807/ia.v6i2.77

Palabras claves: Cisteína, contaminación con cadmio, péptidos, tomate de árbol, Voltamperometría Cíclica.

1 Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Ingeniería Química, Quito, Ecuador (marjorie.montero@epn.edu.ec)

2 *Escuela de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador (pespinoza646@puce.edu.ec).

3 Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Civil y Ambiental, Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental, Centro de Investigación y Control Ambiental, Quito, Ecuador (patoespinozamon@hotmail.com; mauricio.criollo@epn.edu.ec).

4 Universidad de las Fuerzas Armadas, Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura, Sangolquí, Ecuador (mbjadan@espe.edu.ec)

5 *Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela (lfernandez@usb.ve)

6 *Escuela Politécnica Nacional, Escuela de Formación de Tecnólogos, Quito, Ecuador (lenys.fernandez@epn.edu.ec)

Keywords: Cadmium pollution, Cyclic Voltammetry, Cysteine, Peptides, Tamarillo.

RESUMEN

Mediante la generación electroquímica de yodo se evalúa la acumulación de Cd(II) por células de tomate de árbol (*Solanum Betaceum*) a través de la detección de péptidos ricos en cisteína, compuestos sintetizados por la planta cuando está contaminada con metales. La curva de calibración obtenida indica un intervalo lineal de 0 a 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$, con un límite de detección de 4,82 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (3,3 σ/m). La concentración de péptidos en las suspensiones celulares incrementa conforme aumenta la concentración de CdSO_4 y el tiempo de exposición. Los resultados indican que las células de tomate de árbol acumulan cadmio. Durante 5 días de exposición a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CdSO_4 las células en suspensión aún no sufren la apoptosis. El método propuesto muestra características útiles para su implementación en el monitoreo de contaminación por metales pesados en plantas en crecimiento.

ABSTRACT

The accumulation of Cd(II) by tamarillo (*Solanum Betaceum*) cells was evaluated through the detection of cysteine-rich peptides. It was used the method of electrochemical generation of iodine. These compounds are synthesized in the plant when it is contaminated by metals. The calibration curve obtained indicates a linear range from 0 to 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with a detection limit of 4.82 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (3.3 σ/m). The concentration of peptides in cell suspensions increases with the CdSO_4 concentration and the exposure time. The results indicate that tamarillo cells accumulate cadmium. During 5 days of exposure and 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CdSO_4 , the cells of the suspension still do not suffer from apoptosis. The proposed method shows useful characteristics for monitoring heavy metals in growing plants.

INTRODUCCIÓN

El cadmio es un elemento que está presente en agua, suelos y fertilizantes. Las plantas no lo necesitan en su organismo, sin embargo, puede absorberse fácilmente a través de las raíces y en caso de plantas de consumo humano, transferirse a las personas a través de la cadena alimenticia (López et al., 2014; Šelešovská et al., 2007). La ingesta de alimentos contaminados con metales pesados de forma prolongada puede causar un grave impacto en la salud de los seres vivos ya que estos son bioacumulables y muy tóxicos (Reyes et al., 2016).

Cuando la planta está contaminada con este tipo de metales, se altera el equilibrio redox y espontáneamente generan péptidos ricos en cisteína como fitoquelatinas y glutatión, con la finalidad de mantener el equilibrio intracelular para que las funciones de la célula (la transducción de señales, el metabolismo y la regulación de genes) no se alteren (Lv et al., 2016; Šelešovská et al., 2007).

Existen varios métodos de detección de péptidos ricos en cisteína como la

fluorescencia (Niu et al, 2012), cromatografía (Careser et al, 2001), colorimetría (Li et al, 2014) y espectroscopia de masas (Dieckhaus et al., 2005); estos métodos resultan ser costosos, requieren de un tiempo relativamente largo de análisis y tratamientos laboriosos de la muestra (Ju, Zhan & Chen, 2016; Lv et al., 2016.). Las técnicas electroquímicas como alternativa tienen una alta aceptación debido a la sensibilidad que presentan y a los tiempos cortos de respuesta para realizar una medida, además de ser técnicas económicas (Wang et al., 2017).

Los halógenos reaccionan con los organosulfuros, donde es de interés la reacción con el grupo tiol. El yodo tiene la ventaja de ser selectivo de modo que solo reacciona con el sulfuro en estado reducido para la oxidación de RSH (péptido reducido) a RSSR (péptido oxidado) (Anjum et al., 2014; González, Valero & Compton, 2016). La reacción de oxidación se puede monitorear electroquímicamente en presencia de yodo utilizando electrodos de platino (Valero et al. 2016). El platino tiene propie-

dades catalíticas y resistencia a la corrosión, lo que ha hecho que se emplee en la construcción de sensores electroquímicos (Xu & Zhang, 2014; Bentley et al., 2013). El método ha sido aplicado en hojas de alverjas (González et al., 2016).

Fojta et al., (2006) estudió la contaminación por cadmio en extractos celulares de tabaco para cuantificar los niveles de péptidos ricos en cisteína. Sin embargo, no existen reportes en la literatura de estudios en tomate de árbol (*Solanum Beta-ceum*), el cual es un fruto que se produce en varias ciudades de Ecuador y se comercializa en mercados locales (León, Viteri & Cevallos, 2004). El tomate de árbol es una planta de gran interés en Latinoamérica y algunos países de Europa, por su contenido nutricional en vitaminas (provitamina A, vitamina B6 y vitamina C) y en minerales esenciales (Ca, Fe, P y Mg) (Aharana, Cabrera & Torres, 2010; Sandoval & Calispa, 2015; Torres, 2012), sin embargo, por el uso de pesticidas, fertilizantes, mal manejo de suelos o agua, existe la posibilidad de contaminación en las frutas, en especial de metales pesados (Martí, Burba & Cavagnaro, 2002).

La cuantificación de péptidos ricos en cisteína a nivel celular es de importancia, debido al control que se puede lograr a nivel de laboratorio de parámetros como la temperatura, número de células y los nutrientes que se suministran; además se puede conocer aspectos del cultivo como el comportamiento metabólico. Además, los tiempos de crecimiento de las células son menores que la planta (Sánchez y Alvarenga, 2015), lo que conlleva a un rápido diagnóstico para generar conocimiento de este tipo de sistemas, que en el futuro permita escalar el estudio al monitoreo real en plantas ya desarrolladas y formadas. En este trabajo, se propone estudiar la detección electroquímica indirecta de péptidos ricos en cisteína en células de tomate de árbol.

El método fue optimizado utilizando “glutación”, como péptido modelo de mayor abundancia en la naturaleza, a través de la generación de yodo electroquímicamente y siguiendo su reacción con el péptido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los reactivos empleados fueron grado analítico y las soluciones preparadas con agua ultra pura de 18 M Ω cm⁻¹. Bacto Agar (Biomark). Macronutrientes: CaCl₂ (Fisher Chemical, 100 %), KH₂PO₄ (Himedia, 99 %), KNO₃ (Merck, 99 %) MgSO₄·7H₂O (Mallinckrodt Chemicals, 100 %) y NH₄NO₃ (Merck, 98,5 %). Micronutrientes: CoCl₂·6H₂O (Sigma, 100 %), CuSO₄·5H₂O (Himedia, 99,5 %), FeNaEDTA (Sigma, 99 %), H₃BO₃ (AMP, 99,8 %), KI (Fisher Scientific, 99,5 %), MnSO₄·H₂O (Himedia, 98 %), Na₂MoO₄·2H₂O (Fisher Chemicals, 99,8 %) y ZnSO₄·7H₂O (Lobachemie, 99,5 %). Vitaminas: glicina (Sigma, 99 %), mio-inositol (Lobachemie, 99 %), ácido nicotínico (Lobachemie, 99,5 %), piridoxina HCl (Sigma, 99 %) y tiamina HCl (Lobachemie, 99 %). Fitohormonas: 2,4-D (Lobachemie, 98 %), ANA (Lobachemie, 99 %). Para evaluar del método: KI (HVO, 100 %), H₂SO₄ (Merck, 98 %), K₂SO₄ (Sigma, >98 %), L-Glutatión reducido (Sigma, >98 %), NaCl (Baker, 100 %), KCl (Merck,

>99,5 %) y Na₂HPO₄ (Fisher Scientific, 100 %).

Obtención de extractos celulares

Se sembraron semillas de tomate de árbol "*in vitro*". Las semillas se colocaron en alcohol al 70 % durante 3 min, luego se lavó con agua destilada estéril, seguido se lavó con hipoclorito de sodio al 2,5 % con 4 gotas de tween 20 durante 15 min, finalmente se enjuagó con agua destilada estéril (Borrero, 2007). Las semillas desinfectadas se sembraron en el medio de cultivo Murashige and Skoog (MS), suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 7,5 g L⁻¹ de agar. Las semillas fueron expuestas a un fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad, para posteriormente realizar la multiplicación de brotes (Aharana et al., 2010). Se tomaron explantes de hojas y tallos para inducir a la formación de callo embriogénico, se empleó medio MS suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 7,5 g L⁻¹ de agar y con diferentes concentraciones de auxinas inductoras de callo: 0,5 y 1 mg L⁻¹ de ácido 2-dicloro fenoxiacético (2,4-D) y 5 y 7 mg L⁻¹ de ácido naftalenacé-

tico (ANA). Para el análisis estadístico se utilizó un diseño experimental completamente al azar con un solo factor categórico (Aharana, et al., 2010). Se cortó la parte suave del callo y se colocó en MS suplementado con la sacarosa y auxina (sin el agar) en las mismas condiciones en las que se produjo el callo y se expuso a agitación orbital. A continuación, se conformó un subcultivo de las suspensiones celulares para eliminar grumos no disgregados, mediante una dilución 1 a 3. Dos semanas después se realizó un conteo de células con la cámara de Neubauer en 5 muestras durante 5 días y se midió la turbidez de las suspensiones celulares (Sánchez & Avarenga, 2015).

Optimización del método analítico

Se realizaron voltametrías cíclicas sobre electrodos de platino, utilizando una celda de un compartimiento y tres electrodos, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un contraelectrodo de grafito (5 cm de largo) (Lee, Goncalves & Compton, 2015). Se empleó glutatión como péptido modelo en concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$. El electrolito soporte

fue K_2SO_4 0,2 mol L^{-1} con KI 1 mmol L^{-1} (Lv et al., 2016). La curva de calibración con mejor coeficiente de determinación se obtuvo realizando Voltametrías Cíclicas del blanco previa medida del analito (Barrio et al, 2005; Grajales, Palacios & López, 2007). Se realizaron pruebas de repetibilidad, para lo cual un técnico midió una muestra tres veces el mismo día y pruebas de reproducibilidad, para lo cual se midió una muestra tres veces en días diferentes y por técnicos diferentes (Rodríguez, Hung & Lavaut, 2009; Boqué et al., 2002).

Medición de contaminación por cadmio en las suspensiones celulares

Las mediciones se realizaron empleando curvas de calibración por adición estándar con un volumen de muestra de 2 mL (Fojta et al., 2006), en un medio suplementado con sulfato de potasio 0,2 mol L^{-1} (o sulfato de cadmio) y yoduro de potasio 1 mmol L^{-1} (González et al., 2016), mediante Voltametría Cíclica en un Potenciostato (CH Instruments).

RESULTADOS

La Tabla 1, resume los porcentajes de muestras sembradas que generaron callo embriogénico; los medios 1 y 2 corresponden a aquellos que tienen 0,5 y 1 g L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente mientras que los medios 3 y 4 corresponden a los que contienen 5 y 7 g L⁻¹ de ANA, respectivamente.

Tabla 1. Porcentaje de formación de callo embriogénico

Medio	Tallo		Hojas	
	% 1	% 2	% 1	% 2
1	70	65	10	10
2	90	95	0	10
3	30	40	50	50
4	10	10	25	30
Valor p	0,002		0,0011	

En la Figura 1, se muestran fotografías de las plantas y callos de tomate de árbol a diversos tiempos de siembra.

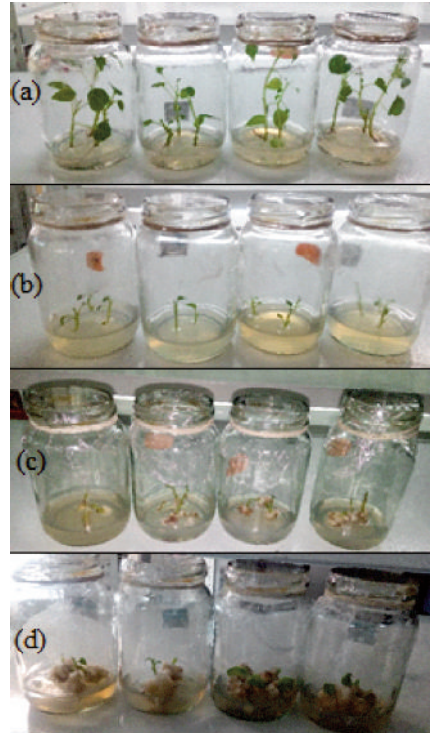


Figura 1. Imágenes de (a) plantas, (b) siembra de tallos, (c) callo de dos semanas y (d) callo de 4 semanas

La Figura 2 muestra la curva de crecimiento de las células y su relación con la turbidez.

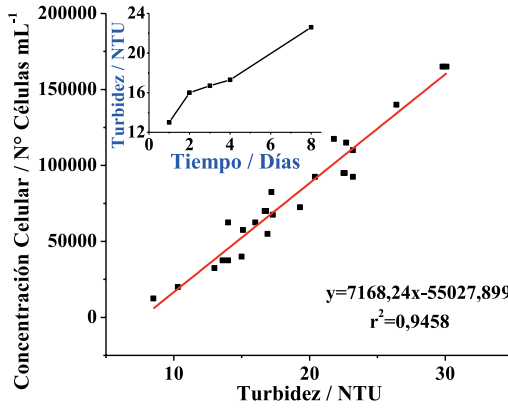


Figura 2. Número de células versus turbidez de la suspensión

La Figura 3 muestra imágenes de las células en el microscopio óptico.



Figura 3. Imágenes de las suspensiones de tomate de árbol en el microscopio óptico (10x)

La Figura 4, muestra las voltametrías cíclicas de 1 mmol L⁻¹ de KI en ausencia (Blanco) y en presencia de glutatión reducido.

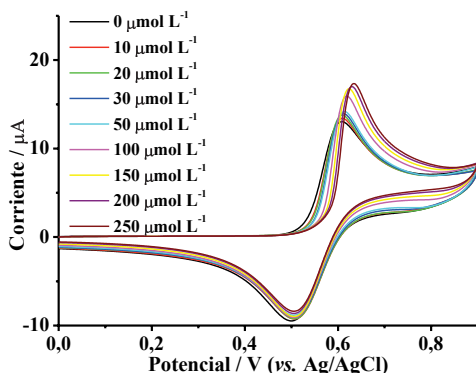


Figura 4. Voltametrías cíclicas de una solución 1 mmol L⁻¹ de KI en presencia de diferentes concentraciones de glutatión reducido, a una velocidad de barrido de 0,1 V s⁻¹

En la Figura 5 se muestra la curva de calibración construida sobre el electrodo de Pt.

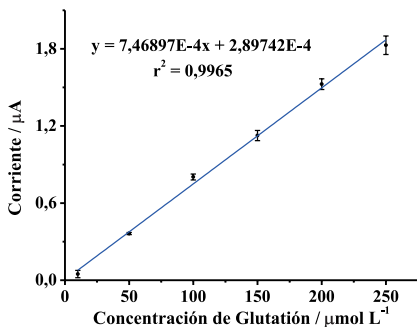


Figura 5. Curva de calibración de glutatión reducido

La Tabla 2 muestra el coeficiente de variación para la repetibilidad, reproducibilidad y el coeficiente de determinación.

Tabla 2. Resultados de la repetibilidad, reproducibilidad y linealidad

Parámetro	Aceptación*	Resultado
Repetibilidad	CV < 2 %	1,57 %
Reproducibilidad	CV < 3 %	2,25 %
Linealidad	r ² > 0,98	0,9965

* De acuerdo con lo reportado por Vázquez, 2008.

La Figura 6 muestra la relación de la concentración de péptidos ricos en cisteína en función del tiempo de exposición de las células, a diferentes concentraciones de CdSO_4 .

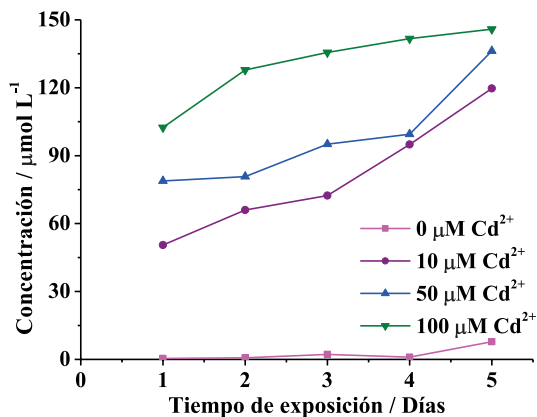


Figura 6. Relación entre la concentración de péptidos y el tiempo de exposición

DISCUSIÓN

Obtención de los extractos celulares

Las semillas germinaron seis semanas a partir de la siembra (Figura 1.a), seis semanas después de la germinación se realizó la primera multiplicación de brotes (Figura 1.b). Debido a que el valor p (Tabla 1) es menor a 0,005 se concluye con un 95 % de confianza, que entre los tratamientos aplicados para la formación de callo embriogénico en los explantes que al menos un

tratamiento es mejor que los demás. El callo (Figura 1.c y 1.d), creció a partir de la segunda semana; aquel que se formó a partir de hojas es más pequeño y tiene un tiempo de vida de cuatro semanas, en contraste el formado a partir de tallo tiene tiempo de vida de hasta seis semanas. Al utilizar los tallos de la planta hay un mayor porcentaje de formación de callo que al usar hojas, motivo por el que se eligió trabajar con el tallo de la planta,

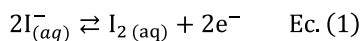
en el medio que presenta mayor porcentaje de muestras que generan callo (medio MS suplementado con 30 g L⁻¹ de azúcar y 1 mg L⁻¹ de 2,4-D). El callo inducido de tallos crece a partir de la segunda semana. Con un callo de cuatro semanas se realizaron las siembras en medio líquido para la formación de suspensiones celulares.

La turbidez de las suspensiones tiene una relación directamente proporcional con el número de células (Figura 2). En el inserto de la Figura 2 se puede observar que la turbidez aumenta con el paso del tiempo, lo que indica que las células se reproducen en el medio líquido MS suplementado con 30 g L⁻¹ de azúcar y 1 mg L⁻¹ de 2,4-D.

En la Figura 3, se puede observar que las células no forman grandes agrupaciones, lo que sugiere que las suspensiones están listas para realizar el monitoreo, ya que por definición, las suspensiones celulares son células libres dispersas en medio líquido que se mantiene en movimiento (Carrera, 2014).

A medida que aumenta la concentración del analito (Figura 4), la altura

del pico de oxidación correspondiente a la transformación de I⁻ a I₂ a 0,6 V aumenta, y el pico de reducción a 0,5 V disminuye, producto del proceso catalítico del reactivo en el medio (KI) que hace posible la oxidación del péptido. Los resultados sugieren que se puede seguir la señal para la medición del péptido, de acuerdo con las siguientes reacciones (González et al., 2016; Lee, et al., 2015):



La curva de calibración (Figura 5) construida sobre el electrodo de Pt arrojó un coeficiente de determinación $r^2 = 0,9972$. El límite de detección fue 4,82 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (3,3 σ/m) y el límite de cuantificación 15,41 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (10 σ/m). La Tabla 2 muestra que los parámetros analizados están dentro de los criterios de aceptación expuestos por Vázquez en el 2008, es decir el método puede considerarse confiable.

Evaluación de la contaminación por cadmio en las suspensiones celulares

Las medidas expuestas en la Figura 6, se realizaron mediante curvas de calibración por adición estándar para minimizar los efectos de la matriz de las muestras (Boqué, 2005). Cuando las células están libres de cadmio, las concentraciones de péptidos ricos en cisteína son cercanas a cero, lo que indica que las células no están expuestas a algún tipo de contaminación o estrés. A medida que pasan los días de exposición, las concentraciones de péptidos presentes en las muestras incrementan con el aumento de la concentración de cadmio. Las células expuestas a la mayor concentración de CdSO_4 ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) presentan un incremento significativo en la generación de péptidos solo hasta el tercer día; los siguientes días los valores fueron muy parecidos, lo que indica que las células próximamente entrarán en la apoptosis (muerte celular programada), ya que se ha reportado que la concentración de péptidos se mantiene constante antes que la célula induzca su muerte, y en el momento de la

muerte existe un incremento en la concentración del péptidos (Fojta et al., 2006). En nuestros estudios, este aumento brusco en la señal que se sigue, no se manifestó. Las medidas indican que el cadmio ingresa a la estructura de las células y por ende se acumula dentro de ellas.

De acuerdo con estos resultados preliminares, consideramos que el método puede ser utilizado para el monitoreo de la contaminación por metales pesados de plantas completamente formadas. Un estudio en la planta completamente formada permitiría determinar si el cadmio llega a los frutos de esta. Acosta & Pozo (2013), realizaron estudios de cadmio en cacao, y López (2017) de cadmio en soya. En las dos investigaciones, se determinó que las plantas de prueba son capaces de acumular cadmio. Se espera que el tomate de árbol no acumule cadmio en los frutos, debido a que Narváez et al. (2013), reportaron que en plantas de tomate de riñón expuestas a lodos residuales con metales pesados, no se encontró presencia de metales pesados en los frutos.

CONCLUSIONES

La detección de péptidos ricos en cisteína mediante voltametría cíclica en presencia de yodo, es una tecnología que permite alcanzar límites de detección de péptidos ricos en cisteína de $4,82 \mu\text{mol L}^{-1}$ y un límite de cuantificación de $15,41 \mu\text{mol L}^{-1}$. Al aplicar esta técnica en la cuantificación de péptidos en células de tomate de árbol cultivadas *in-vitro* se verificó que estas acumulan cadmio, mediante la cuantificación de péptidos

en las suspensiones celulares. La concentración de péptidos incrementa conforme aumenta la concentración de CdSO_4 y el tiempo de exposición. Con $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ CdSO_4 y 5 días de exposición las células de la suspensión aún no sufren la apoptosis. Por lo tanto, el método evaluado es confiable para medir péptidos ricos en cisteína en sistemas reales.

LISTA DE REFERENCIAS

- Acosta, S., & Pozo, P. (2013). Determinación de cadmio en la almendra de cacao (*Theobroma cacao*) de cinco fincas ubicadas en la vía Santo Domingo-Emeraldas, mediante espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito. *infoANALÍTICA*, 1(1). 69-82.
- Anjum, N., Aref, I., Duarte, A., Pereira, E., Ahmad, I., & Iqbal, M. (2014). Glutathione and proline can coordinately make plants withstand the joint attack of metal (loid) and salinity stresses. *Frontiers in plant science*, 162(5), 1-4.
- Arahana, V., Cabrera, A., & Torres, M. (2010). Propagación de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) vía embriogénesis somática. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, 2(2), B16-B21.
- Barrio, J., Cano, E., Arroyo, M., Pardo, A. I., Chamón, J., & Madrid, A. U. (2005). Investigación sobre el proceso de estabilización y limpieza por reducción potencioestática de un plomo epigráfico romano. In *Actas del II Congreso del Grupo Español del IIC. Investigación en Conservación y Restauración, Barcelona [CD]*.
- Bentley, C., Bond, A., Hollenkamp, A., Mahon, P., & Zhang, J. (2013). Concentration and electrode material dependence of the voltammetric response of iodide on platinum, glassy carbon and boron-doped diamond in the room temperature ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromethanesulfonyl) imide. *Electrochimica Acta*, 109, 554-561.
- Boqué, R. (2005). La selectividad en análisis químico. *Técnicas de Laboratorio*, 299, 878-881.
- Boqué, R., Maroto, A., Riu, J., & Rius, F. X. (2002). Validation of analytical methods. *Grasas y Aceites*, 53(1), 128-143.
- Borrero, M. (2007). *Protocolo para la Regeneración a partir de Explantes de Hojas de Cinco Variedades de Ecuatorianas de Tomate de Árbol (Solanum Betaceum)*. Recuperado de: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/795/1/84516.pdf>

- Carrera E. (2014). Establecimiento de suspensiones celulares a partir de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth y estudio del efecto de la hormona GA₃ en germinación “*in vitro*” de sus semillas. Recuperado de: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/9778/T-ESPE-048703.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cereser, C., Guichard, J., Drai, J., Bannier, E., Garcia, I., Boget, S., & Revol, A. (2001). Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 752(1), 123-132.
- Dieckhaus, C. M., Fernández-Metzler, C. L., King, R., Krolikowski, P. H., & Baillie, T. A. (2005). Negative ion tandem mass spectrometry for the detection of glutathione conjugates. *Chemical research in toxicology*, 18(4), 630-638.
- Fojta, M., Fojtová, M., Havran, L., Pivoňková, H., Dorňák, V., & Šestáková, I. (2006). Electrochemical monitoring of phytochelatin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells exposed to sub-cytotoxic and cytotoxic levels of cadmium. *Analytica Chimica Acta*, 558(1), 171-178.
- González, M., Valero, E., & Compton, R. (2016). Iodine mediated electrochemical detection of thiols in plant extracts using platinum screen-printed electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 236, 1-7.
- Grajales, M., Palacios, F., & López, J. E. (2007). Disolución de platino en ácido clorhídrico inducida por voltaje alterno. *El hombre y la máquina*, (28). 46-53.
- Ju, J., Zhang, R., & Chen, W. (2016). Photochemical deposition of surface-clean silver nanoparticles on nitrogen-doped graphene quantum dots for sensitive colorimetric detection of glutathione. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 228, 66-73.
- Lee, P., Goncalves, L., & Compton, R. (2015). Electrochemical determination of free and total glutathione in human saliva samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 221, 962-968.

- León, F., Viteri, D., & Cevallos, A. (2004). *Manual del cultivo de tomate de árbol*. Recuperado de: <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/827/4/iniapscm61.pdf>
- Li, M., Wu, X., Wang, Y., Li, Y., Zhu, W., & James, T. D. (2014). A near-infrared colorimetric fluorescent chemodosimeter for the detection of glutathione in living cells. *Chemical Communications*, 50(14), 1751-1753.
- López J. D. (2017). *Determinación de Cadmio y Plomo en Soya (Glycine Max L.) En grano, en polvo y líquida comercializada en la ciudad de Guayaquil-Ecuador* (Tesis de grado), Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil, Ecuador.
- López, M., Arbona, V., Pérez, R., Zandalinas, S., & Gómez, A. (2014). Effect of cadmium and calcium treatments on phytochelatin and glutathione levels in citrus plants. *Plant Biology*, 16(1), 79-87.
- Lv, Y., Yang, L., Mao, X., Lu, M., Zhao, J., & Yin, Y. (2016). Electrochemical detection of glutathione based on Hg²⁺-mediated strand displacement reaction strategy. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 664-668.
- Martí, L., Burba, J. & Cavagnaro, M. (2002). Metales pesados en fertilizantes fosfatados, nitrogenados y mixtos. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*. XXXIV (2).43-48.
- Narváez-Ortiz, W. A., Benavides-Mendoza, A., Robledo-Torres, V., & Mendoza-Villareal, R. (2013). Efectividad del lodo textil en la producción y composición química del fruto de tomate. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(1), 129-141.
- Niu, L. Y., Guan, Y. S., Chen, Y. Z., Wu, L. Z., Tung, C. H., & Yang, Q. Z. (2012). BODIPY-based ratiometric fluorescent sensor for highly selective detection of glutathione over cysteine and homocysteine. *Journal of the American Chemical Society*, 134(46), 18928-18931.
- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Díaz, M., & González, E. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Ingeniería Investigación y Desarrollo*, 16(2), 66-77.

- Rodríguez, J. R., Hung, M., & Lavaut, M. G. (2009). Validación del método de determinación de uniformidad de contenido en tabletas de Dipirona de 300 mg en el laboratorio farmacéutico oriente. *Revista Cubana de química*, 21(2), 66-69.
- Sánchez, L., & Alvarenga, S. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC (uña de gato). *Revista Tecnología en Marcha*, 28(1), 105-120.
- Sandoval, C. & Calispa, A. (2015). *Guía de buenas prácticas agrícolas para el tomate de árbol (Solamun Betaceum)*. Resolución Técnica N°-0038. Recuperado de: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/inocuidad/guia-tomate-arbol-min.pdf>
- Šelešovská, R., Fojta, M., Navrátil, T., & Chýlková, J. (2007). Brdička-type processes of cysteine and cysteine-containing peptides on silver amalgam electrodes. *Analytica chimica acta*, 582(2), 344-352.
- Torres, A. (2012). Caracterización física, química y compuestos bioactivos de pulpa madura de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*)(Cav.) Sendtn. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 62(4), 381-388.
- Valero, E., González, M., Batchelor C., & Compton, R. (2016). Halogen mediated voltammetric oxidation of biological thiols and disulfides. *Analyst*, 141(1), 144-149.
- Vázquez, A. Validación de métodos analíticos. Recuperado de: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/14634/aydedvazquezmoreno.pdf?sequence=1>
- Wang, Z., Han, P., Mao, X., Yin, Y., & Cao, Y. (2017). Sensitive detection of glutathione by using DNA-templated copper nanoparticles as electrochemical reporters. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 238, 325-330.
- Xu, Y., & Zhang, B. (2014). Recent advances in porous Pt-based nanostructures: synthesis and electrochemical applications. *Chemical Society Reviews*, 43(8), 2439-2450.