

Citotoxicidad y genotoxicidad de nanopartículas de cobre sobre *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae)

Cristhian Rafael Escobedo Paredes¹, Juan Carlos Rodríguez Soto¹, Marisol Contreras Quiñones¹, Cinthya Aspajo Villalaz¹, Abhel Calderón Peña¹, Eduardo León Alcántara¹, Brian Enrique Cornejo Roque¹, Claver Wilder Aldama Reyna², Jhenry Agreda Delgado², Miguel Valverde Alva²

¹ Laboratorio de Citometría, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II, Trujillo, Perú.

² Laboratorio de Óptica y Láseres, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II, Trujillo, Perú.

* Autor para correspondencia: jrodriguez@unitru.edu.pe

Información de financiamiento

Este estudio fue financiado por los propios autores.

Declaración de disponibilidad de datos

Toda la data relevante a la investigación se muestra dentro del mismo manuscrito.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés alguno.

Contribución de los autores

C.E.: Recolección de datos, análisis e interpretación de los mismos; J.R.: Concepción, análisis e interpretación de los resultados y aprobación de la versión final; M.C.: Recolección de datos, análisis e interpretación de los mismos; C.A.: Recolección y análisis de los datos; A.C.: Recolección y análisis de los datos; E.L.: Recolección y análisis de los datos; B.C.: Recolección y análisis de los datos; C.A.: Diseño del montaje experimental y síntesis de las nanopartículas de cobre; J.A.: Diseño del montaje experimental; M.V.: Caracterización de las nanopartículas de cobre. Todos los autores han leído el manuscrito final y aprobado la revisión.

Recibido: 10 de Enero de 2020.

Aceptado: 20 de Febrero de 2020.

Publicado (digital): 30 Marzo 2020.

Publicado (impreso): 30 Abril 2020.

Cita bibliográfica:

Escobedo, C.; J. Rodríguez; M. Contreras; C. Aspajo; A. Calderón; E. León; B. Cornejo; C. Aldama; J. Agreda & M. Valverde. 2020. Citotoxicidad y genotoxicidad de nanopartículas de cobre sobre *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae). *Arnaldoa* 27(1): e108-e112. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27110>

Resumen: *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) constituye uno de los modelos biológicos más empleados y de gran utilidad para la evaluación del efecto citotóxico y genotóxico de diversas sustancias, motivo por el cual se determinó a través del Allium-test el efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sobre el tejido meristemático radicular de *A. cepa*, obteniéndose los índices mitóticos, de fases y de anomalías. Con la ayuda de la técnica de ablación láser pulsada en medio líquido se obtuvieron nanopartículas, posteriormente se las caracterizó haciendo uso de microscopio electrónico en la determinación dimensional y de forma. La preparación de las láminas con población celular meristemática radicular involucró la técnica de Tjio y Levan para su coloración y su lectura se realizó utilizando un microscopio óptico. Se emplearon tres concentraciones de nanopartículas de cobre (1,0ppm; 1,5ppm; 2,0ppm) además de un testigo (0ppm). El tratamiento con la concentración más alta (T4: 2,0ppm) produjo la mayor reducción de índice mitótico, metafásico, anafásico y telofásico, tanto para una como para cuatro horas de recuperación, alcanzando un índice mitótico de 4,9% y de 1,2% respectivamente, frente al tratamiento testigo con 13,0% y 13,4% respectivamente. Se observó un efecto genotóxico con la presencia de anomalías del material hereditario como puentes anafásicos, células binucleadas y telofases amorfas. El índice de anomalías con el T4 alcanzó 0,03% tanto para una y cuatro horas de recuperación respectivamente. Se concluyó que a mayor concentración de nanopartículas el índice mitótico disminuye significativamente y el índice de anomalías aumenta.

Palabras clave: *Allium cepa* L., citotoxicidad, genotoxicidad, nanopartículas de cobre, ablación láser.

Abstract: Cytotoxicity and genotoxicity of copper nanoparticles on *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae).

Allium cepa L. (Amaryllidaceae) is one of the most widely used and useful biological models for the evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of various substances, which is why the effect of different concentrations of copper nanoparticles on the meristematic root tissue of *A. cepa* was determined through the Allium-test, obtaining mitotic, phase and anomaly indices. With the help of the technique of pulsed laser ablation in liquid medium nanoparticles were obtained, later they were characterized using electronic microscopy in the dimensional and shape determination. The preparation of the plates with meristematic root cell population involved the technique of Tjio and Levan for its coloration and its reading was done using an optical microscope. Three concentrations of copper nanoparticles (1.0ppm, 1.5ppm, 2.0ppm) and one control (0ppm) were used. The treatment with the highest concentration (T4: 2.0ppm) produced the greatest reduction in mitotic, metaphasic, anaphasic and telophasic index, both for one and for four hours of recovery, reaching a mitotic index of 4.9% and 1.2% respectively, compared to the control treatment with 13.0% and 13.4% respectively. A genotoxic effect was observed with the presence of anomalies of the hereditary material such as anaphasic bridges, binucleated cells and amorphous telophases. The rate of abnormalities with T4 reached 0.03% for both one and four hours of recovery respectively. It was concluded that the higher the concentration of nanoparticles the mitotic index decreases significantly and the rate of abnormalities increases.

Keywords: *Allium cepa* L., cytotoxicity, genotoxicity, copper nanoparticles, laser ablation.

INTRODUCCIÓN

El *Allium-test* constituye uno de los modelos biológicos donde se puede determinar con alta precisión el efecto citotóxico y genotóxico de diferentes sustancias. Hoy en día se conocen los parámetros del desarrollo celular de *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae), constituyendo un excelente modelo biológico para detectar variaciones de sus índices (Rodríguez *et al.*, 2018). Al exponer a hidratación un bulbo de “cebolla” se estimula el crecimiento del tejido meristemático radicular; pero cuando se expone al bulbo en presencia de sustancias orgánicas o inorgánicas tóxicas la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células (Correa *et al.*, 2016).

Las alteraciones de la división celular generalmente se asocian al bajo crecimiento de la raíz, pero sobre todo a la alteración del desarrollo normal del tejido meristemático radicular que se puede comprobar con el diagnóstico microscópico, para establecer el índice mitótico e índice de aberraciones cromosómicas presentes (Kumari *et al.*, 2009). *A. cepa* L. al presentar pocos cromosomas ($2n=16$) facilita la evaluación de los posibles daños y/o alteraciones cromosómicas en el ciclo de la división celular (Correa *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2018).

Cuando las células del tejido meristemático de *A. cepa* se encuentran en equilibrio proliferativo, la duración de cada uno de los períodos del ciclo celular permanece constante; de esta forma, el número de células que están en una fase determinada es también constante y proporcional a la duración en tiempo de la misma; pero cuando se lleva a cabo en presencia de sustancias de desconocido efecto, la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse o acelerarse (Correa *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2009).

La nanociencia se define como el estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales a escala nanométrica, abarcando el diseño, caracterización y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de forma, tamaño y propiedades de la materia a escala nanométrica (Uribe & Rodríguez, 2007). En esta escala, la materia exhibe algunas propiedades que pueden ser diferentes de las propiedades tanto de átomos y moléculas como del material macroscópico. La aparición de estas propiedades se relaciona con la gran energía superficial y el mayor número de átomos superficiales, ya que cuanto más pequeña es una partícula, la fracción de átomos en la superficie aumenta (Gómez, 2013; Guozhong, 2004).

Las nanopartículas se caracterizan por tener un tamaño muy pequeño, en el orden de 1 a 100 nm y poseen propiedades únicas en relación con su naturaleza, tamaño, distribución, morfología y tendencia a la aglomeración (Uskokovic, 2013). Son utilizadas en diversos ámbitos como la industria, medicina, cosméticos, y otros productos comerciales, siendo liberadas potencialmente en diversas concentraciones al medio ambiente lo que puede convertirse en un problema ecotoxicológico en un corto tiempo (Weiss & Diabaté, 2011) teniendo además un riesgo directo para la salud humana (IRSLL, 2001).

Las nanopartículas de diferentes metales como las nanopartículas de cobre (NPsCu), exhiben excelentes

propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico. Las propiedades antimicrobianas del cobre, en general, han sido ampliamente demostradas frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Clostridium difficile* y *Mycobacterium tuberculosis*. Por otro lado, presenta acción antiviral a bajas concentraciones, contra virus influenza A y virus de inmunodeficiencia humana; además, tiene acción antifúngica demostrada contra *Candida albicans* (Quaranta *et al.*, 2011). Esta característica ha permitido que puedan ser utilizadas y aplicadas en diversas áreas como industrial, sanitaria y médica (Prado *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2009).

Todo ello sumado a su bajo costo hace que las NPsCu despierten un gran interés en multitud de campos, pero especialmente en los sectores biomédico y alimentario. Sin embargo, la absorción, transporte y toxicidad son parámetros en los cuales no se ha estudiado a profundidad (Krug & Wick, 2011), pero por sus características físicas y químicas podrían tener efectos tóxicos (Dietz & Herth, 2011). Metales como el Au, Cd, Hg, Ni y Zn, se unen a componentes celulares incluyendo proteínas con posibilidad de desnaturalizarlas, y otros metales como Cu y Fe forman reactivos aumentando el estrés oxidativo (Hall, 2002).

Corredor *et al.* (2009) en su investigación concluyen que las nanopartículas magnéticas son capaces de penetrar los tejidos vivos y de migrar a diferentes regiones de las plantas causando toxicidad. Otras investigaciones como los de Asli & Neumann (2009) en raíz de “maíz” (*Zea mays* L.) empleando nanopartículas de TiO determinar que la conductividad hidráulica es inhibida en un 10 por ciento. Kumari *et al.* (2009) analizaron el efecto de nanopartículas de plata en cebolla (*Allium cepa*) encontrando una disminución del índice mitótico cerca al 50%. Vannini *et al.* (2010) concluyen que las nanopartículas reducen la germinación de semillas de cebada (*Hordeum vulgare*), y en lino (*Linum asitatismsun*) reduce en el crecimiento de los brotes.

Es importante entonces determinar el efecto de las diferentes nanopartículas en sistemas biológicos ya que su reciente y creciente empleo nos hace propensos al contacto con ellas, ya sea por bioacumulación en los vegetales que consumimos o por contacto directo; por lo que en la presente investigación se buscó determinar el efecto citotóxico y genotóxico de diferentes concentraciones de NPsCu sobre poblaciones celulares de tejido meristemático radicular de *Allium cepa*.

MATERIAL Y MÉTODO

La obtención de las nanopartículas de cobre se realizó mediante la técnica de ablación láser pulsada en medios líquidos (Ageda & Aldama, 2016; Aldama *et al.*, 2018). Se irradió una placa de cobre de alta pureza sumergida en agua bidestilada durante 10 minutos, con disparos de láser pulsado (Nd:YAG) a longitud de onda IR de 1064 nm y 37,5 mJ/pulso a una razón de repetición de 10 Hz, obteniéndose nanopartículas esféricas de cobre con un tamaño promedio de 22 nm a una concentración de 2,0 ng/L obtenida por espectroscopia de absorción atómica (Rivera *et al.*, 2016).

El sistema biológico consistió en 40 bulbos de *A. cepa* “cebolla”, en los cuales se promovió el desarrollo de raíces

nuevas por estimulación en el disco germinativo e hidratación del bulbo, se utilizó agua de clorinada con renovación por cada 24 horas, aireación en relación a una hora por día y ausencia de iluminación. Seleccionándose más tarde aquellos bulbos que contengan más de 20 raicillas con longitud promedio de 2,5 cm. a fin de asegurar la cinética del ciclo celular (Miñano, 2016; Rodríguez *et al.*, 2018).

Se desarrolló un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones para cada tratamiento (0ppm; 1,0ppm; 1,5ppm; 2,0ppm). La aplicación de los tratamientos fue de una hora y la evaluación del efecto citotóxico pasado una hora de recuperación y la evaluación del efecto genotóxico pasado cuatro horas de recuperación. Posteriormente, las raicillas fueron cortadas y fijadas en solución de Carnoy´s. Luego se aplicó el método de Tjio & Levan (1956) para la coloración celular y en microscopio óptico se procedió al conteo celular determinándose el efecto citotóxico en base al índice mitótico y el efecto genotóxico por el índice de anomalías (Rodríguez *et al.*, 2018). Con los datos obtenidos se aplicó el respectivo análisis de varianza y comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de determinar el efecto de los tratamientos (0 ppm; 1,0 ppm; 1,5 ppm y 2,0 ppm.) sobre el ciclo celular en meristemas radiculares de *Allium cepa* L. se enfrentó a las raicillas de “cebolla” a una hora de exposición a las NPsCu y a un tiempo de recuperación de una y cuatro horas, obteniéndose los índices mitóticos, de fases y de anomalías (Tabla 1 y Tabla 2) localizando a microscopio células en interfase y en división celular (Fig.1 y Fig.2). El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y para cada una de las fases de la mitosis.

En la Tabla 1 como en la Tabla 2 los índices mitóticos del tejido meristemático radicular de *A. cepa* expuesto a diferentes concentraciones de NPsCu, con una y cuatro horas de recuperación respectivamente, mostraron una disminución significativa a razón de un aumento en la concentración de NPsCu. El T4 (2.0ppm) alcanzó un índice mitótico a una y cuatro horas de recuperación de 4,9% y 1,2% respectivamente, frente al testigo con 13,0% y 13,4%. Esta disminución significativa obedecería a que las NPsCu, a dichas concentraciones y tiempos evaluados, al entrar en el sistema biológico inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Khalid, 2015), las que actúan bajo el correspondiente, complejo ciclina B - CDK 1(FPM: Factor Promotor de la Mitosis), el mismo que

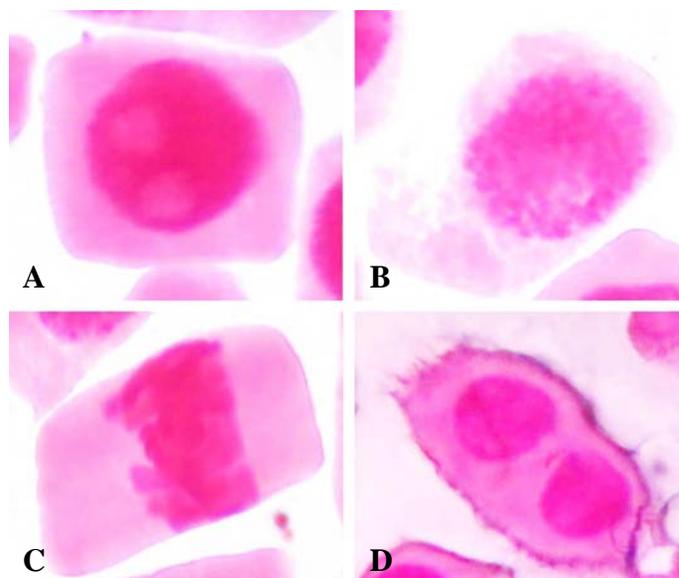


Figura 1. Fases normales del ciclo celular en tejido meristemático radicular de *Allium cepa*. Observadas a un aumento de 40 x en el conteo de los tratamientos con nanopartículas de cobre. A: célula en interfase. B: célula en profase. C: célula en metafase. D: célula en telofase.

ser afectado evita el tránsito normal de las células del periodo G2 hacia la mitosis (Klug *et al.*, 2013), observándose menor número de células en división. Es importante anotar que los índices a las cuatro horas son más reducidos que los de una hora de recuperación, lo que nos indica que la recuperación del índice mitótico del ciclo celular no se ha restablecido, sino que el efecto va en aumento.

En referencia a los índices de fases frente al testigo, a una y cuatro horas de recuperación (Tabla 1 y Tabla 2), se observa el aumento significativo del índice profásico y la consecuente disminución significativa de los índices metafásicos, anafásicos y telofásicos. A mayor concentración de NPsCu las disminuciones se hacen más notorias y significativas. Este comportamiento obedecería a que las NPsCu actuarían directamente sobre el ensamblaje del huso mitótico, específicamente sobre la formación de los centros de organización de microtúbulos (COMT) evitando el paso de profase a metafase, teniendo así mayor número de células en profase y menor número en metafase. Asimismo, las NPsCu estarían interviniendo sobre el accionar del complejo

Tabla 1. Índices mitóticos, índice de fases y anomalías del material hereditario en tejido meristemático radicular de *Allium cepa* L. expuestos a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre con una hora de recuperación.

Trat.	Índice Mitótico	Índice Profásico	Índice Metafásico	Índice Anafásico	Índice Telofásico	(%) de las anomalías
T1	13.0 ± 0.42	56.41 ± 1.74	13.12 ± 1.32	10.44 ± 1.39	20.02 ± 1.24	0 ± 0
T2	8.56 ± 0.31	64.96 ± 1.39	16.38 ± 1.66	8.35 ± 0.75	11.66 ± 0.60	0 ± 0
T3	8.37 ± 0.69	67.72 ± 1.15	10.19 ± 1.91	8.73 ± 1.36	13.37 ± 3.52	0.01 ± 0.05
T4	4.90 ± 0.70	84.03 ± 1.28	2.86 ± 1.75	1.08 ± 1.86	12.04 ± 1.42	0.03 ± 0.05

Leyenda: T1: 0ppm NPsCu, T2: 1,0ppm NPsCu, T3: 1,5ppm NPsCu, T4: 2,0ppm NPsCu

Tabla 2. Índices mitóticos, índice de fases y anomalías del material hereditario en tejido meristemático radicular de *Allium cepa* L. expuestos a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre con cuatro horas de recuperación.

Trat.	Índice Mitótico	Índice Profásico	Índice Metafásico	Índice Anafásico	Índice Telofásico	(%) de las anomalías
T1	13.4 ± 0.13	51.09 ± 3.28	17.17 ± 3.02	9.31 ± 0.30	22.43 ± 0.60	0 ± 0
T2	5.56 ± 0.62	96.53 ± 1.92	2.26 ± 1.98	0.60 ± 1.03	0.62 ± 1.07	0 ± 0
T3	4.09 ± 0.44	97.48 ± 2.57	1.71 ± 2.96	0.00 ± 0.00	0.81 ± 1.41	0.03 ± 0.06
T4	1.20 ± 0.46	100.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.06

Leyenda: T1: 0ppm NPsCu, T2: 1,0ppm NPsCu, T3: 1,5ppm NPsCu, T4: 2,0ppm NPsCu

promotor de anafase (APC) (Andrioli & Mudry, 2011; Kalcheva *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2018). Similares tendencias a una hora de recuperación se obtuvieron al evaluar el efecto citotóxico de otras sustancias sobre el mismo tejido radicular (Otiniano, 2014).

Las anomalías contabilizadas en la evaluación del tejido meristemático radicular de *A. cepa* obedecería a los posibles efectos genotóxicos inducidos por NPsCu, que por sus propiedades de forma y tamaño pueden unirse a la molécula de ADN desdoblado su molécula bicatenaria a su presentación simple (Gallego *et al.*, 2017; Railsback *et al.*, 2012), aumentando la citotoxicidad e inestabilidad genómica (Khalid, 2015) que se puede traducir con la presencia de puentes anafásicos, células binucleadas y telofases amorfas (Fig.2).

El efecto cleistogénico a nivel de las regiones teloméricas del DNA como resultado de la interacción con las NPsCu provocaría la presencia de puentes anafásicos (Fajardo, 2011). La inhibición por parte de las NPsCu a la fusión de vesículas del Aparato de Golgi obstaculizaría la formación del fragmoplasto, y por ende de la nueva pared celular, lo

que daría por resultado la presencia de células binucleadas (Beltran & Gonzales, 1995; Prieto *et al.*, 2005), en tanto la presencia de telofases amorfas se debería al accionar nocivo de las NPsCu en las diferentes estancias proteicas (Rodriguez *et al.*, 2018).

CONCLUSIÓN

Las nanopartículas de cobre, a las concentraciones trabajadas, tienen efecto citotóxico y genotóxico sobre el tejido meristemático radicular de *Allium cepa* L. "cebolla". A mayor concentración de nanopartículas el índice mitótico disminuye significativamente y el índice de anomalías aumenta; así mismo el número de horas de recuperación evaluadas no restableció los valores de índices mitóticos ni de anomalías.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT), al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC)

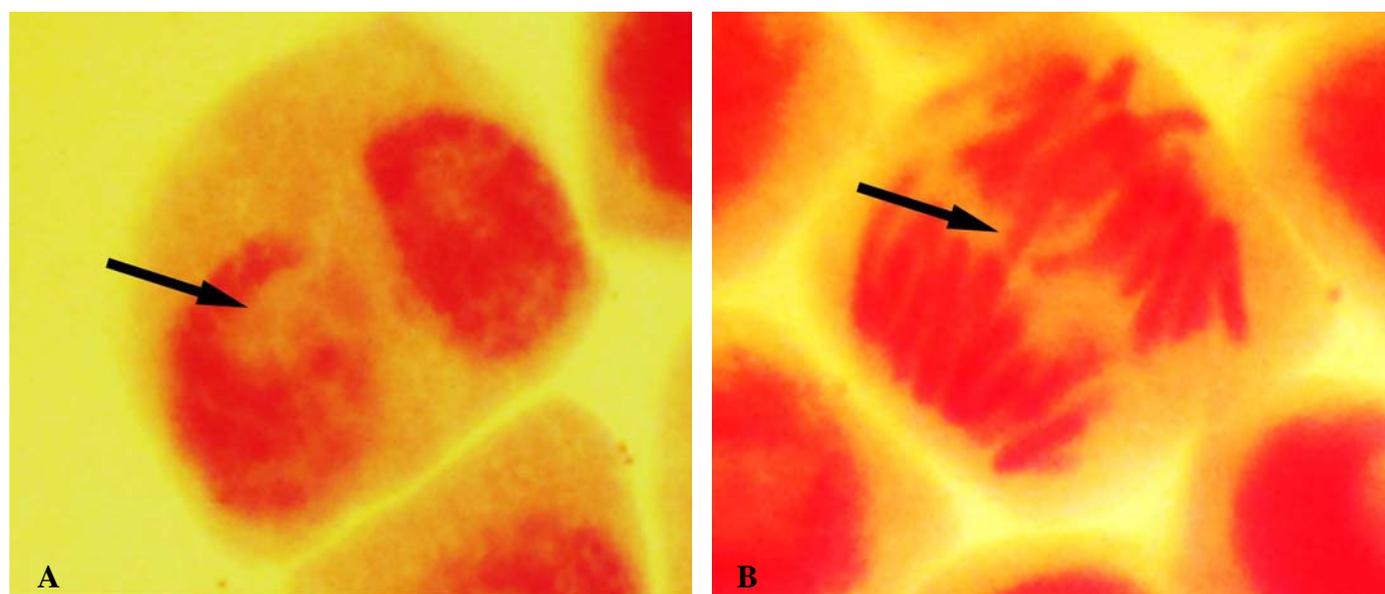


Figura 2. Anomalías del ciclo celular en tejido meristemático radicular de *Allium cepa* L. Observadas a un aumento de 40 x en el conteo de los tratamientos con nanopartículas de cobre. A: célula binucleada B: puente anafásico

y al Banco Mundial por el financiamiento de la presente investigación mediante el Proyecto "Síntesis de nanopartículas metálicas y su efecto sobre la regeneración biológica" con Contrato N° 013-2018-FONDECYT-BM-IADT-SE.

LITERATURA CITADA

- Agreda, J. & W. Aldama.** 2016. Estudio fotoacústico de los efectos del tiempo de ablación en la síntesis de nanopartículas de plata. *Ciencia y Tecnología*, 12(1): 17-26.
- Aldama, W.; J. Agreda; M. Valverde & L. Angelats.** 2018. Photoacoustic study of Changes in Optical Properties of Colloids with Silver Nanoparticles Produced by Laser Ablation. *International Journal of Applied Engineering Research*, 13(2):1408-1414.
- Asli, S. & P. M. Neumann.** 2009. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide NPs can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant Cell Environ*, 32: 577-584.
- Andrioli, N. B. & M. Mudry.** 2011. Cytological and cytogenetic effects induced by thiabendazole on *Allium cepa* root meristems. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 22(2):17-23.
- Beltran, R. & L. Gonzales.** 1995. Inducción de puentes cromosómicos permanentes en meristemos de *Allium cepa*. *Rebiol*, 15:9 - 17.
- Corredor, E.; P. S. Testillano; M. J. Coronado; P. González; R. Fernández; C. Marquina; M. R. Ibarra; J. M de la Fuente; D. Rubiales; A. Pérez & M. C. Risueño.** 2009. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situ subcellular identification. *BMC Plant Biol*, 9: 45-55.
- Correa, M. N.; V. Ventura & T. da Silva.** 2016. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. *Chemosphere*, 148: 481- 486.
- Dietz, K. J. & S. Herth.** 2011. Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science*, 16 (11): 582-589.
- Fajardo, K. J.** 2011. Efecto protector del extracto etanólico de *Lupinus mutabilis* sobre la citotoxicidad y genotoxicidad del dicromato de potasio en meristemos radiculares de *Allium cepa*. Tesis para optar el Título de Biólogo, Universidad Nacional de Trujillo.
- Gallego, I.; B. Manning; J. D. Prades; M. Mir; J. Samitier & R. Eritja.** 2017. DNA- Origami- Driven Lithography for Patterning on Gold Surfaces with Sub -10nm Resolution. *Adv. Materials*, DOI: 10.1002/adma.201603233.
- Gómez, F.** 2013. Síntesis de complejos y estabilización de nanopartículas de paladio con ligandos híbridos pirazólicos y carbenos N-heterocíclicos y su aplicación en catálisis (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Guozhong, C.** 2004. Nanostructures and Nanomaterials. Imperial College Press, Londres.
- Hall, J. L.** 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.*, 1 (11): 1-53
- IRSL.** 2001. Instituto Riojano de Salud Laboral Logroño. La Seguridad y Salud en la Exposición a Nanopartículas. Logroño Impreso en España - Med. segur. trab., 59: 1-50.
- Krug, H. F. & P. Wick.** 2011. Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50: 1260-1278.
- Klug, W. S.; M. R. Cummings; C. Spencer & M. A. Palladino.** 2013. Concepts of Genetics. Décima edición. Pearson New International Edition, España.
- Kumari, M., A. Mukherjee & N. Chandrasekaran.** 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci. Total Environ*, 42: 5243-5246.
- Khalid, M.** 2015. Forskolín: Genotoxicity assessment in *Allium cepa*. *Mutation Research*, 777: 29-32.
- Kalcheva Vanya, P.; P. Drgoeva Asya; N. Kalchev Karamfil & D. Enchev Dobromir.** 2009. Efectos Citotóxicos y genotóxicos de Br-que contiene oxaphosphole en células de la punta de raíz de *Allium cepa* L. y células de la medula ósea del ratón. *Genética y Biología Molecular*, 32(2): 389-393.
- Miñano, J.** 2016. Acción preventiva del extracto acuoso de *Petroselinum sativum* L "perejil" sobre el daño genotóxico inducido por una concentración de Azida de sodio sobre células meristemáticas de *Allium cepa* L. Tesis para optar el Título de Biólogo, Universidad Nacional de Trujillo.
- Otiniano, A.** 2014. Efectos de tres concentraciones hidroalcohólico de *Citrus limon* sobre el ciclo celular en meristemos radiculares de *Allium cepa*. Tesis para optar el Título de Biólogo, Universidad Nacional de Trujillo.
- Prado, J., A. Vidal & T. Durán.** 2012. Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica. *Rev Med Chile*; 140: 1325-1332.
- Prieto, Z.; R. Fernández; E. Polo; C. Quijano; J. León; L. Villegas; A. Tirado; R. Vallejo & J. Gallardo.** 2005. Daño cromosómico en meristemos radiculares de *Allium cepa* L, por efecto de azida de sodio. *Rebiol*, 25:31 - 36.
- Quaranta, D.; T. Krans; C. Espirito; C. Elowsky & D. Domaille.** 2011. Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol*; 77: 416-26.
- Railsback, J. G.; A. Singh; R. C. Pearce; T. E. McKnight; R. Collazo; Z. Sitar; Y. G. Yinglin & A. Melechko.** 2012. Weakly Charged Cationic Nanoparticles Induce DNA Bending and Strand Separation. *Advanced Materials*. DOI: 10.1002/adma.201104891.
- Ren, G.; D. Hu; E. Cheng; M. Vargas Reus; P. Reip & R. Allaker.** 2009. Characterization of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J antimicrob Agents*; 33:587-590.
- Rivera, J.; W. Aldama & E. V. Mejía.** 2016. Amplitud fotoacústica en función de la concentración de coloides con nanopartículas de oro obtenidos por ablación láser. *Ciencia y Tecnología*, 12(2): 77-89.
- Rodríguez, J.; C. Barazorda; L. Pollack; M. Contreras & C. Aldama.** 2018. Citotoxicidad y genotoxicidad de nanopartículas de oro sintetizadas por ablación láser sobre *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae). *Arnaldoa*, 25(3): 1015-1026.
- Uribe, G. & J. Rodríguez López.** 2007. La nanociencia y la nanotecnología: Una revolución en curso, Perfiles latinoamericanos: revista de la Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales, Sede México. 161-186.
- Uskokovic, V.** 2013. Entering the era of nanoscience: Time to be so small. *Journal Biomed Nanotechnol*; 9(9): 1441-1470
- Vannini, C.; G. Domingo & M. Bracale.** 2010. Interactions between engineered NPs (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci. Total Environ*. 3053-3061.
- Weiss, C. & S. Diabate.** 2011. A special issue on nanotoxicology. *Arch Toxicol*: 705-706.