

# Citotoxicidad y genotoxicidad de nanopartículas de oro sintetizadas por ablación láser sobre *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae)

## Cytotoxicity and genotoxicity of gold nanoparticles synthesized by laser ablation on *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae)

***Juan Carlos Rodríguez Soto, Carol Eliana Barazorda Miranda & Luis Pollack Velásquez***

Laboratorio de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Av. Juan Pablo II, Trujillo, PERÚ  
jrodriguezs@unitru.edu.pe

***Marisol Contreras Quiñones & Claver Wilder Aldama Reyna***

Laboratorio de Óptica y Láseres, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad Nacional de Trujillo. Av. Juan Pablo II, Trujillo, PERÚ  
caldama@unitru.edu.pe



## Resumen

*Allium cepa* L. constituye un modelo biológico útil para medir la citotoxicidad y genotoxicidad de diversas sustancias, motivo por el cual se determinó a través del Allium-test el efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas de oro sobre el tejido meristemático radicular de *A. cepa*, obteniéndose los índices mitóticos, de fases y de anomalías. Se utilizó la técnica de ablación láser pulsada en medio líquido para la obtención de las nanopartículas y su posterior caracterización involucró el uso de microscopio electrónico para la determinación de la dimensión y forma de las mismas. 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 oro (0,225 ppm, 0,450 ppm, 0,900 ppm) además de un testigo (0 ppm). El tratamiento con la concentración más alta (T4: 0,900 ppm) a una hora de recuperación alcanzó un índice mitótico de 7,23 % y de 8,5 % con cuatro horas de recuperación, frente al tratamiento testigo con 13,5 % y 13,95 % respectivamente. El índice de anomalías con el T4 alcanzó 3,6 % y 3,75 % a una y cuatro horas de recuperación respectivamente. Se concluyó que a mayor concentración de nanopartículas, el índice mitótico disminuye y el índice de anomalías aumenta. Así mismo, a mayor número de horas de recuperación, el índice de anomalías se incrementa mientras que el índice mitótico tiende a restablecerse.

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

## Abstract

*Allium cepa* L. is a biological model used to measure cytotoxicity and genotoxicity of a handful of substances, which is why, by the Allium-test, the effect of different concentrations of gold nanoparticles was determined on the radicular meristematic tissue of *A. cepa*, obtaining the mitotic, phase and abnormality indexes. The pulsed laser ablation technique on liquid medium was used to obtain the nanoparticles and the following characterization involved the use of an electronic microscope to determine the shape and dimension of these particles. The preparation of the layers with radicular meristematic cell population involved the Tjio and Levan technique for their coloration and their reading was executed with the help of an optical microscope. Three concentrations of gold nanoparticles were used (0.225 ppm, 0.450 ppm, 0.900 ppm) besides from a control treatment (0 ppm). The treatment with the highest concentration (T4: 0.900 ppm) at an hour of recovery reached a mitotic index of 7.23 % and 8.5 % at four hours of recovery, in contrast with the control treatment with 13.5 % and 13.95 % respectively. The abnormality index with T4 reached 3.6 % and 3.75 % at one and four hours of recovery. It was concluded that at higher concentration of gold nanoparticles, the mitotic index diminishes and the abnormality index increases. Likewise, with greater number of recovery hours, the abnormality index increases while the mitotic index tends to restore.

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

**Citación:** 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. DOI: <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.253.25313>

## Introducción

Uno de los sistemas biológicos donde se puede determinar con alta precisión el efecto citotóxico y genotóxico de sustancias lo constituye el Allium-test. Se conoce que al exponer a hidratación un bulbo de

“cebolla” se produce una estimulación del crecimiento del tejido meristemático radicular, lo cual permite la elongación de las raíces del bulbo. Sin embargo, cuando se expone al bulbo en presencia de sustancias orgánicas o inorgánicas tóxicas la división

celular de los meristemos radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células (Correa *et al.*, 2016). Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz, alterando el desarrollo normal del tejido meristemático radicular que se puede comprobar con el diagnóstico microscópico, para establecer el índice mitótico y las aberraciones cromosómicas que se puedan presentar (Kumari *et al.*, 2009).

La especie *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) presenta pocos cromosomas ( $2n=16$ ), lo que facilita la evaluación de los daños y/o alteraciones cromosómicas en el ciclo de la división celular, incluyendo los riesgos eventuales aneuploidías. Todo ello, hace que *A. cepa* sea un estándar en ensayos de citogenética (Correa *et al.*, 2016).

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 meristemos radiculares puede inhibirse o acelerarse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células (Correa *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2009).

Las nanopartículas se caracterizan por tener un tamaño muy pequeño, en el orden de 1 a 300 nm. Son utilizadas en diversos ámbitos como la industria, medicina, cosméticos, y otros productos comerciales, siendo liberadas potencialmente en diversas concentraciones al medio

ambiente (Weiss & Diabaté, 2011) teniendo efectos y propiedades diferentes a la de los materiales en tamaños normales (IRSELL, 2001) pudiendo convertirse en un problema ecotoxicológico en los siguientes años (Weiss & Diabaté, 2011) y que pueden ocasionar riesgos para la salud del hombre y de otras especies (IRSELL, 2001).

Las nanopartículas de metales nobles y, más específicamente, las nanopartículas de oro (NPsAu), exhiben excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico. Además, las NPsAu pueden ser producidas en distintos tamaños y formas y pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, entre otros). Todo esto hace que las NPsAu despierten un gran interés en multitud de campos, pero especialmente en los sectores biomédico y alimentario. Hoy en día, las NPsAu destacan especialmente por sus propiedades fototerapéuticas (Auffan *et al.*, 2009).

La absorción, transporte y toxicidad son parámetros en los cuales se han realizado estudios en humanos, animales y plantas ya que la acumulación, persistencia e impacto de las nanopartículas metálicas siguen siendo dadas en fracciones insignificantes (Krug & Wick, 2011), pero, por sus características físicas y químicas pueden poseer efectos de toxicidad (Dietz & Herth, 2011). Debido a su principal característica que es tamaño nanométrico se produce más aumento de unidad por superficie y cuanto más tóxico sea la composición química de las partículas en tamaños convencionales, mayor será la toxicidad en tamaños nanométricos (IRSELL, 2001). Así, es el caso de metales como el Au, Cd, Hg, Ni y Zn, que se unen a componentes celulares

incluyendo proteínas, otros metales como Cu y Fe forman reactivos aumentando el estrés oxidativo (Hall, 2002).

Diversas investigaciones han buscado determinar el efecto de nanopartículas de diferentes metales, utilizando para ello diferentes modelos biológicos. Asli & Neumann (2009) estudiaron suspensiones coloidales de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y bentonita suministrada en raíz de “maíz” (*Zea mays* L.) determinando que la conductividad hidráulica es inhibida en un 10 por ciento. Kumari *et al.* (2009) realizaron el estudio con nanopartículas de plata utilizando “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 usitatissimum*) reduce en el crecimiento de los brotes. Corredor *et al.* (2009) concluyen que las nanopartículas magnéticas son capaces de penetrar los tejidos vivos, de migrar a diferentes regiones de las plantas y pueden causar toxicidad en ellas.

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 NPsAu sobre poblaciones celulares de tejido meristemático radicular de *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae).

### Material y métodos

La obtención de las nanopartículas de oro se realizó mediante un proceso de

síntesis verde conocido como ablación láser pulsada en medios líquidos (Agrega & Aldama, 2016) (Aldama *et al.*, 2018) donde se irradió con disparos de un láser pulsado Nd:YAG de longitud de onda IR de 1064 nm y 37,5 mJ/pulso a una razón de repetición de 10 Hz sobre una placa de oro de 24 kilates y dimensiones 15x15x1 mm<sup>3</sup> sumergida en 20 ml de agua ultrapura durante 10 minutos, obteniéndose nanopartículas esféricas de oro con un tamaño promedio de 22 nm a una concentración de 0,907 ng/L obtenida por espectroscopia de absorción atómica (Rivera *et al.*, 2016).

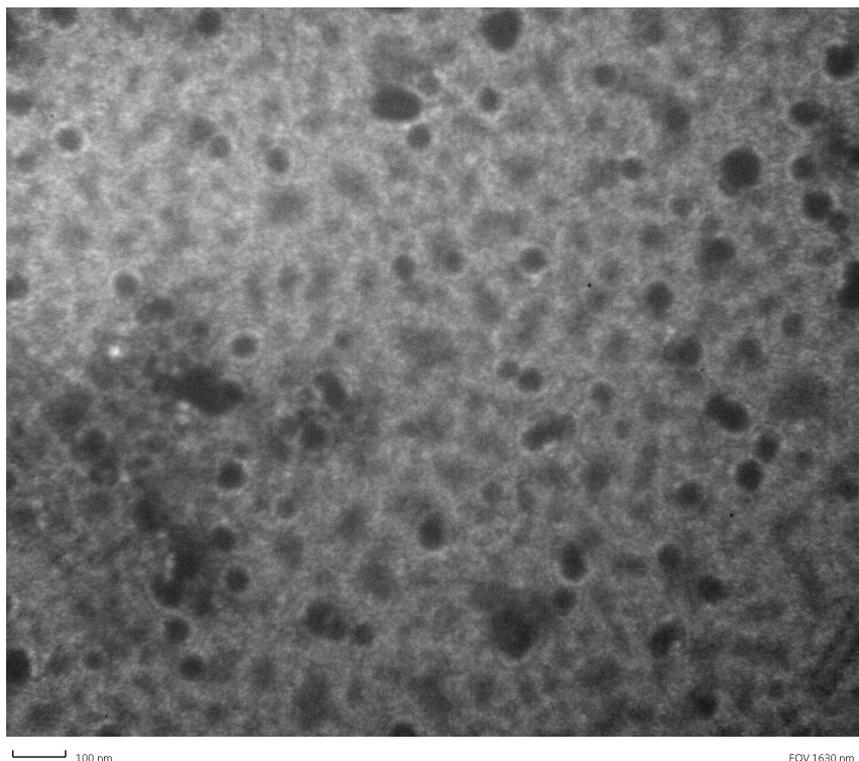
El sistema biológico consistió en 80 bulbos de *Allium cepa* “cebolla”, en los cuales se promovió el desarrollo de raíces nuevas, utilizando para ello agua declorinada y aireación en relación a una hora por día, en un ambiente libre de iluminación. La renovación del agua contenida en los vasos fue diaria; 72 horas después se seleccionó aquellos bulbos que contengan más de 20 raicillas con longitud promedio de 2 a 3 cm. a fin de asegurar la presencia cinética del ciclo celular (Otiniano, 2014; Aybar, 2015; Miñano, 2016).

Se realizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones para cada uno de los tratamientos (0ppm, 0,225ppm, 0,450ppm, 0,900ppm), la aplicación del tratamiento fue de una hora y la evaluación del efecto citotóxico fue a una hora de recuperación y la evaluación del efecto genotóxico a las cuatro horas de recuperación. Finalizado cada uno de los tratamientos con su respectivo tiempo de recuperación, las raicillas de los bulbos de “cebolla” fueron cortadas y fijadas en solución de Carnoy's. Luego se aplicó el método de Tjio & Levan (1956) para determinar el efecto citotóxico en base al

índice mitótico y el efecto genotóxico por el índice de anomalías.

Los datos obtenidos se los organizó

en tablas, gráficos y figuras. Se aplicó el respectivo análisis de varianza y comparación de medias.



**Fig.1.** Imagen de microscopía TEM-STEM-SEM de un coloide mostrando las nanopartículas de oro obtenidas por ablación láser pulsada de 1064 nm sobre una muestra de oro en agua ultrapura. Las manchas oscuras corresponden a las nanopartículas de oro con un tamaño promedio de 22 nm de diámetro. Fotografía tomada en la PUCP por la Dra. Betty Galarreta Asian.

### Resultados y discusión

Una vez obtenidas y caracterizados las nanopartículas de oro (Fig. 1) y con la finalidad de determinar el efecto de diferentes concentraciones de éstas (0 ppm; 0,225 ppm; 0,45 ppm y 0,9 ppm.) sobre el ciclo celular en meristemos radiculares de *Allium cepa*, se enfrentó a las raicillas de “cebolla” a una hora de exposición a las NPsAu 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. 2). El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y para cada uno de las fases de la mitosis.

**Tabla 1.** Índice mitótico, índice de fases e índice de anomalías del material hereditario en tejido meristemático radicular de *Allium cepa* expuestos a diferentes concentraciones de nanopartículas de oro con una hora de recuperación.

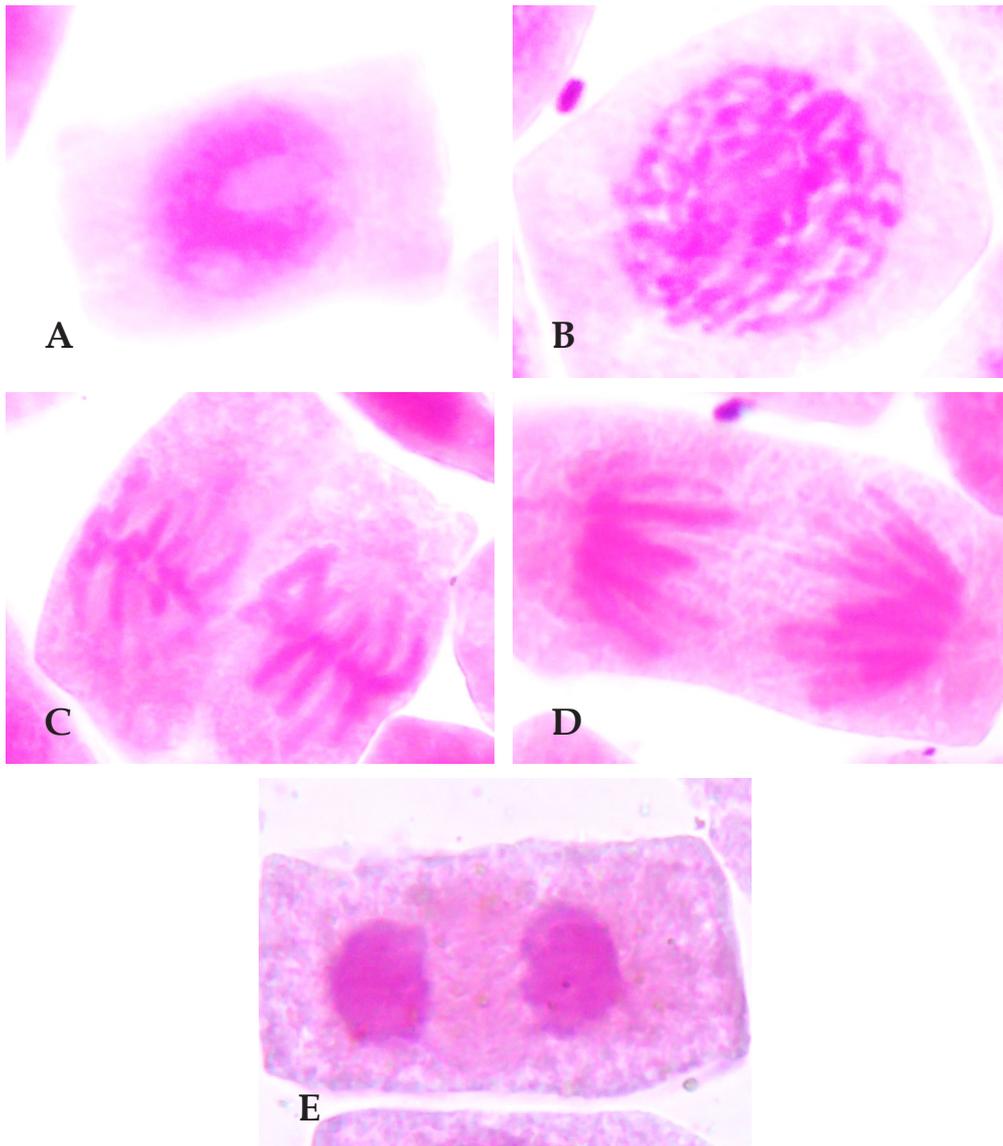
TRATAMIENTOS	Índice Mitótico	Índice Profásico	Índice Metafásico	Índice Anafásico	Índice Telofásico	Anomalías al conteo de 2000	(%) de las anomalías
T1	13,5 ± 0,13	44,76 ± 1,11	14,98 ± 0,03	10,25 ± 0,18	30,01 ± 0,01	0	0 ± 0
T2	8,8 ± 0,46	52,21 ± 1,03	9,33 ± 0,26	11,54 ± 0,36	26,92 ± 0,60	53	2,65 ± 5.89
T3	7,9 ± 0,11	58,92 ± 0,13	9,13 ± 0,26	10,04 ± 0,07	21,91 ± 0,86	63,67	3,18 ± 3.30
T4	7,23 ± 0,06	64,34 ± 0,85	8,67 ± 0,04	9,84 ± 0,19	17,15 ± 0,15	72	3,6 ± 1.41

**Leyenda:** T1: 0ppm NPsAu. T2: 0,225ppm NPsAu. T3: 0,450ppm NPsAu. T4: 0,900ppm NPsAu.

**Tabla 2.** Índice mitótico, índice de fases e índice de anomalías en el material hereditario en tejido meristemático radicular de *Allium cepa* expuestos a diferentes concentraciones de nanopartículas de oro con cuatro horas de recuperación.

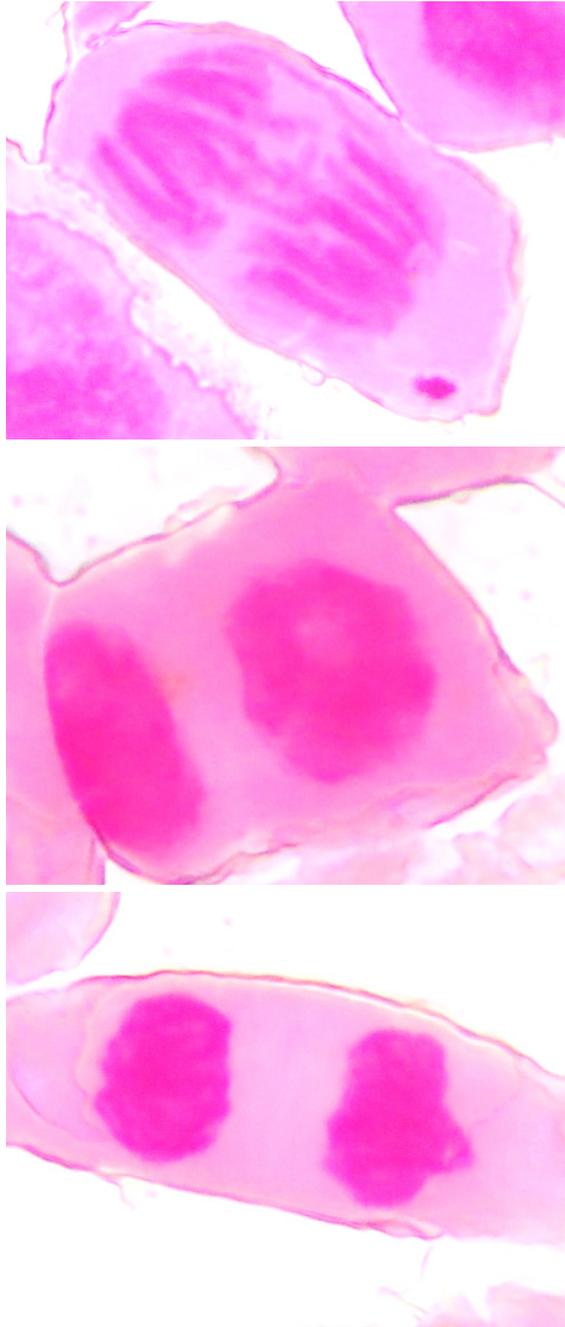
TRATAMIENTOS	Índice Mitótico	Índice Profásico	Índice Metafásico	Índice Anafásico	Índice Telofásico	Anomalías al conteo de 2000	(%) de las anomalías
T1	13,95 ± 0,41	45,2 ± 2,29	15,1 ± 0,17	10,82 ± 0,88	28,88 ± 0,71	0	0 ± 0
T2	9,52 ± 0,68	49,79 ± 0,58	11,23 ± 0,44	11 ± 0,66	27,98 ± 1,11	58	2,9 ± 3.56
T3	8,91 ± 0,65	56,21 ± 1,06	10,01 ± 0,21	10,14 ± 0,01	23,64 ± 0,62	66,67	3,33 ± 0.94
T4	8,5 ± 0,06	59,89 ± 0,39	8,77 ± 0,26	10,12 ± 0,09	21,22 ± 1,34	75	3,75 ± 1.63

**Leyenda:** T1: 0ppm NPsAu. T2: 0,225ppm NPsAu. T3: 0,45ppm NPsAu. T4: 0,9ppm NPsAu.



**Fig. 2.** 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 oro.

A: célula en interfase.      B: célula en profase.      C: célula en metafase. D: célula en anafase.      E: célula en telofase.



**Fig. 3.** Anomalías 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 oro.

A: puente anafásico. B: célula binucleada. C: telofase amorfa.

En la Tabla 1 como en la Tabla 2 los índices mitóticos del tejido meristemático radicular de *A. cepa* expuesto a diferentes concentraciones de NPsAu, con una y cuatro horas de recuperación respectivamente, mostraron una disminución importante. A una mayor concentración de NPsAu se observó menor índice mitótico, así el T4 (0,900ppm) alcanzó un índice mitótico a una y cuatro horas de recuperación de 7,23% y 8,5% respectivamente, frente al testigo que alcanzó 13,5% y 13,95%. Esta importante disminución obedecería a que las NPsAu cuando entran en el sistema biológico no se degradan o se descomponen, sino que permanecen en el sistema induciendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Khalid, 2015) y otras sustancias que a dichas concentraciones y tiempos actúan bajo el correspondiente, complejo ciclina B - CDK 1 (FPM: Factor Promotor de la Mitosis), el mismo que ser afectado evita el tránsito normal de las células del periodo G2 hacia la mitosis, observándose menor número de células en división (Klug *et al.*, 2013). Se logró anotar además que los índices de los tratamientos con NPsAu de cuatro horas son ligeramente superiores a los de una hora de recuperación, lo que nos indicaría que la recuperación del índice mitótico del ciclo celular, frente a la acción del oro, se va restableciendo lentamente con el tiempo.

En referencia a los índices de fases frente al testigo, a una y cuatro horas de recuperación (Tabla 1 y Tabla 2), se logró observar un aumento del índice profásico, una disminución del índice metafásico, pequeñas diferencias del índice anafásico y una disminución del índice telofásico. A mayor concentración de NPsAu las diferencias se hacen más notorias. Este comportamiento obedecería a que las NPsAu actúan sobre la formación de los

centros de organización de microtúbulos (COMT), los que inducen el ensamblaje del huso mitótico, y que al verse afectado evita el paso de profase a metafase, teniendo así mayor número de células en profase y menor número en metafase. Las diferencias no significativas para el índice anafásico indicarían que las NPsAu no interfieren sobre el accionar del complejo promotor de anafase (APC), y la disminución del índice telofásico solo sería respuesta al desbalance observado en profase y metafase. Similares índices se obtuvieron al evaluar el efecto citotóxico de otras sustancias sobre el mismo tejido Otiniano (2014), Andrioli & Mudry (2011) y Kalcheva *et al.* (2009).

La presencia de anomalías observadas en el conteo celular de tejido meristemático radicular de *Allium cepa* obedecería a los posibles efectos citotóxicos inducidos por NPsAu, 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. 3). Los puentes anafásicos se deberían a la interacción entre las NPsAu - DNA, generando efectos cleistogénicos a nivel de las regiones teloméricas del DNA (Araujo, 2012; Díaz, 2011; Fajardo, 2011). La presencia de células binucleadas obedecería a un proceso irregular de citocinesis, donde las NPsAu inhiben la fusión de vesículas del Aparato de Golgi, obstaculizando la formación del fragmoplasto, responsable de la nueva pared celular durante la telofase (Beltran & Gonzales 1995) (Prieto *et al.*, 2005) y la presencia de telofases amorfas se debería

al accionar nocivo de las NPsAu en las diferentes estancias proteicas.

### Conclusión

Las nanopartículas de oro, a las concentraciones trabajadas, tienen efecto citotóxico y genotóxico sobre el tejido meristemo radicular de *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) a mayor concentración de nanopartículas el índice mitótico disminuye y el índice de anomalías aumenta; así mismo, a mayor número de horas de recuperación el índice de anomalías se incrementa mientras que el índice mitótico tiende a restablecerse.

### Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Trujillo por el financiamiento para la síntesis de las nanopartículas de oro mediante el Proyecto PIC N° 11-2014 III Convocatoria de Proyectos de Investigación Científica financiado con recursos del Canon Minero. Al Mg. Jhenry Agreda Delgado por el apoyo en el manejo del láser Nd:YAG y a la Dra. Betty Galarreta Asian de la Pontificia Universidad Católica del Perú por la toma de imágenes de microscopía electrónica de las nanopartículas de oro.

### Contribución de los autores

J.R.: Concepción, análisis e interpretación de los resultados y aprobación de la versión final. C.B.: Recolección de datos, análisis e interpretación de los mismos. L.P.: Recolección y análisis de los datos. M.C.: Síntesis de nanopartículas de oro por ablación láser pulsada. C.A.: Diseño del montaje experimental y síntesis de las nanopartículas de oro por ablación láser pulsada. Todos los autores han leído el manuscrito final y aprobado la revisión.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

### 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.
- Aybar, J.** 2015. Efecto citotóxico y genotóxico del extracto acuoso del pericarpio de *Caesalpinia spinosa* "tara" en células meristematicas de *Allium cepa* L. var Arequipeña. Tesis para optar el Título de Biólogo, Universidad Nacional de Trujillo.
- 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.
- Auffan, M.; J. Rose; J. Y. Bottero; G. V. Lowry; J. P. Jolivet & M. R. Wiesner.** 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*, 4(10): 634-641.
- Araujo, J. M.** 2012. Efecto protector del extracto etanólico de *Annona muricata* sobre la citotoxicidad y genotoxicidad del Sorbato de potasio en meristemos radiculares de *Allium cepa*. Tesis para optar el Título de Biólogo, Universidad Nacional de Trujillo.
- 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.
- Díaz, A. P.** 2011. Efecto protector del extracto etanólico de *Glycine max* 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.
- 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.
- 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. & Wick, P.** 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. Forskolin: Genotoxicity assessment in *Allium cepa*. *Mutation Research*, 777: 29–32.
- Kalcheva, V.; A. P. Drgoeva; K. Kalchev & D. Enchev.** 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 concentración 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

