

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERIA

“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS Y FISIOLÓGICOS  
DE LAS NANOPARTICULAS DE PLATA ARGOVIT® EN ALLIUM TEST”

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta

FRANCISCO CASILLAS FIGUEROA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. NOVIEMBRE DE 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS Y FISIOLÓGICOS  
DE LAS NANOPARTICULAS DE PLATA ARGOVIT® EN ALLIUM TEST”

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta

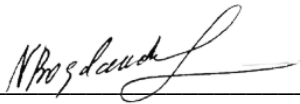
FRANCISCO CASILLAS FIGUEROA

Aprobado por



DRA. MARÍA EVARISTA ARRELLANO GARCÍA

Director de tesis  
Presidente del Comité



DRA. NINA BOGDANCHIKOVA  
Codirector de tesis  
Miembro del Comité



DRA. JUANA CLAUDIA LEYVA AGUILERA  
Sinodal  
Miembro del Comité



DRA. PATRICIA RADILLA CHAVEZ  
Sinodal  
Miembro del Comité



DR. JUAN CARLOS GARCIA RAMOS  
Sinodal  
Miembro del Comité

**DEDICATORIA**

*Mi esposa Mariela, hijos Adrián y Fabián*

*Mis papás Olga y Francisco*

*Y hermanos Julio, Ricardo, María Angélica, Ramón, Juan Carlos y Guadalupe*

## ***AGRADECIMIENTOS***

Agradecimiento eterno a la Dra. Evarista Arrellano por creer en mí y en mis compañeros, ella siempre supo cómo guiarme y aconsejaba como realizar las cosas de la mejor manera posible. Por eso y muchas otras cosas gracias.

En ese mismo andar a la Dra. Nina gracias por sus acertados comentarios, valiosos consejos, siempre guiándonos para garantizar un trabajo de calidad.

Gracias al Dr. Juan Carlos y la Dra. Yanis por ayudarme en todo momento y por ofrecerme la oportunidad de trabajar con ustedes, por ofrecerme su conocimiento tan amplio, por su paciencia, entusiasmo y ser al mismo tiempo amigos.

A la Dra. Patricia Radilla por su asesoramiento y colaboración en el trabajo de investigación y aconsejarme en mis experimentos, a M. en. C. Aurora Arreola por su apoyo incondicional y escuchar siempre mis ideas sobre mi trabajo.

Al Dr. David Salas, por apoyarme y orientarme en el presente trabajo de tesis, a la Dra. Claudia Leyva, por colaborar siempre que fue necesario para hacer posible el presente trabajo.

A la Dra. Alejandra Santoscoy por poner a disposición los recursos necesarios para el estudio de daño oxidativo y respuesta antioxidante dentro de su laboratorio.

A mis compañeros de clase y hermanos del alma Balam y Roberto o el ingeniero como le llamamos comúnmente. Que días aquellos que nos regresaron a la licenciatura con la materia de Física Cuántica, así como las demás materias.

A mis compañeros del almacén (Bodegueros como nos decían) Nelva, Norma, Martin, Ángel y Osvaldo, por aguantar, el ruido de mi contador de células durante su turno dentro del almacén, además de estar escuchando cada locura que se me ocurrían de los resultados de mi tesis.

Agradezco a Charlotte González Abraham por su apoyo y asesoría dentro de mi trabajo de maestría, gracias, gracias.

Agradezco a la Escuela de Ciencias de la Salud que brindó el espacio dentro de sus laboratorios para llevar a cabo parte de mis experimentos, así como el laboratorio de toxicología a cargo de la Dra. Evarista Arrellano de la Facultad de Ciencias, UABC.

## RESUMEN

El uso de nanopartículas en actividades industriales, domésticas, agrícolas y biomédicas crece a un ritmo acelerado y plantea la necesidad de identificar el efecto que estas y sus residuos provocan. Por ello, es de suma importancia evaluar la toxicidad y los mecanismos de acción que las diferentes nanopartículas pueden inducir en el medio ambiente, principalmente en plantas. El presente trabajo evalúa la toxicidad de nanopartículas de plata (AgNPs) de marca Argovit® con un recubrimiento de polivinilpirrolidona (PVP); se evaluó la citotoxicidad y genotoxicidad, utilizando el modelo *Allium cepa* con la técnica propuesta por Fiskesjö conocido como *Allium test*. El efecto producido por las AgNPs se comparó con arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) como agente citotóxico y genotóxico. Los resultados muestran que las concentraciones de 5, 10, 15, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{g/mL}$  evaluadas de AgNPs no presentan efectos citotóxicos, a diferencia del control positivo de  $\text{NaAsO}_2$  (0.37  $\mu\text{g/mL}$ ). La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) presentan una pequeña diferencia respecto al control con concentraciones superiores a 10  $\mu\text{g/mL}$ , pero sin provocar una afectación en la viabilidad celular (no hay modificaciones en el índice mitótico). Por otro lado, se observó una respuesta antioxidante en las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs diferente a las concentraciones superiores de AgNP administrada, coincidiendo con la producción de ROS, pero siempre con valores comparables al control negativo. No se observa daño en la membrana citoplasmática (lipoperoxidación), asimismo las concentraciones evaluadas de AgNPs no presentaron efectos genotóxicos, no se observaron micronúcleos en ninguna de las muestras analizadas que fueron expuestas a las diferentes concentraciones de AgNPs.

Por lo antes mencionado, se puede sugerir que las nanopartículas de plata estudiadas en las concentraciones evaluadas son bioseguras y biocompatibles para *Allium cepa*, sentando un

importante precedente para la evaluación del posible daño que las nanopartículas pueden generar al medio ambiente.

## **ABSTRACT**

The use of nanoparticles in industrial, domestic, agricultural and biomedical activities grows at an accelerated rate and raises the need to identify the effect caused by their waste. Therefore, it is very important to evaluate the toxicity and the mechanisms of action that different nanoparticles can induce in the environment, mainly in plants. The present work evaluates the toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) with a polyvinylpyrrolidone (PVP) coating. cytotoxicity and genotoxicity were evaluated, using the *Allium cepa* model with the technique proposed by Fiskesjö known as the *Allium* test. The effect was compared with sodium arsenite ( $\text{NaAsO}_2$ ) as a cytotoxic and genotoxic agent. The results show that the concentrations of 5, 10, 15, 25, 50, 75 and 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  evaluated for AgNPs do not present cytotoxic effects, unlike the positive control of  $\text{NaAsO}_2$  (0.37  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). The production of reactive oxygen species (ROS) presents a small difference compared to the control with concentrations higher than 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , but without causing an impairment in cell viability (there are no changes in the mitotic index). On the other hand, an antioxidant response was observed in the concentrations of 5 and 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$  of AgNPs different from the higher concentrations of AgNP administered, coinciding with ROS production, but always with values comparable to the negative control. No damage was observed in the cytoplasmic membrane (lipoperoxidation), also the evaluated concentrations of AgNPs did not present genotoxic effects, no micronucleus was observed in any of the analyzed samples that were exposed to different concentrations of AgNPs.

For the aforementioned, it can be suggested that silver nanoparticles in the concentrations evaluated are safe and biocompatible for *Allium cepa*, leading to an important precedent for the nanoparticles' environment risk evaluation.

## Contenido

Contenido de tablas.....	11
Lista de figuras.....	12
Introducción .....	14
Antecedentes .....	16
Trabajos realizados utilizando Argovit® en salud humana, medicina, veterinaria y acuicultura .....	17
Otitis .....	17
Líneas celulares de cáncer de cuello uterino (HeLa) y cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF7) .....	18
Perros (tratamiento de moquillo).....	18
Desarrollo de apósitos .....	19
Tuberculosis.....	19
Roedores .....	20
Vacas (tratamiento contra mastitis) .....	22
Herpes (actividad antiviral) .....	22
Actividad antiviral (virus de la fiebre del Valle Rift).....	23
Peces (efecto antihelmíntico).....	23
Parásitos (genero Tetrahymena) .....	23
Parásitos (Perkinsus marinus).....	23
Camarones (actividad contra el virus del síndrome de la mancha blanca).....	24
Linfocitos humanos .....	25
Trabajos realizados utilizando Argovit® Plantas.....	26
Micropropagación de plantas de vainilla.....	26
Efecto cito y genotoxico en plántulas de Vainilla .....	27
Actividad en contra enfermedad de Huanglongbing .....	28
Evaluación AgNPs con otros modelos vegetales .....	30
Objetivo General.....	45
Objetivos Especificos.....	45
.....	46
Método .....	47
Definición de Variables.....	47

<i>Diseño experimental</i> .....	47
Preparación del material biológico y tratamientos evaluados .....	51
Toxicidad.....	52
Elongación y número de raíces.....	52
Preparación de laminillas para la Evaluación Citotóxica y genotóxica.....	52
Evaluación citotóxica .....	53
Evaluación Genotóxica .....	53
Determinación de la capacidad antioxidante (CA) .....	53
Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO) .....	54
Determinación de la peroxidación lipídica.....	55
Análisis estadístico para ERO, CA y peroxidación lipídica.....	55
Resultados y Discusión .....	56
Citotoxicidad a nivel macroscópico .....	56
Evaluación Citotóxica.....	62
Producción de especies reactivas de oxígeno y respuesta antioxidante .....	67
Determinación de la peroxidación lipídica.....	69
Evaluación Genotóxica.....	71
Conclusión .....	77
Recomendaciones .....	79
Referencias.....	80
Anexos .....	89
Imágenes de preparación de cebollas para los experimentos .....	89
Observación a 40 X de células en el conteo del IM y MN.....	92

## Contenido de tablas.

## Página

**Tabla 1.** Análisis de exposición de AgNPs utilizando otros modelos vegetales, comparando tamaño, duración y concentración.

**Tabla 2.** Análisis de exposición de AgNPs utilizando *Allium test*, comparando tamaño, duración y concentración.

**Tabla 3.** Concentraciones de los diferentes tratamientos evaluados; Nanopartículas de plata Argovit®, Nitrato de Plata, Polivinilpirrolidona, Agua Destilada y Arsenito de Sodio.

**Tabla 4.** Número y longitud de raíces después de 24, 48 y 72 horas de exposición a diferentes concentraciones de AgNPs.

**Tabla 5.** Frecuencia de células en división, índice mitótico y micronúcleos encontrados en los diferentes tratamientos evaluados.

**Tabla 6.** Comparación de concentraciones para AgNPs-PVP de artículos publicados anteriormente con nuestro trabajo actual.

## Lista de figuras

**Figura 1.** Representación de la metodología para la evaluación de las AgNPs Argovit®.

**Figura 2.** Características fisicoquímicas de AgNPs Argovit®. A) Imagen que muestra la morfología esférica de AgNPs Argovit, B) frecuencia de distribución de tamaño de AgNPs calculada por MET, C) Resumen de las características fisicoquímicas.

**Figura 3.** Comparación de la longitud de las raíces de *Allium cepa* expuestas a diferentes tratamientos con respecto al tiempo.

**Figura 4.** Comparación del número de raíces de *Allium cepa* expuestas a diferentes tratamientos con respecto al tiempo.

**Figura 5.** Índice mitótico cuantificado en raíces de *A. cepa* después de 72 h de exposición a diferentes concentraciones de AgNPs, PVP y AgNO<sub>3</sub>.

**Figura 6.** Relación de la distribución celular en las diferentes fases de la mitosis para cada uno de los tratamientos utilizados A) AgNPs, B) PVP, C) AgNO<sub>3</sub>. Las concentraciones de cada agente son 5, 10, 15, 25, 50, 75 y 100 µg/ml. C- Agua destilada y C+ Arsenito de sodio.

**Figura 7.** (A) Comparación del contenido de especies reactivas de oxígeno y (B) respuesta antioxidante de raíces de *Allium cepa* después de 72 horas de tratamiento con 5, 10, 15, 25, 50, 75 y 100 µg/mL de AgNPs, AgNO<sub>3</sub> y PVP.

**Figura 8.** Comparación del contenido de lipoperoxidación lipídica en la raíz de *Allium cepa* después de 72 horas de tratamiento con 5, 10, 15, 25, 50, 75 y 100 µg/mL de AgNPs, AgNO<sub>3</sub> y PVP.

**Figura 9.** Frecuencia de micronúcleos (MN) en raíz de *Allium cepa* después de 72 horas de tratamiento con 5, 10, 15, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs,  $\text{AgNO}_3$  y PVP.

## Introducción

El inicio de la nanotecnología se establece hacia finales de la década de los 50's, con el discurso presentado por el ganador del Premio Nobel Richard Feynman, en la reunión anual de la *American Physical Society* cuando expresa: *“There is Plenty of Room at the Bottom”*; desde entonces se marca el inicio formal del desarrollo de la nanotecnología.

En la actualidad existe un interés creciente en este campo, la nanotecnología es considerada como uno de los desarrollos más innovadores de la ciencia moderna por la comunidad científica internacional (Handy, Owen, & Valsami-Jones, 2008). El avance en esta ciencia comenzó en la última década, diseñando miles de productos a nano escala.

En el mundo se utilizan una gran variedad de nanomateriales y sus propiedades varían dependiendo del tamaño, concentración, ligando y su forma (Albanese, Tang, & Chan, 2012; Siddiqui, Al-Whaibi, & Mohammad, 2015). En los últimos años dentro de estas sustancias utilizadas se encuentran los nanomateriales que sirven como aditivos o agentes de fertilizantes y fitosanitarios (Nair et al., 2010; P. Wang, Lombi, Zhao, & Kopittke, 2016), estos materiales además de emplearse en la agricultura se utiliza en la medicina, la industria así como la vida cotidiana (Khot, Sankaran, Maja, Ehsani, & Schuster, 2012).

Sin embargo no se tiene suficiente conocimiento acerca de los efectos de los nanomateriales al ambiente y por consecuencia en la salud humana (Capaldi Arruda, Diniz Silva, Moretto Galazzi, Antunes Azevedo, & Zezzi Arruda, 2015; Chichiriccò & Poma, 2015).

Las nanopartículas de oro, plata y cobre son el objeto de diversas investigaciones por sus aplicaciones en la medicina, la biología y la electrónica, entre otras. Existen investigaciones que

exhiben las excelentes propiedades a las nanopartículas de oro y plata, por ello un área muy importante de trabajo es la implicación que estas tienen en la medicina (Ng, Li, Bay, & Yung, 2010; Xu et al., 2012).

En el presente trabajo se presentan evidencias experimentales, utilizando el modelo *Allium test*, de una baja citotoxicidad y genotoxicidad así como reducida afectación fisiológica de las nanopartículas de plata Argovit®, como indicio de que esta formulación de AgNPs son seguras y biocompatibles.

## **Antecedentes**

Históricamente la plata se ha distinguido por sus variados usos, además de los tradicionales como la fabricación de objetos y ornamentos, desde hace más de 100 años también se ha empleado en pigmentos, reactivos para fotografía, tratamientos de heridas, compuestos antiestáticos y como biocida (Nowack, Krug, & Height, 2011). Según la Agencia de Protección al Ambiente (EPA, por su siglas en inglés), en los Estados Unidos desde 1954 se han registrado materiales biocidas y el 53 % de estos productos registrados probablemente contienen nanoplata en concentraciones muy pequeñas (Nowack et al., 2011); sin embargo, formulaciones de nanopartículas recientemente aumentan las áreas de aplicación y con ellas un escrutinio profundo para evaluar la toxicidad en el ambiente y en la salud humana (Bartłomiejczyk, Lankoff, Kruszewski, & Szumiel, 2013; Liu & Jiang, 2015)

Por otra parte, hablar de las nanopartículas de plata es hablar de estructuras con dimensiones entre 1 a 100 nm con propiedades fisicoquímicas únicas y distintas a las que exhibe como plata metálica; debido sobre todo, a su acción bactericida, en la actualidad se han encontrado aplicaciones prácticas en la medicina, cosméticos, textiles y otros campos (Bartłomiejczyk et al., 2013).

Moore en el 2006, sostiene que se requiere un enfoque preventivo con la evaluación individual de los nuevos nanomateriales en relación con el riesgo para la salud ambiental. Un ejemplo es el trabajo de Benn & Westerhoff en el 2008, quienes evaluaron los residuos en agua del lavado de calcetines tratados con nanopartículas de plata como agente antimicrobiano y encontraron allí presencia de nanopartículas de plata de 10 a 500 nm de diámetro.

Por otro lado, Liu & Jiang en el 2015 mencionan que una vez que las AgNPs llegan al ambiente, las alteraciones que provocan se deben a la estabilidad limitada de estas formulaciones y a la propensión a oxidarse fácilmente liberando iones plata (Ag<sup>+</sup>).

Una de las nanopartículas que cuenta con mayor número de estudios sobre diversas aplicaciones en biomedicina, así como investigaciones sobre la evaluación de sus efectos tóxicos en diferentes modelos animales y vegetales, son las nanopartículas de plata Argovit®, producidas por la compañía Vector Vita, LTD, con sede en Rusia. En los párrafos siguientes, se describen los principales resultados de los trabajos antes mencionados.

### *Trabajos realizados utilizando Argovit® en salud humana, medicina, veterinaria y acuicultura*

#### ***Otitis***

En el 2012, Semenov y Fridarova estimaron la capacidad de Argovit ® aplicado para el tratamiento de otitis purulenta (CSOM), en el estudio participaron 35 pacientes de 12 a 69 años que presentaron CSOM después de una intervención quirúrgica en la cavidad timpánica del oído medio. Se utilizaron estas nanopartículas como tratamiento, dando como resultado la eliminación rápida de los síntomas clínicos y la dinámica positiva de los signos objetivos de la enfermedad, como la reducción o la terminación de la exudación patológica y la estimulación de los procesos de epidermización. Los pacientes tratados tuvieron una recuperación estable en un periodo de 6 meses después de la finalización del tratamiento (Semenov & Fidarova, 2012).

***Líneas celulares de cáncer de cuello uterino (HeLa) y cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF7)***

Juárez-Moreno et al. (2017) evaluaron los efectos citotóxicos de las nanopartículas de plata Argovit® en líneas celulares de cáncer de cuello uterino (HeLa) y cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF7). En ambos casos, después de 24 h de incubación, se incrementó la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) cuando se expusieron las células a la concentración inhibitoria media (IC50) de AgNPs, sin embargo, no fue estadísticamente significativo en comparación con las células no tratadas. Se evaluó la genotoxicidad producida con esta concentración mediante ensayo cometa mostrando que no induce daño notable de ADN en las células. Sin embargo, las células HeLa, MDA-MB-231 y MCF7 tratado con el IC máximo de AgNPs indujo la formación de ROS a las 12 o 24 h de incubación. La genotoxicidad lograda por el ensayo del cometa en células HeLa, MDA-MB-231 y MCF7 reveló que la exposición a IC50 de AgNPs no induce daño notable de ADN en las células. Concluyen que, Argovit® induce un efecto citotóxico de forma tiempo y dosis-dependiente en las líneas celulares de cáncer analizadas. Mientras que el efecto genotóxico estuvo restringido principalmente por la concentración. Además sugieren explorar nuevas aplicaciones terapéuticas de AgNPs así como evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos de AgNPs en células sanas en el tejido circundante de la neoplasia (Juarez-Moreno et al., 2017).

***Perros (tratamiento de moquillo)***

En el 2016, Bogdanchikova y colaboradores, realizaron un tratamiento del moquillo en perros con síntomas neurológicos y no neurológicos. Para esto utilizaron una composición farmacéutica veterinaria de nanopartículas de plata (AgNPs Argovit®). Encuentran que la tasa de recuperación es muy alta y sin secuelas en animales con moquillo no neurológico, en cambio, en

animales con síntomas neurológicos, los tratamientos con AgNPs no pudieron revertir la enfermedad (Bogdanchikova et al., 2016).

### ***Desarrollo de apósitos***

Álvarez-Suárez, et al (2020) desarrollaron apósitos absorbentes para utilizarlos en quemaduras y úlceras cutáneas. Los resultados sugieren que los apósitos impregnados con Argovit® pueden tener una gran efectividad en contra de bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* debido a la gran actividad antimicrobiana de los componentes (Álvarez-Suárez et al., 2020).

### ***Tuberculosis***

Uraskulova y Gyusan (2017), evaluaron preparaciones de plata a nanoescala, Argovit-C (Argovit®) y Vitargol, para el tratamiento de la tuberculosis del tracto respiratorio superior. La investigación realizada in vitro en el dispensario de tuberculosis Karachaevo-Cherkessian, mostró que la solución de Argovit-C a una concentración de 3,3 % tenía una actividad bactericida del 100 % con relación a las micobacterias resistentes a los medicamentos. Con base en estos resultados, esta concentración de Argovit-C (3.3%) fue elegida para el estudio clínico. Se comprobó que esta preparación tiene mayor efectividad terapéutica en comparación con el tratamiento estándar antituberculoso, concluyendo que se puede recomendar la inhalación de la solución preparada de Argovit-C 3,3 % dos veces al día durante 10 minutos cada uno. Otros estudios recomiendan el uso de Argovit-C para el tratamiento de la tuberculosis laríngea mediante la inhalación durante 10 minutos de la solución probada al 3,3% dos veces al día durante 2 meses (Uraskulova & Gyusan, 2017).

### ***Roedores***

Kalmantaeva y colaboradores en el 2014, investigaron la influencia de Argovit® en el sistema inmune de ratones después de la exposición por inhalación o administración intragástrica o subcutánea. Los resultados arrojaron que por inhalación o vía intragástrica no tenían efecto tóxico en las células y órganos inmunes, además de no producir cambios en cantidad de linfocitos T y B en el bazo, o producción de citosinas proinflamatorias después de la exposición a las nanopartículas de plata. Por otro lado, una administración subcutánea de nanoplata cambio la proporción de subpoblaciones de linfocitos y aumentó la cantidad de interferón gama (IFN- $\gamma$ ) que producen los linfocitos en una proporción de 3.6 veces en comparación con el control (Kalmantaeva et al., 2014).

Zeinalov y colaboradores 2016, sustentan que las nanopartículas de plata tienen más actividad que sus otras formas y que sus propiedades biológicas suelen ser más antibióticas y biocidas. Simultáneamente, estas nanoparticulas tienen la capacidad de penetrar fácilmente las barreras de los organismos y de esta manera entrar directamente en sus tejidos y órganos. Mencionan que es necesario estudiar la influencia de nanopartículas de plata sobre la fisiología de los organismos vivos, por lo que es necesario contribuir al estudio de la bioseguridad de los nanoproductos de plata para la salud humana y el medio ambiente. En este sentido, presentan datos experimentales sobre el efecto de dos preparaciones de nanoplata (Poviargol y Argovit) en ratones de laboratorio, establecieron que utilizando extendido de sangre periférica y el análisis bioquímico del suero sanguíneo de los organismos vivos, pueden servir para fines de monitoreo primario de la patología en condiciones nocivas causadas por las nanopartículas de plata (Zeinalov et al., 2016).

Por otra parte, en un estudio realizado en ratas por Gmshinski y colaboradores en el 2016, estudiaron la influencia de nanopartículas de plata Argovit® que fueron introducidas por vía oral en ratas, con una duración 92 días del experimento en donde se observaron algunos indicadores de homeostasis de oligoelementos esenciales. Se estableció la acumulación dosis-dependiente de Ag en el hígado animal, a una dosis que oscila entre 0.1 y 10 mg / kg de peso corporal, por otro lado, en riñón y bazo a una dosis en el rango de 0.1–1 mg / kg de peso. Además, se observó una disminución significativa en el contenido de Cu en los riñones, en el hígado se manifestó una disminución en el contenido de Zn y Co y un aumento en el contenido de Mn. En el bazo, se encontró un aumento en Cd, Cr y Ni, pero también se observa una correlación positiva y significativa entre los niveles de Ag y Cd y una correlación negativa entre Ag y Cu en los riñones. En las ratas que reciben AgNPs a una dosis de 1.0-10 mg / kg de peso corporal los indicadores de selenio que son excreción urinaria, el contenido en el plasma sanguíneo y la actividad glutatión peroxidasa son significativamente menores, por lo tanto, las nanopartículas Argovit® que ingresan al cuerpo por vía tracto gastrointestinal a una dosis de plata de por lo menos 1 mg/kg de peso corporal, pueden afectar la homeostasis de oligoelementos esenciales y elementos tóxicos. Ellos concluyen que se tiene que tomar en cuenta el antagonismo de Ag y Se al evaluar la seguridad de los complementos alimenticios en la composición de una dieta (Gmshinski, Shumakova, Shipelin, Maltsev, & Khotimchenko, 2016).

En el 2018 Castañeda-Yslas, y colaboradores, trabajaron con ratones y evaluaron la capacidad genotóxica de Argovit® en reticulocitos de sangre periférica de ratones a partir de la técnica de micronúcleos. En el estudio se utilizaron las mismas dosis terapéuticas administradas en contra del moquillo canino, además, se utilizó citosina arabinosa como control positivo y agua como control negativo. Los resultados mostraron que Argovit® produce menos micronúcleos que el

control positivo, lo cual es un indicio de la menor genotoxicidad de Argovit® con la dosis de 6 mg/mL que citocina arabinosa(Castañeda-Yslas et al., 2018).

#### ***Vacas (tratamiento contra mastitis)***

En el 2018 Shkil y colaboradores trabajaron con la inflamación de las ubres de las vacas, mostraron que al tratar vacas con mastitis administrando Argovit®, se encontró que los tratamientos con duración promedio de 2.9 +0.1, 3.3 + 0.3, 4.1 +0,2 días, que es 1.6, 1.9, 1.8 veces menos en comparación con la droga Espectromast en el grupo control, se obtuvo un efecto de sensibilidad antibiótica en microflora intestinal en el tratamiento de organismos subclínicos, serosos. En otros resultados se determinó la sensibilidad a los microorganismos aislados posterior al tratamiento de mastitis catarral de las vacas, mostraron un efecto dosis dependiente en comparación al fármaco utilizado y la forma clínica de la enfermedad (Shkil, Nefedova, & Burmistrov, 2018).

#### ***Herpes (actividad antiviral)***

En otro estudios Glotov y colaboradores en el 2004, estudiaron la actividad antiviral de Argovit® y 10 diferentes fármacos que se utilizan en contra del herpes viral causante de la rinotraqueítis infecciosa bovina (BIRT) y diarrea viral bovina (BVD). Dentro de los resultados comprobaron la efectividad de Argovit™ para combatir ambos padecimientos en el ganado, comparables con fármacos como la bromuridina, el Aciclovir, la ribavirina y el mitasazonum, entre otros; por otro lado, el eracond y anandid demostraron ser ineficientes (Glotov, Glotova, Sergeev, Belkina, & Sergeev, 2004).

### ***Actividad antiviral (virus de la fiebre del Valle Rift)***

Borrego y colaboradores en el 2016, realizaron un experimento para poner a prueba la posible actividad antiviral de las nanopartículas de plata Argovit® contra el virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV), patógeno zoonótico de gran importancia. Comprobaron que la aplicación de nanopartículas de plata es útil para controlar la infectividad de este virus (Borrego et al., 2016).

### ***Peces (efecto antihelmíntico)***

En el 2019 Pimentel-Acosta y colaboradores, determinaron el efecto antihelmíntico de las nanopartículas de plata (AgNPs) en un cultivo de peces de agua dulce del género *Cichlidogyrus spp* como organismo modelo. El estudio se realizó con dos tipos de AgNPs con diferentes metodologías de síntesis y tamaños: nanopartículas ARGOVIT (35 nm) y nanopartículas UTSA (1–3 nm), en los resultados se observó que las AgNPs de UTSA a una concentración de 36 µg / L durante 1 h fue 100% efectiva contra huevos y parásitos adultos, señalando que fueron más efectivas que ARGOVIT en ambos casos. Concluyen que, ningún informe previo ha evaluado el efecto de AgNPs en parásitos metazoico de peces y sostienen que su trabajo proporciona una base para futuras investigaciones sobre el control de enfermedades parasitarias de peces (Pimentel-Acosta et al., 2019).

### ***Parásitos (genero Tetrahymena)***

Fuentes-Valencia en el 2020, encontraron que las nanopartículas de plata Argovit® son eficaces para combatir parásitos ciliados del género *Tetrahymena* en peces sin evidencia de efectos nocivos para los peces (Fuentes-Valencia et al., 2020).

### ***Parásitos (Perkinsus marinus)***

De igual manera Bravo-Guerra y colaboradores en el 2020, utilizaron exitosamente Argovit® contra del parásito *Perkinsus marinus*, como infectante de varias especies de ostras y

comprobaron que el tratamiento con AgNPs o AgNO<sub>3</sub> a una concentración de 0.927 mM de plata, es altamente letal, con más del 90% de mortalidad (Bravo-Guerra, Cáceres-Martínez, Vázquez-Yeomans, Pestryakov, & Bogdanchikova, 2020).

### *Camarones (actividad contra el virus del síndrome de la mancha blanca)*

Entre los trabajos más recientes encontramos el de Romo-Quñones y colaboradores en el 2020, quienes realizaron cuatro ensayos experimentales para mejorar la actividad biológica contra el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en cultivos de camarones. Dicho experimento se realizó con la nueva formulación de nanopartículas de plata llamada Argovit-4 y los experimentos se prepararon con pequeñas modificaciones para observar su efectividad. Dentro de los objetivos se encontraba determinar el efecto protector de Argovit-4 contra WSSV, determinar si esta nueva formulación complementada en el alimento exhibe toxicidad hacia los camarones, analizar Argovit-4 como antiviral (si esta formulación puede prevenir, retrasar o reducir la mortalidad de los camarones inducida por WSSV) y determinar si Argovit-4 suplementado en el alimento altera la respuesta inmune en las primeras etapas del camarón. En el experimento 1, varios inóculos virales calibrados a 7 SID50 (dosis infecciosas 50% de punto final para camarones) fueron expuestos a 40, 100, 200 y 1,000 ng / SID50 de Ag + y luego inyectado por vía intramuscular en camarones durante 96 h. Experimento 2, los camarones fueron alimentados con Argovit-4 suplementado en alimento a diferentes concentraciones (10, 100 y 1,000 µg por gramo de alimentación) durante 192 h. En el experimento 3, los camarones fueron tratados con Argovit-4 suplementado en alimento a diferentes concentraciones y luego desafiado contra WSSV por 192 h. En el experimento 4, se realizó RT-qPCR para medir la respuesta transcripcional de cinco genes relevantes inmunológicamente en hemocitos de camarones tratados con Argovit-4 suplementado en alimento a las 0, 6, 12, 24 y 48 h. los

Argovit-4 inyectado por vía intramuscular, lo cual mostró un efecto dependiente de la dosis ( $p < 0.05$ ) en la mortalidad acumulada de camarones de 0 a 96 h después de la infección. Dentro de los resultados más relevantes se encontró que en el segundo experimento no hay signos de toxicidad para el ensayo durante las 92 h del experimento. En el tercer y cuarto experimento mostraron que los camarones con WSSV a 1,000  $\mu\text{g} / \text{g}$  de alimento, presento una mortalidad reducida sin alterar la expresión de algunos genes relacionados con el sistema inmunitario. Esto demuestra una nueva estrategia terapéutica para controlar WSSV y posiblemente otros patógenos de invertebrados en la acuicultura de langostinos (Romo-Quíñonez et al., 2020).

### *Linfocitos humanos*

Otro trabajo reciente es el de Ruiz-Ruiz y colaboradores en el 2020, quienes comparan el comportamiento citotóxico y genotóxico de Argovit® y nanoComposix, ambas nanopartículas con formulaciones similares recubiertas de polivinilpirrolidona (PVP), estos autores utilizaron el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN) en cultivos primarios de linfocitos, se evaluó la inducción de micronúcleos (MNi) y el índice mitótico. Sus resultados mostraron diferencias en la respuesta citotóxica y genotóxica de ambas formulaciones, efectivamente no son genotóxicas solo considerando la frecuencia de micronúcleos, sin embargo, presentan diferencias cuando se analizan otros parámetros como citostasis, la apoptosis, la necrosis, gemas nucleares (NBUD) y puentes nucleoplasmáticos (NPB). Se determinó en este estudio que Argovit® (35 nm PVP-AgNPs) y nanoComposix (50 nm PVP-AgNPs), en concentraciones de 0.012 a 12  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , no producen cambios en la frecuencia del índice de división nuclear (NDI) o micronúcleos (MNi) en comparación con los valores encontrados en cultivos de control. No obstante, las PVP-AgNP de 50 nm disminuyen significativamente el índice de replicación y aumentan significativamente la citostasis, la

apoptosis, la necrosis y las frecuencias de NBUD y NPB. Con base en estos resultados, los autores establecen que hay evidencia en favor de que el ensayo CBMN utilizando linfocitos humanos, es una herramienta de detección sensible, rápida, precisa y económica para apoyar o descartar la citotoxicidad y genotoxicidad de las AgNPs u otros nanomateriales, a través de la evaluación de los ocho biomarcadores proporcionados por la técnica, haciéndola valiosa para pruebas continuas de efectividad y toxicidad de nanomateriales para aplicaciones biomédicas. Además, proporciona información muy importante sobre el papel desempeñado por la relación [agente de recubrimiento] / [metal] en el diseño de nanomateriales, que podrían reducir los efectos adversos tanto como sea posible mientras conservan sus capacidades terapéuticas (Ruiz-Ruiz et al., 2020).

#### *Trabajos realizados utilizando Argovit® Plantas*

Respecto a los estudios que se han realizado con Argovit en plantas encontramos tres trabajos, en desinfección y micropropagación de plantas de gran valor comercial, el efecto cito y genotóxico en dichas plantas y la actividad en contra enfermedad de Huanglongbing en cítricos.

#### ***Micropropagación de plantas de vainilla***

En el 2017 Spinoso-Castillo y colaboradores, estudiaron el uso potencial de Argovit® en los procesos de micropropagación comercial de plántulas (*Vanilla planifolia*). El objetivo de dicho trabajo fue evaluar los efectos antimicrobianos y horméticos de Argovit, sobre la regeneración in vitro de vainilla (*Vanilla planifolia*) utilizando un sistemas de inmersión temporal (TIS, por sus siglas en inglés). Se utilizaron cinco concentraciones diferentes 0, 25, 50, 100 y 200 mg/L, a 30 días de cultivo, se evaluó el porcentaje de contaminación, la regeneración y longitud del brote, el efecto de las nanopartículas sobre el contenido fenólico total (TPC, por sus siglas en inglés),

producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), la capacidad antioxidante (ORAC, por sus siglas en inglés) y la peroxidación mediante la cuantificación malondialdehído de (LP-MDA). Dentro de los resultados de los tratamientos con Argovit® encontraron que en las concentraciones de 50, 100 y 200 mg/L existió una reducción de la contaminación en el cultivo, se observó estimulación en el crecimiento a concentraciones de 25 y 50 mg/L y una inhibición en concentraciones de 100 y 200 mg/L. El análisis mostró cambios en las concentraciones de macro y micronutrientes, además indujo aumento en la producción de ROS, TPC, ORAC y LP-MDA con un efecto dependiente de la dosis. Como conclusión obtuvieron que la adición de 50 mg/L de Argovit® en los medios de cultivo tuvo un efecto antimicrobiano. Además, el uso de Argovit® podría ser una muy buena estrategia para una eficiente micropropagación comercial de vainilla y otras especies (Spinoso-Castillo et al., 2017a).

### ***Efecto cito y genotoxico en plántulas de Vainilla***

Bello-Bello y colaboradores en el 2018, presentaron el primer estudio de los efectos citotóxicos y genotóxicos promovidos por AgNPs (Argovit®) en plántulas de *Vainilla planifolia* después de un período de exposición de seis semanas, mostrando que el crecimiento de las plántulas de *V. planifolia* con dosis de 25 y 50 mg/L favorecen la citotoxicidad con una pequeña disminución en el índice mitótico. Además, se encontró una dependencia de la dosis con la frecuencia de células con aberraciones cromosómicas y micronúcleos. Sin embargo, los efectos genotóxicos podrían considerarse mínimos debido a que esto se observó con la mayor concentración empleada, 200 mg/L; el porcentaje total de aberraciones cromosómicas es inferior al 5%, con solo tres micronúcleos en 3000 células, a pesar de la exposición prolongada a Argovit®. Por lo tanto, se identificaron como concentraciones seguras para el crecimiento de *V. planifolia* en condiciones

*in vitro* las de 25 y 50 mg /L, que equivalen a 1.5 y 3 mg/L de plata metálica, respectivamente. También se observó que la exposición de las plántulas a AgNPs aumentan el polimorfismo, lo que podría ser útil para promover la variabilidad genética de esta especie. Un aspecto que limitó la interpretación de estos datos fue la falta de un control positivo para el número de micronúcleos para *V. planifolia* (Bello-Bello et al., 2018).

### ***Actividad en contra enfermedad de Huanglongbing***

Stephano-Hornedo (2020), establece que la enfermedad de Huanglongbing (HLB), comúnmente conocida como "enfermedad del dragón amarillo", afecta a los cultivos de cítricos en todo el mundo y tiene un efecto devastador en el sector agroindustrial. En este trabajo evalúa la capacidad de las nanopartículas de plata Argovit® para erradicar directamente la bacteria responsable de la enfermedad de Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), en el campo. Los AgNPs fueron administrados por aspersión foliar e inyección en el tronco de 93 árboles enfermos con resultados notables. Ambos métodos producen una disminución del 80-90% del título bacteriano cuantificado por qRT-PCR en el tejido foliar recolectado en comparación con el grupo de control. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido muestran una reducción esencial de acumulación de almidón en los vasos del floema después de los tratamientos con AgNPs sin evidencia de bacterias en muestras analizadas en comparación con otros métodos efectivos que involucran antibióticos  $\beta$ -lactámicos, la potencia de AgNPs Argovit® es de 3 a 60 veces mayor cuando se administra por aspersión foliar y de 75 a 750 veces mayor cuando la administración fue por inyección troncal. Proponen a Argovit® como una alternativa prometedora para el tratamiento de árboles infectados en el campo (Stephano-Hornedo et al., 2020).

Los trabajos presentados anteriormente, son trabajos realizados por nuestro grupo de trabajo durante los últimos años, los cuales han estudiado una formulación comercial de PVP-AgNPs conocida como Argovit®, en estas investigaciones se han encontrado resultados sorprendentes con grandes aplicaciones en diferentes campos, así que el estudio de la toxicidad para el medio ambiente de estas AgNPs es de gran importancia, lo cuál será el propósito de este trabajo.

### *Nanopartículas de plata en los sistemas vegetales*

En la actualidad el uso de plantas superiores como bioindicadores de agentes tóxicos en el ambiente ha tenido un incremento debido a que son buenas indicadoras de los efectos citotóxicos y genotóxicos producidos por de diversos contaminantes (Hossain, Mustafa, & Komatsu, 2015; Kumari, Mukherjee, & Chandrasekaran, 2009a; Leme & Marin-Morales, 2009). Dentro de las plantas más utilizadas se encuentran: *Allium cepa* (Cebolla), *Arabidopsis thaliana* (Bracica), *Glycine max* (Soya), *Hordeum vulgare* (Cebada), *Tradescantia paludosa* (Traperaba), *Vicia faba* (Haba) y *Zea mays* (Maiz) (Leme & Marin-Morales, 2009). La Agencia de Protección al Ambiente (EPA por sus siglas en inglés) en 1999 considera a estas especies como modelos biológicos para la evaluación de genotoxicidad (K. Patlolla, 2013).

La toxicidad de una sustancia se puede definir como la capacidad que tiene dicho agente, ya sea físico, químico, biológico o bien mezclas complejas, de inducir efectos adversos a distintas escalas sobre un individuo completo o a nivel celular (Silbergeld, 1998). Dos ámbitos de estudio de la toxicidad que se expresan a nivel de daño celular son la citotoxicidad y genotoxicidad. La primera alude a cambios en la dinámica celular como el metabolismo y la duración de las diferentes etapas del ciclo celular y la segunda se refiere a las alteraciones en la estructura del genoma, situada en la disciplina conocida como toxicología genética.

### *Evaluación AgNPs con otros modelos vegetales*

Se han evaluado las AgNPs con otros modelos vegetales, con diversos efectos negativos como reducción en la germinación, transpiración, o longitud del brote, entre otros en las siguientes plantas: *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Linum usitatissimum*, *Lolium perenne*, *Phaseolus radiates*, *Sorghum bicolor*, *Cucurbita pepo*, *Phaseolus radiates*, *Sorghum bicolor*, *Arabidopsis thaliana*, *Lemma minor* y plantas de humedales. Por otro lado, también reportaron efectos positivos como aumento en la supervivencia, mejor crecimiento, mejoras en el uso del agua, entre otras en: *Carum copticum*, *Arabidopsis thaliana*, *Crocus sativus*, *Glycine max*, *Chrysanthemum morifolium*, *Pelargonium zonale*, *Populus deltoides* y plantas de humedales (Tabla 1).

Los efectos encontrados en los trabajos previos son: reducción del crecimiento radicular, geminación reducida y reducción en la transpiración. El efecto negativo más frecuente es la reducción del crecimiento radicular observado en *Triticum aestivum* (Dimkpa et al., 2013), *Linum usitatissimum* y *Lolium perenne* (Yehia Sayed El-Temsah, Erik J. Joner 2012), *Phaseolus radiates* y *Sorghum bicolor* (Lee, Kwak, & An, 2012), *Lemma minor* (Gubbins, Batty, & Lead, 2011; Pereira et al., 2018), *Arabidopsis thaliana* (Yao et al., 2012) y plantas de humedales (Yin, Colman, McGill, Wright, & Bernhardt, 2012), otro efecto negativo es la geminación reducida en *Hordeum vulgare* (Yehia Sayed El-Temsah, Erik J. Joner 2012) y por último, la reducción de la transpiración observada en *Cucurbita pepo* (Science et al., 2009). Estos efectos tienen una relación con el tamaño de las AgNPs utilizadas que oscilan entre 1 a 25 nm, concentraciones altas (100 y 500 mg/L) y un tiempo de exposición mayor a cinco días. Se ha encontrado plata residual presente en el suelo y esta puede ser captada y almacenada por vegetales comunes como *Brassica juncea* y *Medicago sativa*, independientemente del tiempo de exposición y la

concentración de plata en el sustrato o la forma en cómo se encuentra, ya sea como iones o como nanopartículas. (Harris & Bali, 2008).

Por otro lado, dentro de los efectos positivos se encuentra el enriquecimiento de la actividad antioxidante, promoción del crecimiento radicular, reducción de bacterias en el tallo, promoción de germinación, mayor longevidad de los pétalos y reducción de la peroxidación lipídica.

El enriquecimiento de la actividad antioxidante se observa en *Arabidopsis thaliana* (Kohan-Baghkheirati & Geisler-Lee, 2015) y *Pelargonium zonale* (Hatami & Ghorbanpour, 2013). La promoción de crecimiento radicular se observa en *Crocus sativus* (Rezvani, Sorooshzadeh, & Farhadi, 2012), *Glycine max* (Mustafa, Sakata, Hossain, & Komatsu, 2015), *Arabidopsis thaliana* y *Populus deltoides* (J. Wang et al., 2013) Tabla 1.

Otro efecto positivo es la promoción de la germinación observado en plantas de humedales (Yin et al., 2012), además se observa la reducción de bacterias en el tallo y mayor longevidad de los pétalos como en *Chrysanthemum morifolium* (Kazemipour, Hashemabadi, & Kaviani, 2013). Un efecto positivo observado en *Pelargonium zonale* es la reducción de la peroxidación lipídica (Hatami & Ghorbanpour, 2013). Tabla 1.

**Tabla 1.** Análisis de exposición de AgNPs utilizando otros modelos vegetales, comparando tamaño, duración y concentración.

Efecto	Planta	Tamaño AgNPs	Concentración en AgNPs	Tiempo expo	Características físico químicas	Autores
Germinación reducida	<i>Hordeum vulgare</i> L.	1 to 20 nm	100 µg/mL	5 días	Se utilizaron nanopartículas de plata: se adquirieron nanopartículas de plata coloidal (Agcoll) en suspensión acuosa con 20 mg de Ag L21 y un pH de 8,0 de Purest Colloids, Westampton, Nueva Jersey (nombre comercial "MesoSilver"). Estos tenían un rango de tamaño de partícula de 0,6 a 2 nm, según el fabricante.	Yehia Sayed El-Temsah, Erik J. Joner 2012
Longitud de disparo reducida	<i>Linum usitatissimum</i> L.	1 to 20 nm	100 µg/mL	5 días	Se utilizaron nanopartículas de plata: se adquirieron nanopartículas de plata coloidal (Agcoll) en suspensión acuosa con 20 mg de Ag L21 y un pH de 8,0 de Purest Colloids, Westampton, Nueva Jersey (nombre comercial "MesoSilver"). Estos tenían un rango de tamaño de partícula de 0,6 a 2 nm, según el fabricante.	Yehia Sayed El-Temsah, Erik J. Joner 2012

Longitud de disparo reducida	<i>Lolium perenne</i> L	1 to 20 nm	100 µg/mL	5 días	Se utilizaron nanopartículas de plata: se adquirieron nanopartículas de plata coloidal (Agcoll) en suspensión acuosa con 20 mg de Ag L21 y un pH de 8,0 de Purest Colloids, Westampton, Nueva Jersey (nombre comercial "MesoSilver"). Estos tenían un rango de tamaño de partícula de 0,6 a 2 nm, según el fabricante.	Yehia Sayed El-Temseh, Erik J. Joner 2012
------------------------------	----------------------------	------------	-----------	--------	--	---

---

Reducción de la transpiración	<i>Cucurbita pepo</i>		500 y 100 µg/mL	16 días	Las nanopartículas y los materiales a granel correspondientes utilizados se adquirieron comercialmente y se utilizaron tal como se compraron	Stampoulis et al 2009
-------------------------------	-----------------------	--	-----------------	---------	--	-----------------------

---

Inhibición del crecimiento	<i>Phaseolus radiates,</i> <i>Sorghum bicolor</i>	5–25 nm	5,10,20,40 µg/mL	2 días	Las nanopartículas de prueba utilizadas aquí fueron nanopartículas de plata recubiertas con citrato (AgNP), proporcionadas por ABC Nanotech (Daejeon, Korea). Los AgNP estaban en estado coloidal. Según el fabricante, los tamaños de partícula oscilaron entre 5 y 25 nm (promedio de 10 nm). Las partículas tenían un rango de pH de 5-7.	Woo-Mi et al 2011
Reducción del crecimiento en tratamientos de nanopartículas recubiertas con goma arábica (GA-AgNPs) respecto al control	Plantas de humedales	6 ±1.7	1,10 y 40 µg/mL	20 días	Las nanopartículas de Ag recubiertas de PVP (PVP-AgNP) se compraron en polvo seco (Nanoamorphous Materials, Los Alamos, EE. UU.), se suspendido en agua desionizada (resistividad .18 MV cm; suspensión pH = 5.8) para hacer una suspensión madre de 250 mg de Ag L21 sonicándolos durante 10 minutos usando un sonicador tipo sonda (Misonix, QSonica LLC, Newton, EE. UU.)	Yin et al 2012

Inhibición del crecimiento de las plantas relacionado con el tamaño de la NP, aumentado con el tiempo de exposición.	<i>Lemma minor</i>	20 29.2 ± 10.9 nm y 93.52 ± 48.6 nm	5, 10, 20, 40, 80 and 160 µg/mL	14 días	Los AgNP se produjeron mediante métodos estándar ligeramente modificados	Gubbins et al 2011
Las AgNPs -PVP es más perjudicial para el crecimiento mientras que AgNPs-Citrato afecta la incidencia de clorosis, aumentando con el tiempo de exposición.	<i>Lemma minor</i>	AgNPs- Citrato 80.78 ± 7.46 nm AgNPs - PVP 91.81 ± 7.07 nm	0.05, 2 µg/mL	14 días	Suspensiones de NP de Ag (20 mg / L, NanoXact) con distintas superficies orgánicas Los revestimientos faciales (citrato y PVP) se compraron a NanoComposix (EE.UU.). Partículas esféricas con un diámetro de 79,0 (SD = ± 8,0) nm (medición por microscopía electrónica de transmisión (TEM)) y una pureza del 99,99%. El AgNO <sub>3</sub> , utilizado como fuente de Ag <sup>+</sup> , se compró a Sigma-Aldrich (EE.UU.) con un 99,99% de pureza	Pereira et al 2018
Las AgNPs inhibió el alargamiento de la raíz de las plántulas y demostró una relación dosis-respuesta de manera lineal	<i>Arabidopsis thaliana</i>	20, 40 y 80 nm	66.84, 133.68, 267.36, 534 µg/mL	14 días	Se adquirieron AgNP de tres tamaños, 20, 40 y 80 nm (7,0 x 10 <sup>10</sup> , 9 x 10 <sup>9</sup> , 1,1 x 10 <sup>9</sup> partículas / ml) de Ted Pella Inc. (Redding, CA) y se usaron tal como se recibieron.	Geisler-Lee et al 2012

AgNPs mostraron cierta toxicidad en concentraciones altas y esta susceptibilidad aumento al disminuir el tamaño de las nanopartículas, sin embargo se observó un efecto estimulante sobre alargamiento de la raíz, el peso fresco y la evapotranspiración.	<i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Populus deltoides</i>	5 a 10 nm	0.01 a 100 µg/mL	11 días	El polvo comercial de AgNPs y las suspensiones de agua de AgNPs concentradas (23 mg / L) hechas a medida se cubrieron con papel de aluminio y se almacenaron en cámaras anaeróbicas (4% H <sub>2</sub> , 4% CO <sub>2</sub> , 92% N <sub>2</sub> ). Las imágenes TEM mostraron que los AgNPs de Novacentrix de 25 nm (27,3 ± 5,6 nm) no eran uniformes en tamaño y se agregaron después de 15 días de incubación en una solución Hoagland de 1/4 de concentración (pH 6,8)	Wang et al 2013
Ningún efecto sobre el rendimiento y la eficiencia del uso del agua	<i>Carum copticum</i>	20 nm			No especifica	Seghatoleslami et al. (2015)
Sobre expresión de genes asociados con la actividad antioxidante, estos fueron regulados por las AgNPs y por el estrés por frío con 35 % de similitud.	<i>Arabidopsis thaliana</i>			10 días	No especifica	Kohan-Baghkheirati and Geisler-Lee (2015)
Promoción del crecimiento radicular, por bloqueo de la señalización de etileno	<i>Crocus sativus</i>		40, 80 y 120 µg/mL	90 min	No especifica	Rezvani et al. (2012)

Mejora el crecimiento de las plantas, reducción de la generación de subproductos citotóxicos de la glucólisis.	<i>Glycine max</i>	2, 15, y 50–80 nm	0.2, 2, y 20 µg/mL	4 días	Las partículas de AgNPs de diferentes tamaños (2, 15 y 50-80 nm; donadas por nanomateriales de investigación de EE. UU., Houston, TX, EE. UU.)	Mustafa et al. (2015b)
Aumento de la supervivencia y la succulencia de las flores cortadas, reducción de bacterias en el tallo.	<i>Chrysanthemum morifolium</i>				No especifica	Kazemipour et al. (2013)
Incremento de las actividades de enzimas antioxidantes, Chl y carotenoides, reducción de la peroxidación lipídica y mayor longevidad de los pétalos.	<i>Pelargonium zonale</i>		20, 40, 60 y 80 µg/mL	5 días	Las partículas NS se adquirieron de la Iranian Nanomaterials Pioneers Company, NANOSANY (Mashhad, Irán). El tamaño de las partículas NS se estimó en 10-20 nm de diámetro, de base metálica y esféricas. Se usó agua desionizada para preparar 0, 20, 40, 60 y 80 mg L – 1 Soluciones NS.	Hatami and Ghorbanpour (2013)

<p>PVP-AgNPs Mayor porcentaje de germinación vs GA-AgNPs</p>	<p>plantas de humedales</p>	<p>21 ±17</p>	<p>1,10 y 40 µg/mL</p>	<p>20 días</p>	<p>Las nanopartículas de Ag recubiertas de PVP (PVP-AgNPs) se compraron en polvo seco (Nanoamorphous Materials, Los Alamos, EE. UU.), se suspendido en agua desionizada (resistividad .18 MV cm; suspensión pH = 5.8) para hacer una suspensión madre de 250 mg de Ag L21 sonicándolos durante 10 minutos usando un sonicador tipo sonda (Misonix, QSonica LLC, Newton, EE. UU.)</p>	<p>Yin et al 2012</p>
--	-----------------------------	-------------------	--------------------------------	----------------	--	-----------------------

*Allium cepa* es una de las especies de plantas más utilizadas para el estudio de la citotoxicidad y la genotoxicidad, FISKESJÖ en 1985, publica la estandarización de la técnica *Allium test* y asegura que es una gran herramienta de monitoreo ambiental debido a que permite determinar la toxicidad de muchos compuestos por su gran sensibilidad y similitud con otros modelos (Fiskesjo, 1985; Leme & Marin-Morales, 2009), además de ser *Allium cepa* un producto de bajo costo para su obtención y mantenimiento (Asita & Matobole, 2010). Por ello se generó un protocolo conocido como *Allium test* que permite determinar los efectos tóxicos de sustancias o mezclas complejas (Bosio & Laughinghouse IV, 2012). Utilizando *Allium test* es factible medir la toxicidad a nivel celular que expresa en dos formas: un menor desarrollo radicular y un menor índice de división mitótica, de forma que es posible observar y comparar diferencias significativas entre los compuestos a distintas concentraciones o diferentes tiempos de exposición (Berrocal et al., 2013). Otro parámetro de toxicidad que se puede medir con *Allium test* es la toxicidad a nivel genético, mediante el conteo de anomalías cromosómicas expresado por puentes anafásicos, deleciones, translocaciones y fragmentos de cromosomas en forma de micronúcleos (MN). (William F. Grant, 1982; Rank & Nielsen, 1998).

Al evaluar la citotoxicidad y la genotoxicidad de los nanomateriales basados en plata, se han descrito varios efectos adversos en el modelo de *Allium cepa*, sin embargo, la falta de caracterización de estos nanomateriales dificulta el atribuir el efecto tóxico al nanomaterial, a sus propiedades fisicoquímicas o a alguno de sus componentes.

Kumari y colaboradores, 2009 evaluaron unas nanopartículas de plata con cuatro diferentes concentraciones, 20, 25, 75 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , encontrando que las nanopartículas de plata penetran en el sistema de la planta y afectan diferentes etapas de la división celular, inducen múltiples roturas cromosómicas y generan la desintegración de la célula (**Tabla 2**). No obstante, las

nanopartículas que estos autores evalúan no cuentan con una caracterización fisicoquímica completa.

En otro trabajo Panda et al., 2011 realizaron biosíntesis *in vitro* de nanopartículas de plata AgNP-P, y compararon sus efectos con otras nanopartículas AgNP-S (Sigma-Aldrich, USA) y con nitrato de plata como fuente de iones plata utilizando el modelo *Allium test*, encontraron efectos similares para las dos AgNPs, pero menor daño citotóxico y mayor daño genotóxico que el control negativo, este mayor daño genotóxico también se ve exhibido por el Ag<sup>+</sup> solo.

Ghosh et al., 2012 evaluaron la genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de plata (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), con un tamaño menor de 100 nm encontrando que la concentración evaluada de 50 µg/mL para *Allium cepa* y 75 µg/mL para *Nicotiana tabacum* tiene un efecto en el ADN determinado por ensayo cometa, sin embargo, este efecto solo se ve en raíz y no en hoja. En concentraciones altas encontraron una disminución gradual en el efecto que fue atribuido a las propiedades de los nanomateriales, específicamente a formas aglomeradas.

En otro trabajo se evaluaron las nanopartículas de Ag, Cu, Fe, Zn y Mn en soluciones coloidales reportando la capacidad para la inhibición de la mitosis en el siguiente orden: Cu ≥ Zn ≥ Ag ≥ Fe, mientras que Mn tiene un efecto positivo en el crecimiento de la raíz (Ulynets et al., 2014).

Posteriormente, Cvjetko y colaboradores en el 2017, realizan un trabajo sobre toxicidad de iones de plata y nanopartículas de plata con diferentes ligantes evaluando sus efectos en raíces de *Allium cepa*, encontraron que la forma iónica de la plata (Ag<sup>+</sup>) es más tóxica que cualquiera de las AgNPs utilizadas, aunque informan que las AgNPs causaron estrés oxidativo y toxicidad solo cuando se aplicaron en concentraciones altas y la toxicidad más alta se registró para aquellas AgNPs cubiertas con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

**Tabla 2.** Análisis de exposición de AgNPs utilizando *Allium test*, comparando tamaño, duración y concentración.

Efecto	Planta	Tamaño AgNPs	Concentración de AgNPs	Tiempo exposición	Propiedades físico químicas	Autores
<p>Los resultados muestran que las concentraciones de 5, 10, 15, 25, 50, 75 y 100 µg/mL evaluadas de AgNPs no presentan efectos citotóxicos y genotóxico, a diferencia del control positivo de NaAsO<sub>2</sub> (0.37 µg/mL), en concentraciones bajas 5 y 10 µg/mL presentaron promoción de crecimiento en elongación y número de raíces.</p>	<i>Allium cepa</i>	35 nm	83, 166.6, 249.9, 416.5, 833, 1249.5 y 1666 µg/mL	72 hrs	<p>Argovit® contenido de plata metálica 1.2 % en peso, contenido de revestimiento de PVP 18.8 % en peso, forma esférica, diámetro promedio de 35 nm y su distribución de tamaños es de 1 a 90 nm (se midieron por microscopio electrónico de transmisión (MET)), diámetro hidrodinámico promedio de 70 nm, potencial zeta de -15 mV y resonancia de plasmón superficial en 420 nm</p>	(Casillas-figueroa et al., 2020)
<p>Mitosis disminuida, pared celular desintegrada y rota</p>	<i>Allium cepa</i>	100 nm	25, 20, 75, and 100 µg/mL	4 hrs	<p>Sigma-Aldrich tamaño: &lt;100 nm, pureza: 99,5% en base a metales traza</p>	(Kumari, Mukherjee, & Chandrasekaran, 2009b)

20 y 40 mg / L. Aumento de la frecuencia de células con MN y Aberraciones cromosómicas por dependencia de la dosis $\geq 10$ mg / L: daño al ADN (ensayo cometa)	<i>Allium cepa</i>	<100 nm	(0, 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	2 hrs	Sigma-Aldrich tamaño: <100 nm, pureza: 99,5% en base a metales traza	(Panda et al., 2011b)
No se observó daño en núcleos aislados de brotes. Los núcleos aislados de raíces expuestas a 25 y 50 $\mu\text{g}$ / ml mostraron daño en el ADN determinado por ensayo cometa. Se observó el mayor efecto	<i>Allium cepa</i>	$\leq 100$ nm	25, 50, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$	24 hrs	Sigma-Aldrich comercial Tamaño: <100 nm, pureza: 99,5% base de metales traza Caracterización realizada por los autores tamaño: TEM 70-130 nm, av. $\sim 125$ nm; SEM: 90-180 nm, av. 120 nm; $\zeta$ potencial: -4,86 mV	(Ghosh et al., 2012)
Los AgNP penetraron las raíces, afectándola germinación, índice mitótico, anormalidad nuclear e índice de micronúcleos. Los cambios en estos indicadores fueron AgNPs dependientes del diámetro.	<i>Allium cepa</i>	5, 25, 50, y 75 nm).	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	48 hrs	AgNPs-PVP, nanoComposix® (diámetro nominal de 5, 25, 50 y 75 nm).	(Scherer et al., 2019)

<p>AgNPs genotóxicas en lugar de citotóxico. Teniendo aberraciones cromosómicas: alteraciones del huso, aberraciones clastogénicas y adhesividad cromosómica.</p>	<p><i>Allium cepa</i></p>	<p>20 - 30 nm</p>	<p>5, 10, y 15 µg/mL</p>	<p>3, 6, y 9 hrs</p>	<p>AgNP-PVP, de Nanotech, tamaño medio de 20 a 30 nm</p>	<p>(Fouad &amp; Hafez, 2018)</p>
<p>AgNPs indujo una disminución del índice mitótico y un aumento del número de aberración cromosómica para dos concentraciones estudiadas. Cuando AgNPs estaba en presencia de CMC, no había potencial citotóxico, solo el potencial genotóxico en una concentración de 12,4 ppm.</p>	<p><i>Allium cepa</i></p>	<p>2 y 8 nm</p>	<p>1.50 y 15 µg/mL , (colloidal solution of AgNP) 1.24 y 12.40 µg/mL (CMC/AgNP-PVA)</p>	<p>24 hrs</p>	<p>Las nanopartículas de plata se sintetizaron mediante una reacción de reducción química de iones de plata. (usando AgNO<sub>3</sub>) mediante un agente reductor (NaBH<sub>4</sub>) en presencia de un agente estabilizador (PVA) Para obtener CMC / nanopartículas de plata (CMC / AgNP-PVA) filmógenas solución, se añadió 1% de CMC (m / v) a la solución de nanopartículas de plata, tamaño: 2 y 8 nm</p>	<p>(Becaro et al., 2017)</p>

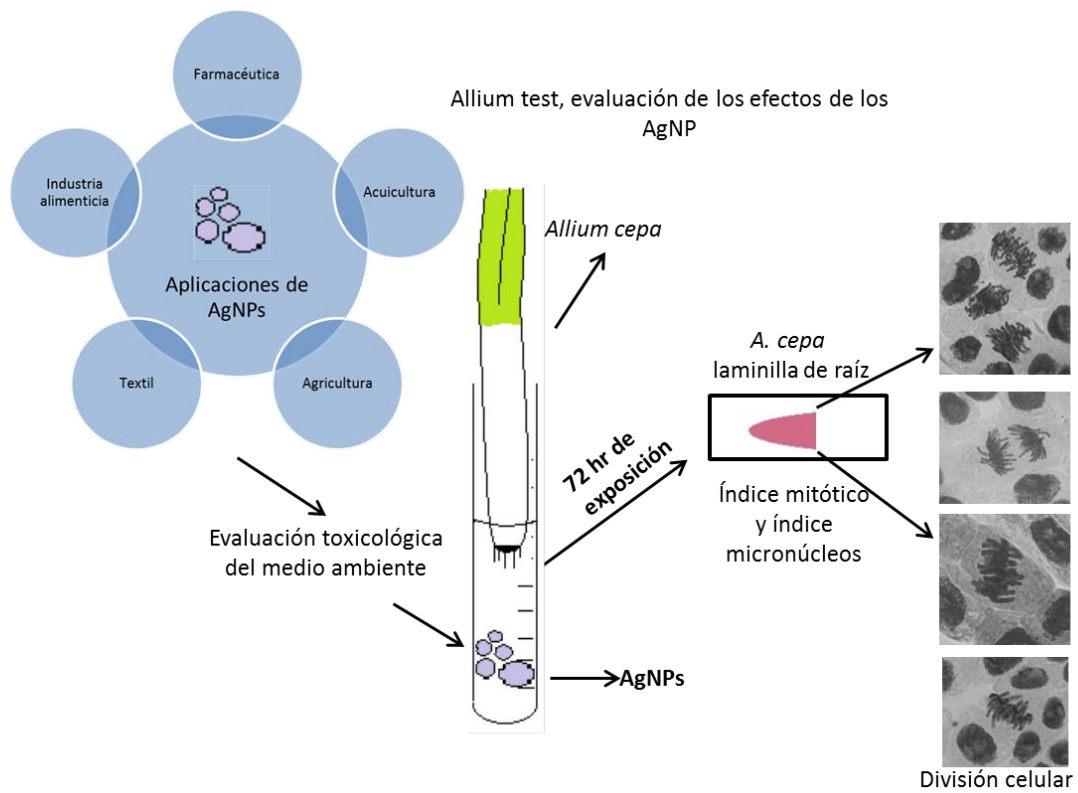
<p>El índice mitótico disminuyó en concentraciones de 5 mg / L tratadas (53%) para nanopartículas de plata, se registró que algunas anomalías cromosómicas específicas</p>	<p><i>Allium cepa</i></p>	<p>17–24 nm</p>	<p>1, 5 y 10 <math>\mu\text{g/mL}</math></p>	<p>72 hrs</p>	<p>Las nanopartículas de plata fueron biosintetizadas por plantas. extracto, AgNPs, tamaño: 17–24 nm</p>	<p>(Debnath, Mondal, Hajra, Das, &amp; Mondal, 2018)</p>
<p>La forma <math>\text{Ag}^+</math> es más tóxica que cualquiera de las AgNPs utilizados. Todas las AgNPs causaron estrés oxidativo y toxicidad solo cuando se aplicaron en concentraciones altas. La toxicidad más alta se registró para AgNPs-CTAB</p>	<p><i>Allium cepa</i></p>	<p>AgNPs-Citrato <math>61.2 \pm 33.9</math>, AgNPs-PVP <math>9.4 \pm 1.3</math>, AgNPs-CTAB <math>5.6 \pm 2.1</math></p>	<p>25, 50, 75 y <math>100 \mu\text{M}</math> (2.5, 5.0, 7.5 y <math>10.0 \mu\text{g/mL}</math>)</p>	<p>72 hrs</p>	<p>Síntesis Citrato de AgNPs, tamaño: <math>13,8 \pm 4,9</math> nm; TEM: en forma de varilla; <math>\zeta</math> potencial: <math>-39,8 \pm 3,4</math> mV  AgNPs-PVP, tamaño: <math>9,4 \pm 1,3</math> nm; TEM: esférico; <math>\zeta</math> potencial: <math>-4,8 \pm 0,6</math> mV  AgNPs-CTAB, tamaño: <math>5,6 \pm 2,1</math> nm; TEM: esférico; <math>\zeta</math> potencial: <math>42,5 \pm 2,7</math> mV</p>	<p>(Cvjetko et al., 2017a)</p>

## **Objetivo General**

Evaluar los efectos citotóxicos, genotóxicos y fisiológicos producidos por las nanopartículas de plata (AgNPs) Argovit® en *Allium cepa*, mediante la cuantificación de micronúcleos, índice mitótico, lipoperoxidación, especies reactivas de oxígeno y capacidad antioxidante en raíces secundarias.

## **Objetivos Especificos**

1. Estandarizar la técnica de micropropagación de la especie vegetal, para utilizarla en los ensayos de genotoxicidad y citotoxicidad.
2. Determinar el efecto genotóxico y citotóxico del arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) y emplearlo como control positivo respecto a la respuesta de los tratamientos con AgNPs Argovit®.
3. Determinar y cuantificar la concentración de especies reactivas de oxígeno, capacidad antioxidante y lipoperoxidación en los tratamientos evaluados mediante kit para determinaciones de daño en células de raíces de cebolla.
4. Determinar y cuantificar experimentalmente el efecto genotóxico y citotóxico de diferentes diluciones de nanopartículas sobre cultivos vegetales, mediante la técnica micronúcleos.



**Figura 1.** Representación de la metodología para la evaluación de las AgNPs Argovit®.

## Método

### *Definición de Variables*

En este proyecto se consideraron como variables dependientes a los biomarcadores que se obtienen del ensayo *Allium test* en raíces secundarias de cebollas, los cuales son: el índice mitótico o índice de proliferación celular (IM), el número de micronúcleos (MN) presentes por cada 1000 células contadas. También se identifican como variables dependientes indicadores que medirán alteraciones fisiológico o muerte celular como: concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO), específicamente el peróxido de hidrogeno, capacidad antioxidante (CA) por cuantificación de radicales peróxido y la peroxidación lipídica cuantificando malondialdehído (MDA).

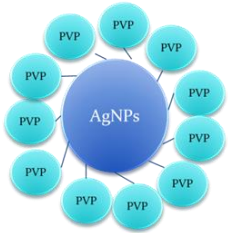
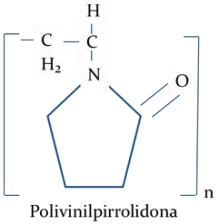
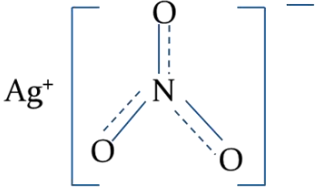
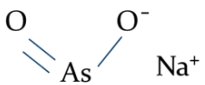
Se contemplaron como variables independientes. Las diferentes concentraciones (5, 10, 15, 25, 50, 75 y 100 µg/mL) de AgNPs Argovit®, AgNO<sub>3</sub> y polivinilpirrolidona (PVP) que se utilizaron en el modelo *Allium test*, así como los controles negativo (agua destilada) y positivo (arsenito de sodio) como testigos de daño genotóxico.

### *Diseño experimental*

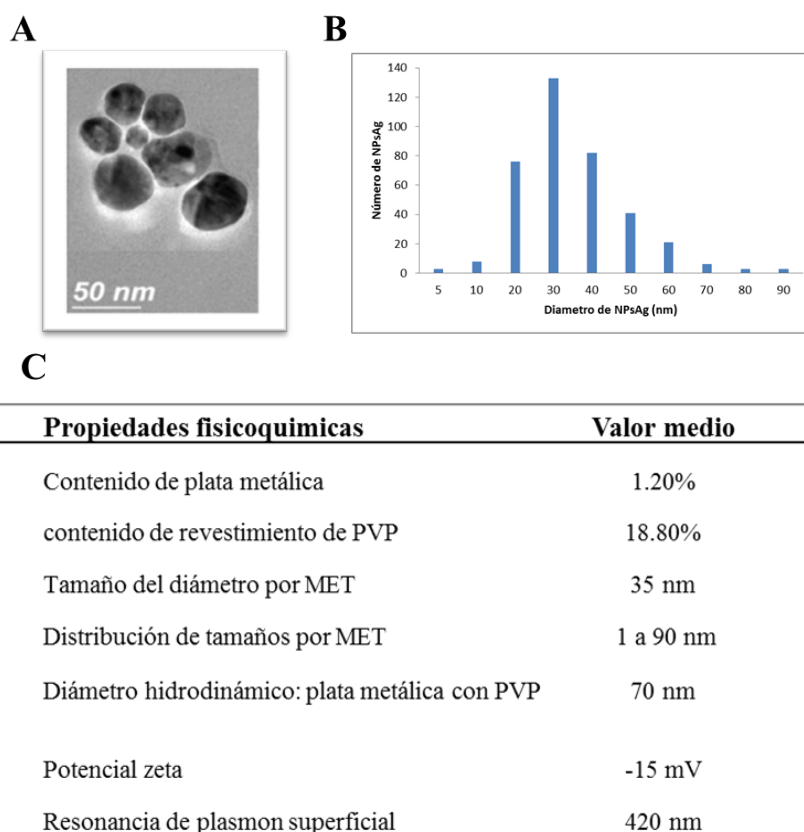
El experimento para la evaluación citotóxica o genotóxica con *Allium test* consistió en 69 cultivos, correspondientes a 69 laminillas (una laminilla por tratamiento) (**Tabla 3**).

El experimento para evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno, capacidad oxidativa y lipoperoxidación lipídica con el modelo de *Allium cepa* consistió de 23 cultivos con cinco replicas cada tratamiento.

**Tabla 3.** Concentraciones de los diferentes tratamientos evaluados; Nanopartículas de plata Argovit®, Nitrato de Plata, Polivinilpirrolidona, Agua Destilada y Arsenito de Sodio.

Tratamientos	Dilución	Replicas	
H <sub>2</sub> O (C -)	(C -)	3	
AgNPs	5 µg/mL	3	
	10 µg/mL	3	
	15 µg/mL	3	
	25 µg/mL	3	
	50 µg/mL	3	
	75 µg/mL	3	
	100 µg/mL	3	
PVP	78 µg/mL	3	 <p>Polivinilpirrolidona</p>
	156 µg/mL	3	
	235 µg/mL	3	
	391 µg/mL	3	
	783 µg/mL	3	
	1175 µg/mL	3	
	1566 µg/mL	3	
AgNO <sub>3</sub>	5 µg/mL	3	
	10 µg/mL	3	
	15 µg/mL	3	
	25 µg/mL	3	
	50 µg/mL	3	
	75 µg/mL	3	
	100 µg/mL	3	
As (C+)	0.037 µg/mL	3	

Las nanopartículas de plata Argovit® fueron facilitados por el centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs Argovit® se describen a continuación: contenido de plata metálica 1.2 % en peso, contenido de revestimiento de PVP 18.8 % en peso, forma esferoidal, diámetro promedio de 35 nm y su distribución de tamaños es de 1 a 90 nm (se midieron por microscopio electrónico de transmisión (MET)), diámetro hidrodinámico promedio de 70 nm, potencial zeta de -15 mV y resonancia de plasmón superficial en 420 nm (**Figura 2**).



**Figura 2.** Características fisicoquímicas de AgNPs Argovit®. A) Imagen que muestra la morfología esferoidal de AgNPs Argovit, B) frecuencia de distribución de tamaño de AgNPs calculada por MET, C) Resumen de las características fisicoquímicas.

El nitrato de plata (Sigma-Aldrich ACS reagent,  $\geq 99.0\%$ , 209139-25G) fue proporcionado por el Almacén de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California Campus Ensenada. Se preparó una solución inicial de 12000  $\mu\text{g/mL}$  que contenía 1.2 % de Ag metálica, de la cual se realizaron las concentraciones evaluadas.

El PVP fue proporcionado por el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) (Sigma S7400, St. Louis, MO) fue proporcionado por el Almacén de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California Campus Ensenada. Se preparó una disolución con una concentración de 0.37  $\mu\text{g/mL}$ .

Para el cálculo de las diferentes concentraciones de trabajo para AgNPs,  $\text{AgNO}_3$ , PVP y arsenito de sodio se utilizó la siguiente formula

$$C1*V1=C2*V2$$

Despejando la ecuación tenemos

$$C2 = \frac{C1 * V1}{V2}$$

Donde

C1 = es la concentración inicial de la sustancia de prueba

V1 = volumen inicial de la sustancia de prueba

C2 = es la concentración final de la sustancia de prueba

V2 = volumen final de la sustancia prueba

### *Preparación del material biológico y tratamientos evaluados*

Los bulbos utilizados fueron lavados y se recortaron las raíces hasta su base sin destruir los primordios, se utilizaron bulbos de 2 a 3 cm de diámetro colocados en tubos falcón de 50 mL y se sumergieron en diferentes diluciones de los agentes a evaluar. Las concentraciones evaluadas de AgNPs y AgNO<sub>3</sub> fueron 100, 75, 50, 25, 15, 10 y 5 µg/mL, para lograr esto: se tomó en cuenta la cantidad de plata metálica que contenían las nanopartículas que y en solución de AgNO<sub>3</sub>, mientras que las concentraciones de PVP fueron 78, 156, 235, 391, 783, 1175, 1566 5 µg/mL. Las concentraciones de PVP utilizadas son para emular la cantidad de PVP usada como recubrimiento, ya que el PVP tiene una proporción de 15.6 veces en peso respecto a la plata metálica dentro de la formulación Argovit. Se colocó un control negativo (H<sub>2</sub>O destilada) y un control positivo de daño genotóxico, arsenito de sodio en concentración 0.37 µg/mL. Todos los tratamientos se expusieron durante 72 horas, con excepción del tratamiento con arsenito de sodio que fue expuesto una hora (en este tratamiento se empezó 24 horas con agua destilada/una hora con arsenito de sodio/47 horas con agua destilada). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y se mantuvieron a una temperatura constante de 25 ° C ± 0.5 ° C en una incubadora y en la oscuridad (FISKESJÖ, 1979, 1985) (**Tabla 3**).

## *Toxicidad*

### ***Elongación y número de raíces***

Una vez preparados y colocados todos los tratamientos, se realizaron mediciones cada 24 horas por tres días y se registraron y midieron el número de raíces brotadas.

### ***Preparación de laminillas para la Evaluación Citotóxica y genotóxica***

Una vez terminado el tiempo de exposición, se cortan tres milímetros de las raíces y se fijan en metanol (EMPLURA®) al 80%, posteriormente se sumergen en HCl 5 N por 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se lavan con agua destilada quitando el exceso de ácido. Inmediatamente después, las raíces se sumergen en orceína-acética por 30 minutos y pasado ese tiempo se lavan con agua destilada, posteriormente se colocan en una disolución del colorante verde rápido por 20 minutos, pasado el tiempo se lavan con agua destilada. Finalmente, se coloca una raíz en un portaobjeto, se le coloca una gota de ácido acético glacial (reactivo A.C.S. Golden Bell<sup>MR</sup>) al 45 % y se cubre con un cubreobjetos para realizar un extendido celular "Squash" para observación en el microscopio compuesto marca Carl Zeiss modelo Primo Star con el objetivo de 40x.

### *Evaluación citotóxica*

La evaluación de la citotoxicidad se realizó determinando el índice mitótico mediante el protocolo descrito por Fiskesjö (FISKESJÖ, 1979, 1985). El índice mitótico se determina contando el número de células en división celular (P=profase + M=metafase + A=anafase + T=telofase) entre el número total de células contadas por 100 (W. F. Grant, 1978).

Para calcular el índice mitótico se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ IM} = \frac{\text{No. células división (P+M+A+T)}}{\text{No. Total células contadas}} \times 100$$

### *Evaluación Genotóxica*

La determinación de la genotoxicidad se midió contando la presencia de micronúcleos en las diferentes fases de la división celular (P=profase + M=metafase + A=anafase + T=telofase) dentro de las 1000 células contadas para el Índice Mitótico (W. F. Grant, 1978).

### *Determinación de la capacidad antioxidante (CA)*

La capacidad antioxidante (CA) se determinó de acuerdo con el método descrito por Huang y colaboradores (Huang, Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan, & Prior, 2002). Una vez transcurrido las 72 horas de exposición a los diferentes tratamientos, se cortan las raíces y se liofilizan, se pesa un gramo de extracto liofilizado de *Allium cepa* y se diluyó en metanol para la cuantificación. Los análisis se realizaron a 37 ° C utilizando un tampón de fosfato de pH 7,4. Los

radicales de peróxido se produjeron mediante el diclorhidrato de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (AAPH), utilizando fluoresceína como sustrato y Trolox como estándar. La fluorescencia se midió cada 2 minutos durante una hora y se usó una curva de calibración de Trolox a diferentes concentraciones (10 a 100  $\mu\text{M}$ ) en cada placa leída. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La capacidad antioxidante fue cuantificada por la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (CA) expresada como equivalentes de Trolox por gramo (TE g-1).

#### *Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO)*

La determinación de las ERO se realizó mediante un ensayo colorimétrico y fluorométrico directo, que mide el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) como un subproducto metabólico reactivo del oxígeno. Se emplea el kit de ensayo de peróxido de hidrógeno ab102500 (Abcam, Reino Unido). La determinación se realizó como sugirió el proveedor, una vez transcurridas las 72 horas de exposición a los diferentes tratamientos, se cortan las raíces y se liofilizan, se homogeneizaron 5 mg de las raíces de *Allium cepa* liofilizada en solución tampón de fosfato fría y se lavaron por centrifugación durante 2-5 minutos a 4 °C y 1000 x g para eliminar cualquier material insoluble. El sobrenadante se recogió, se transfirió a un tubo limpio y se mantuvo en hielo para su desprotección con ácido perclórico (PCA). Se añadió PCA 4 M para obtener una concentración final de 1 M, la mezcla se agitó en vórtex y se incubó en hielo durante 5 minutos. El PCA se precipitó por neutralización con KOH 2M. Luego, la mezcla se centrifugó a 10 000 x g durante 20 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. Las muestras sin proteína son utilizadas para la cuantificación con el kit de ensayo de peróxido de hidrógeno. Para calcular la concentración original, se calculó un factor de dilución de su muestra final, teniendo en cuenta el volumen de la muestra inicial + vol PCA + vol KOH. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Las especies reactivas de oxígeno fueron cuantificadas por el ensayo de peróxido de hidrógeno, expresado como intensidad de fluorescencia media (MFI).

#### *Determinación de la peroxidación lipídica*

Después de 72 horas de exposición a los diferentes tratamientos, se cortan las raíces y se liofilizan, posteriormente se homogeneizaron 200 mg de raíces liofilizadas en 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 0,1%. Luego, el extracto se centrifugó a 10,000 g durante 15 minutos y el sobrenadante (1 ml) se recogió y se mezcló con 2 ml de TCA al 20% y 2 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5%. La mezcla se calentó a 95 ° C durante 30 min en una campana de extracción y luego se enfrió en hielo. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 532 nm y 600 nm (Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, VM). La concentración de malondialdehído (MDA), formada por la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados, se calculó utilizando la ecuación de Beer-Lambert (el coeficiente de extinción de MDA es  $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La peroxidación lipídica se cuantificó por el ensayo de malondialdehído (MDA), expresada en nanomol por gramo ( $\text{nmol g}^{-1}$ ).

#### *Análisis estadístico para ERO, CA y peroxidación lipídica*

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Los datos se analizaron con GraphPad Prism 6.0 y MINITAB 16. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey para identificar diferencias significativas entre los grupos. Las diferencias se consideraron significativas a  $P < 0.05$ .

## **Resultados y Discusión**

Este apartado se abordará en tres segmentos. El primero describe los resultados de la toxicidad de manera macroscópica, es decir, con base en la elongación de las raíces y la cuantificación del número de las raíces de los diferentes escenarios experimentales evaluados en la presente investigación. En el segundo segmento se presentan los resultados de la proliferación celular basado en el conteo de las diferentes fases celulares mostrando resultados de citotoxicidad y la genotoxicidad expresada como el número de micronúcleos encontrados en mil células contadas. Finalmente, el tercer escenario discute la evaluación fisiológico midiendo los efectos producidos por los diferentes agentes en la concentración de ERO, la respuesta antioxidante (CA) y la liperoxidación lipídica. Cada escenario se compara con los hallazgos de otras investigaciones reportados previamente.

### ***Citotoxicidad a nivel macroscópico***

Al comparar el efecto producido por las AgNPs con relación al número y longitud de las raíces de cebolla con el efecto producido por las diferentes concentraciones de PVP y AgNO<sub>3</sub>, encontramos que en todos los casos el efecto era mayor con las AgNPs que con los otros dos compuestos. El mismo comportamiento se observó al comparar los efectos de las diferentes concentraciones de AgNPs con la concentración de nuestro control positivo de genotoxicidad, NaAsO<sub>2</sub>.

Los resultados muestran que con las concentraciones más bajas de AgNPs, 5 y 10 µg/mL, se generan prácticamente el doble de las raíces con prácticamente el doble de longitud (130 y 80%,

respectivamente) que lo observado para las cebollas del grupo con agua destilada (grupo C-) (Figura 3, 4 y Tabla 4). Al incrementarse la concentración de AgNPs se presenta una disminución en el número y longitud de las raíces que lo observado con las concentraciones más bajas, pero siempre presentan valores más grandes que en el grupo C-. Estos resultados son de suma importancia ya que se ha encontrado plata residual presente en el suelo que es captado y almacenada por especies vegetales comunes como *Brassica juncea* y *Medicago sativa* (Harris & Bali, 2008), sin embargo las nanopartículas evaluadas no mostraron efectos citotóxico con *Allumn cepa* por lo cual no se tiene porque temer en la utilización de estas concentraciones de AgNPs Argovit.

**Tabla 4.** Se muestra los diferentes tratamientos con su número de raíces y longitud de raíces en 24, 48 y 72 horas.

Tratamientos	Número de raíces			Longitud raíces (mm)		
	24 hrs	48 hrs	72 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
H <sub>2</sub> O (C-)	3	7	16	26	49	217
<b>AgNPs (concentraciones de plata metálica)</b>						
5 µg/mL	12	18	21	87	191	410
10 µg/mL	7	11	18	47	142	332
15 µg/mL	6	10	15	26	96	253
25 µg/mL	8	14	17	52	149	253
50 µg/mL	11	16	20	62	135	260
75 µg/mL	7	11	18	34	75	148
100 µg/mL	7	12	17	36	69	115
<b>AgNO<sub>3</sub> (concentraciones de plata metálica)</b>						
5 µg/mL	1	5	10	6	26	136
10 µg/mL	4	10	15	27	91	282
15 µg/mL	4	10	23	28	84	318
25 µg/mL	2	6	17	17	40	219
50 µg/mL	3	5	13	12	35	121
75 µg/mL	3	6	20	26	49	192
100 µg/mL	5	12	17	46	96	251
<b>PVP</b>						
78 µg/mL	1	3	4	3	18	70

156 µg/mL	6	8	9	74	135	248
235 µg/mL	2	5	8	24	58	156
391 µg/mL	4	9	12	24	67	161
783 µg/mL	2	7	16	14	47	244
1175 µg/mL	0	4	8		19	109
1566 µg/mL	6	12	15	28	85	224
<hr/>						
NaAsO <sub>2</sub>	<hr/>					
NaAsO <sub>2</sub>	2	10	16	9	84	261
<hr/>						

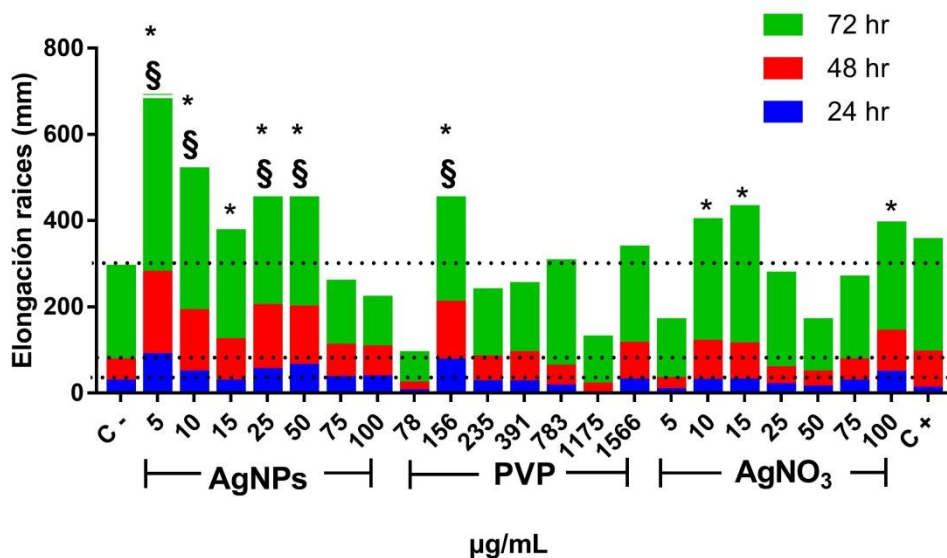
Investigaciones previas han demostrado que las nanopartículas de Ag tienen un efecto positivo sobre la elongación y número de raíces, dependiendo de la concentración y el tamaño de las nanopartículas, esto debido por el bloqueo de la señalización de etileno (Rezvani, Sorooshzadeh, & Farhadi, 2012; J. Wang et al., 2013). Syu, Hung, Chen, & Chuang en 2014, realizaron un estudio sobre la respuesta fisiológica y la respuesta genética de *Arabidopsis* después de la exposición a diferentes concentraciones de AgNPs, encontrando que las de  $45 \pm 5$  nm inducen la promoción del crecimiento de la raíz en la planta, activando el gen que involucra la proliferación celular, el metabolismo y las vías de señalización hormonal.

Por otro lado, los iones de Ag tienen un efecto inhibitorio en la elongación y la división celular (Vannini et al., 2013; Yasur & Rani, 2013). Cvjetko et al. en 2017 realizó un estudio donde compara la toxicidad de AgNO<sub>3</sub> y tres diferentes AgNPs sintetizados en el laboratorio con diferente recubrimientos superficiales, citrato, polivinilpirrolidona y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). Estos investigadores confirmaron que los iones de Ag son más tóxicos que cualquiera de las nanopartículas evaluadas.

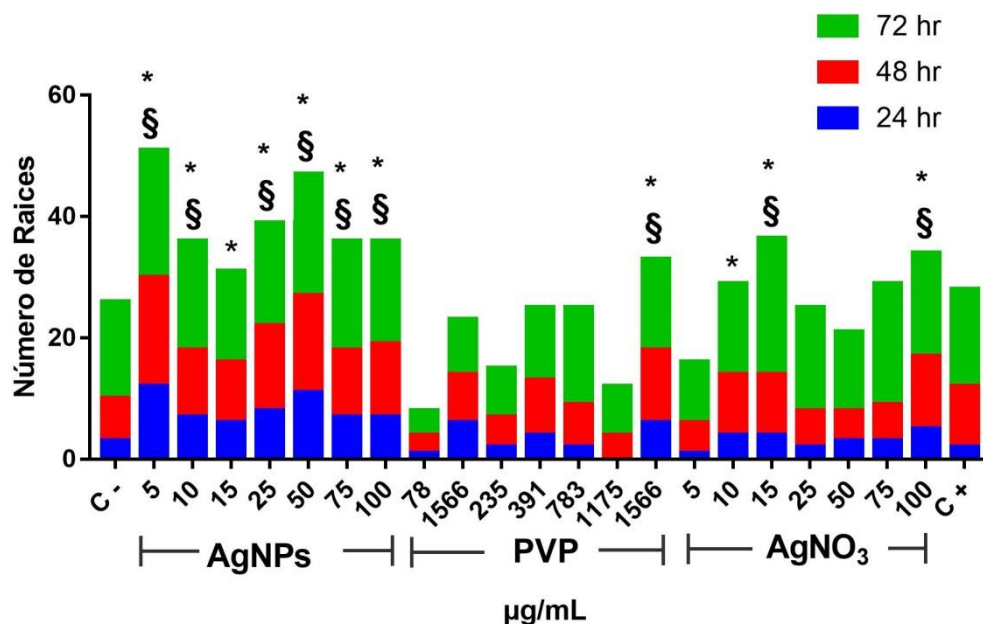
Los resultados obtenidos con PVP demuestran que este compuesto no tiene efectos importantes sobre la elongación o en la generación de raíces, con excepción de la concentración de 78 µg/mL

en la que se observa una disminución importante del número y longitud de las raíces respecto al C- (**Figuras 3 y 4**).

Es interesante observar que el agente genotóxico parece tener un efecto mínimo respecto a la producción de nuevas raíces y la longitud de las mismas, presentándose el mayor efecto después de 24 h de exposición al compuesto, con el paso del tiempo el número y la elongación de las raíces de las cebollas expuestas a arsenito presentan un comportamiento similar al control negativo (**Figuras 3 y 4**).



**Figura 3.** Comparación de la longitud de las raíces de *Allium cepa* expuestas a diferentes tratamientos de AgNPs, PVP y AgNO<sub>3</sub>, con diferentes concentraciones después de 24 (azul), 48 (rojo) y 72 horas (verde). El control negativo (C-) fue agua destilada, y se usó 0,37 µg / ml de arsenito de sodio como control positivo (C +). Se incluyeron líneas punteadas con fines comparativos que muestran el alargamiento observado para el control negativo en cada tiempo evaluado. \* indica diferencias significativas con el control negativo (p <0.05); § indica diferencias significativas con el control positivo (p <0.05) después de 72 h de exposición.



**Figura 4.** Comparación del número de raíces de *Allium cepa* expuestas a diferentes tratamientos de AgNPs, PVP y AgNO<sub>3</sub>, con diferentes concentraciones después de 24 (azul), 48 (rojo) y 72 horas (verde). El control negativo (C-) fue agua destilada, y se usó 0,37 µg / ml de arsenito de sodio como control positivo (C +). Se incluyeron líneas punteadas con fines comparativos que muestran el alargamiento observado para el control negativo en cada tiempo evaluado. \* indica diferencias significativas con el control negativo (p <0.05); § indica diferencias significativas con el control positivo (p <0.05) después de 72 h de exposición.

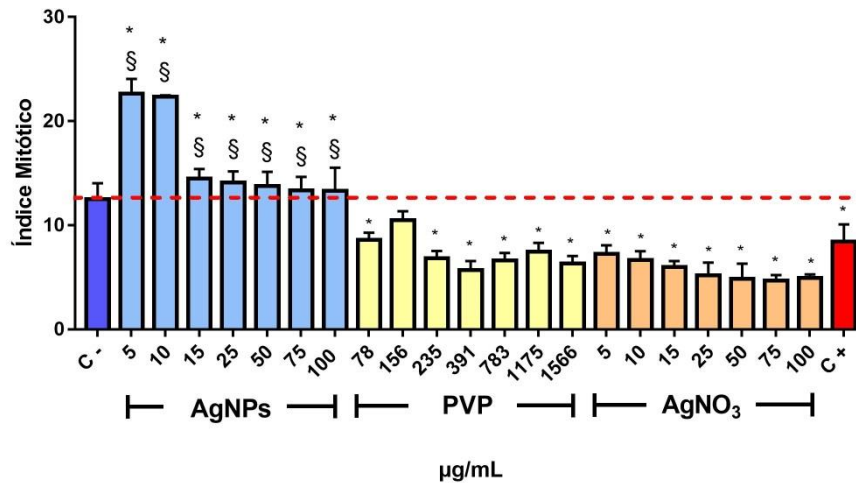
Por otro lado, el comportamiento observado al exponer a las cebollas a las diferentes concentraciones de AgNO<sub>3</sub> presentó un comportamiento completamente inverso al que presentan las cebollas expuestas a AgNPs. Para las cebollas expuestas a las concentraciones de 5 a 15 µg/mL de AgNPs, se observa una disminución en el número de raíces y de su longitud dependiente de la concentración, mientras que para las cebollas expuestas a AgNO<sub>3</sub> se observa un aumento de ambos parámetros. Con 25 y 50 µg/mL se observa un incremento de estos parámetros con AgNPs y una disminución con AgNO<sub>3</sub>. Finalmente, se observa una nueva

disminución (o ausencia del cambio) con 75 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs y un incremento con  $\text{AgNO}_3$ . Un claro comportamiento sinusoidal para ambos casos con distinta fase.

Para tratar de explicar estas diferencias evaluamos los efectos sobre la viabilidad celular, la producción de especies reactivas de oxígeno y sobre la respuesta antioxidante.

## Evaluación Citotóxica

El IM es un biomarcador que se ha utilizado para evaluar la citotoxicidad de sustancias o mezclas complejas a través de su aumento o disminución con respecto a los valores encontrados en el control negativo (agua destilada). Los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos se encuentran registrados en la **Tabla 5** y en la **Figura 5**. El IM de nuestro control negativo fue de  $12.5 \pm 1.5$  que presenta un valor muy similar a los encontrados en otros trabajos  $15 \pm 0.32$  (Dizdari & Koplaku, 2013),  $9 \pm 0.5$  (Cvjetko et al., 2017a) y  $4.1 \pm 0.56$  (Nunes et al., 2011).



**Figura 5.** Índice mitótico cuantificado en raíces de *A. cepa* después de 72 h de exposición a diferentes concentraciones de AgNPs (azul claro), PVP (amarillo) y AgNO<sub>3</sub> (color carne). Para el control negativo correspondiente a plantas no tratadas (azul fuerte) y control positivo a las plantas expuestas a 0,37 µg / ml de arsenito de sodio (rojo). \* indica diferencias significativas con el control negativo ( $p < 0.05$ ); § indica diferencias significativas con el control positivo ( $p < 0.05$ ).

Tabla 5. Frecuencia de células en división, índice mitótico y micronúcleos encontrados en los diferentes tratamientos evaluados.

		Población celular en división en las diferentes etapas del ciclo celular					Índice Mitótico	Frecuencia de micronúcleos
Tratamientos	Total células	Profase	Metafase	Anafase	Telofase			
<b>H<sub>2</sub>O</b>	(C -)	3000	163	88	49	75	12.5 ± 1.5	1.3 ± 0.5
<b>AgNPs</b>	5 µg/mL	3000	459	67	47	107	22.6 ± 1.4	0.3 ± 0.6
	10 µg/mL	3000	450	73	53	94	22.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0
	15 µg/mL	3000	320	37	32	46	14.5 ± 0.9	0.0 ± 0.0
	25 µg/mL	3000	211	86	35	92	14.1 ± 1	0.0 ± 0.0
	50 µg/mL	3000	220	69	53	71	13.7 ± 1.3	1.0 ± 0.0
	75 µg/mL	3000	240	75	47	39	13.3 ± 1.2	1.0 ± 1.0
	100 µg/mL	3000	234	56	68	41	13.3 ± 2.2	1.0 ± 1.7
<b>PVP</b>	78 µg/mL	3000	135	48	42	33	8.6±0.7	1±0.3
	156 µg/mL	3000	107	55	28	20	10.5±0.9	1.5±0.4
	235 µg/mL	3000	98	47	31	29	6.8±0.7	1.6±0.3
	391 µg/mL	3000	87	23	12	22	5.7±0.9	1±0.4
	783 µg/mL	3000	97	56	18	28	6.6±0.7	1.3±0.3
	1175 µg/mL	3000	63	45	19	22	7.5±0.9	1.5±0.4
	1566 µg/mL	3000	99	40	25	26	6.3±0.7	1±0.3
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	5 µg/mL	3000	96	52	30	39	7.2 ± 0.8	2.6 ± 1.1
	10 µg/mL	3000	77	55	32	36	6.6 ± 0.8	4.3 ± 0.5
	15 µg/mL	3000	85	35	21	39	6 ± 0.5	3.3 ± 0.5
	25 µg/mL	3000	61	46	24	25	5.2 ± 1.2	5.0 ± 1.0
	50 µg/mL	3000	66	21	25	34	4.8 ± 1.4	6.3 ± 0.5

<b>NaAsO<sub>2</sub></b>	75 µg/mL	3000	50	41	20	30	4.7 ± 0.5	8.3 ± 0.5
	100 µg/mL	3000	57	38	24	29	4.9 ± 0.3	11.6 ± 1.5
	0.037 (C+)	3000	77	79	55	42	8.4 ± 1.6	13 ± 3.6

---

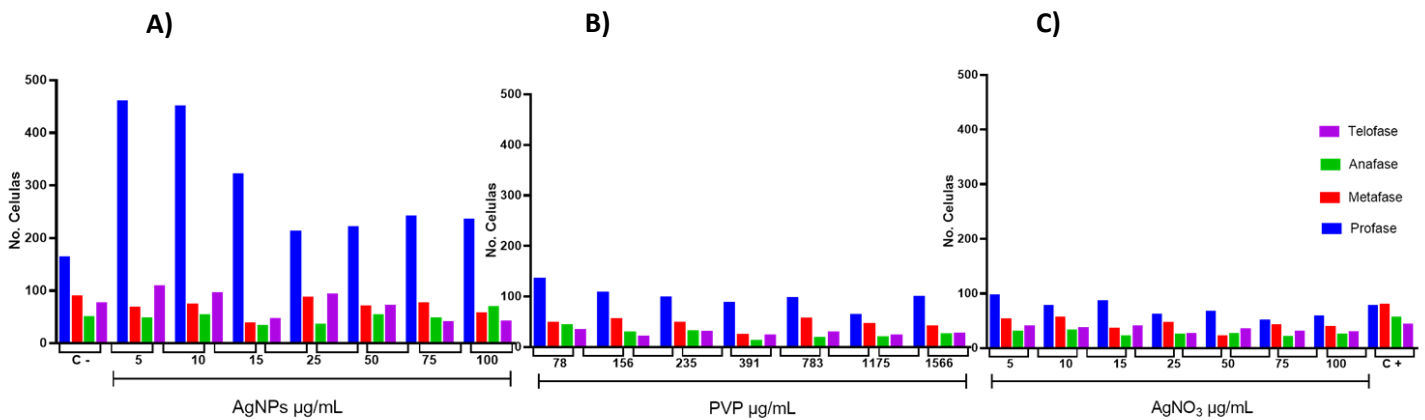
Las AgNPs estudiadas en este trabajo no mostraron efectos citotóxicos en ninguna de las siete concentraciones probadas (5 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Los índices de proliferación de nuestros experimentos fueron similares al grupo C-, con excepción de las concentraciones 5  $\mu\text{g/mL}$  y 10  $\mu\text{g/mL}$  con IM de  $22.6 \pm 1.4$  y  $22.3 \pm 0.1$ , respectivamente, valores de prácticamente el doble que los encontrados en C- con IM de  $12.5 \pm 1.5$ .

Por otro lado, todas las condiciones en donde se utiliza PVP o  $\text{AgNO}_3$  muestran una disminución sustancial de IM. Los valores de IM para las cebollas expuestas a PVP se encuentran en el intervalo de  $10.5 \pm 0.9$  a  $6.3 \pm 0.7$ , mientras que los valores para los sistemas expuestos a  $\text{AgNO}_3$  son  $7.2 \pm 0.8$  a  $4.7 \pm 0.5$ , que implica una disminución del 25 al 50% del IM con respecto al valor encontrado para C-.

Respecto al C+, es necesario encontrar un balance entre la citotoxicidad y la genotoxicidad que genera el arsenito de sodio. Para nuestras condiciones de estudio se determinó la concentración óptima en 0.37  $\mu\text{g/mL}$  (2.84 nM) y el tiempo de exposición de una hora. En estas condiciones se presenta una disminución en la viabilidad celular (**Figura 5**), y todavía se permite cuantificar el número de micronúcleos (MN) formados.

Analizando las células que se encuentran en división, encontramos que todas las concentraciones de AgNPs evaluadas incrementan el número de células en profase respecto a las contabilizadas en el grupo C-, siendo los cambios más importantes los encontrados con las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ . En las otras fases de la mitosis -metafase, anafase y telofase- también se observa un incremento en el número de células respecto al control, pero es un cambio más pequeño que el observado para la profase (**Figure 6 y Tabla 5**).

Para los tratamientos con PVP y AgNO<sub>3</sub> encontramos que en ambos casos hay una disminución muy importante de número de células en profase, presentándose la mayor disminución en los tratamientos con AgNO<sub>3</sub>. De manera general se conserva la proporción de células en las diferentes etapas de la mitosis **Figura 6**. Estos resultados son consistentes con los encontrados para el IM y confirman el efecto de promoción de proliferación celular obtenido con dosis bajas de AgNPs (5 y 10 µg/mL) y el efecto citostático producido por PVP y AgNO<sub>3</sub>.



**Figura 6.** Relación de la distribución celular en las diferentes fases de la mitosis para cada uno de los tratamientos utilizados A) AgNPs, B) PVP, C) AgNO<sub>3</sub>. Las concentraciones de AgNPs y AgNO<sub>3</sub> son 5, 10, 15, 25, 50, 75 y 100 µg/mL, y para PVP 78, 156, 235, 391, 783, 1175 y 1566 µg/mL. C- Agua destilada y C+ Arsenito de sodio 0.37 µg/mL.

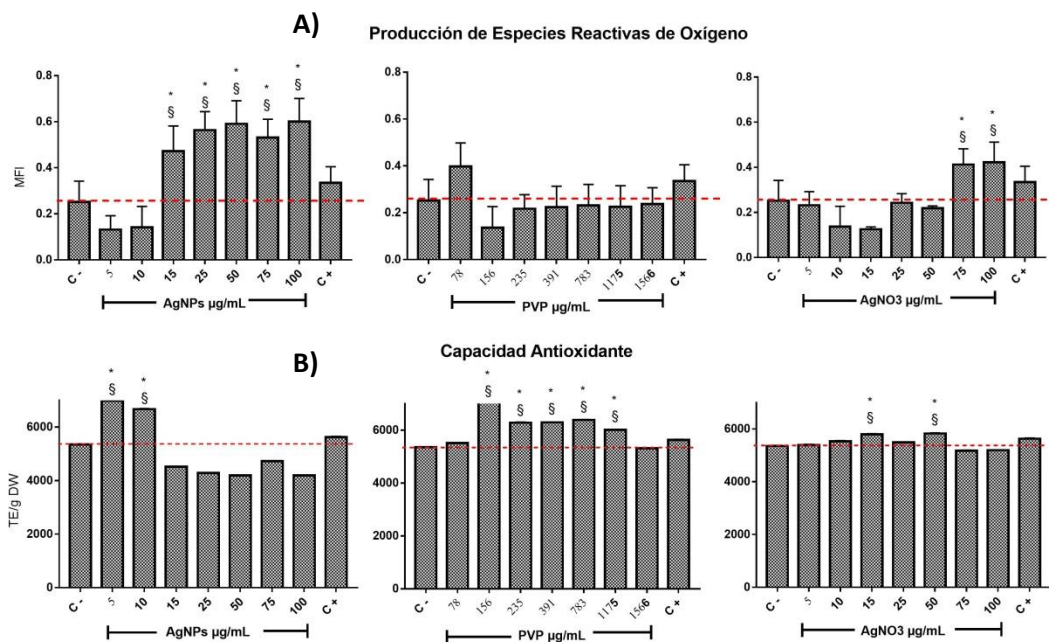
El efecto de promoción de la proliferación inducido por bajas concentraciones de las nanopartículas Argovit<sup>®</sup> también ha sido observado en caña de azúcar (Bello-Bello et al., 2017), vainilla (Spinoso-Castillo et al., 2017b) y stevia (Castro-González, Sánchez-Segura, Gómez-Merino, & Bello-Bello, 2019). Para estos casos el efecto hormético fue asociado a la inducción de estrés oxidante a niveles aún controlables por la planta. Cuando la producción de especies

reactivas de oxígeno fue superior a la respuesta antioxidante del sistema, se observó un efecto adverso en las plántulas (Bello-Bello et al., 2017; Spinoso-Castillo et al., 2017b).

Para identificar si la inducción de estrés oxidante es la causante de la promoción de la proliferación, se cuantificó la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad antioxidante de las células de las raíces de cebolla expuestas a los diferentes tratamientos.

### ***Producción de especies reactivas de oxígeno y respuesta antioxidante***

La producción de ERO en cada uno de los tratamientos es diferente y en el caso de AgNPs y AgNO<sub>3</sub> presenta una dependencia con la concentración (**Figura 7A**). Al exponer a las cebollas a concentraciones bajas de AgNPs, 5 y 10 µg/mL, se registran concentraciones de ERO inferiores a las encontradas en C-. Esto puede deberse a la mayor respuesta antioxidante registrada en estas células (**Figura 7B**). A concentraciones mayores de AgNPs, desde 15 hasta 100 µg/mL, la producción de ERO es prácticamente la misma, presentando cerca del doble respecto a C-. Para todas estas concentraciones se registra una disminución de la capacidad antioxidante.



**Figura 7.** Comparación del contenido de especies reactivas de oxígeno (A) y respuesta antioxidante (B) de raíces de *Allium cepa* después de 72 horas de tratamiento con AgNPs, AgNO<sub>3</sub> y PVP. C- corresponde a plantas no tratadas (gris claro) y C + a las expuestas a 0,37 µg / mL de arsenito de sodio (negro). \* indica diferencias significativas con el control negativo (p <0.05); § indica diferencias significativas con el control positivo (p <0.05).

Para los tratamientos con PVP se observa un incremento en la producción de ERO a la concentración de 78 µg/mL, misma condición en donde la respuesta antioxidante es similar a la encontrada para C-. En el resto de las concentraciones evaluadas se presenta un incremento en la respuesta antioxidante y una concentración de ERO menor a la encontrada para C-.

Por otro lado, en los tratamientos con AgNO<sub>3</sub> la respuesta fue muy diferente. Solo se presentó un incremento en la concentración de ERO con las concentraciones más altas evaluadas, 75 y 100 µg/mL. Con todas las demás concentraciones de AgNO<sub>3</sub> las concentraciones de ERO fueron similares a las de C-. Respecto a la respuesta antioxidante, en ninguna de las concentraciones de AgNO<sub>3</sub> evaluadas se presentó una respuesta antioxidante diferente a la encontrada en C-.

El control positivo de genotoxicidad (C+), produce un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno, pero no afecta la respuesta antioxidante de las células de las raíces de cebollas expuestas al arsenito de sodio.

Estos resultados sugieren que las modificaciones en la viabilidad celular debido a la exposición a los agentes AgNPs, PVP y AgNO<sub>3</sub> presentan factores desencadenantes diferentes. Mientras que los cambios observados en el IM de las células tratadas con AgNPs respecto a las células control está fuertemente asociado a la concentración de ERO, este factor no parece ser el responsable en la disminución del número de células en división expuestas a PVP y AgNO<sub>3</sub>.

Es importante hacer notar que los constituyentes de las AgNPs de manera individual, PVP y AgNO<sub>3</sub>, producen una disminución en el número de células en división y aunque ninguno de ellos incrementa la concentración de ERO, ambos disminuyen el número de células en la profase con respecto a C-. Esto indica que el efecto de las AgNPs no es un efecto concomitante o secuencial de los componentes individuales, sino un efecto producido por la partícula completa.

Cvjetko y colaboradores observaron que las concentraciones de ERO se ven afectadas por la concentración de los tratamientos y el tipo de recubrimiento o una interacción de ambos (Cvjetko et al., 2017a). Si bien los recubrimientos de las NP es importante para su estabilidad y su toxicidad (Barrena et al., 2009), otro factor importante a considerar es el tamaño de las NPs, que juega un papel importante para la toxicidad y penetración celular en los modelos utilizados para medir daño toxico (Cvjetko et al., 2017a; Foldbjerg et al., 2009).

El efecto del tamaño, recubrimiento y concentración de AgNPs utilizadas en los diferentes trabajos donde se utiliza *Allium cepa* como sistema de evaluación puede consultarse en la **Tabla 1** o con otros modelos vegetales **Tabla 2**.

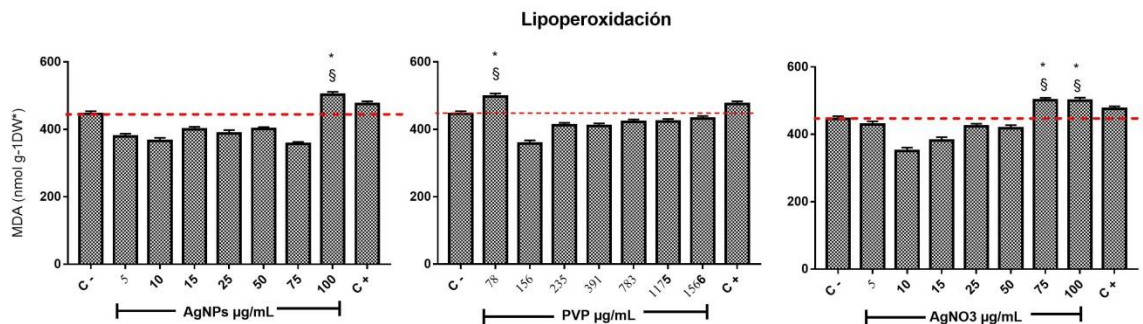
### ***Determinación de la peroxidación lipídica***

En el experimento de la peroxidación lipídica la determinación del control negativo se obtuvo una producción de  $446.02 \pm 7.91$  nmol/g **Figura 8**, mientras que los tratamientos evaluados de AgNPs, PVP y AgNO<sub>3</sub> no presento aumento significativo con respecto al C-. Como podemos observar aunque en concentraciones de 15 hasta 100 µg/ml de AgNPs existió la producción de ERO no se produjo daño en membrana. Un estudio previo de Hatami & Ghorbanpour, 2013

demonstró que las AgNPs tienen un efecto en la reducción de la peroxidación lipídica en *Pelargonium zonale* con 5 días de exposición, además de retención de enzimas de antioxidante.

La producción de peroxidación lipídica en AgNO<sub>3</sub> tiene un comportamiento dosis dependiente las concentraciones de 5 y 10 µg/mL se encuentran levemente por encima del C-, por otro lado las concentraciones 15, 25, 50, 75 y 100 µg/mL se encuentran muy poco por debajo del C-. Panda et al., 2011 reporto Ag + ion con comportamiento similar al del control negativo similar a nuestro experimento.

Para el PVP las concentraciones de 78, 256, 235, 391, 783 y 1175 µg/mL mostraron un comportamiento de dosis dependiente de producción de lipoperoxidación lipídica por debajo del C-, solo la concentración más alta evaluada de 1566 µg/mL se encuentra por arriba del C- pero es muy despreciable el incremento.



**Figura 8.** Comparación del contenido de lipoperoxidación lipídica registrada en las raíces de la cebolla después de 72 h para diferentes concentraciones de AgNPs, AgNO<sub>3</sub> y PVP. C- corresponde a plantas no tratadas (gris claro) y C + a las expuestas a 0,37 µg / ml de arsenito de sodio (negro). \* indica diferencias significativas con el control negativo (p <0.05); § indica diferencias significativas con el control positivo (p <0.05).

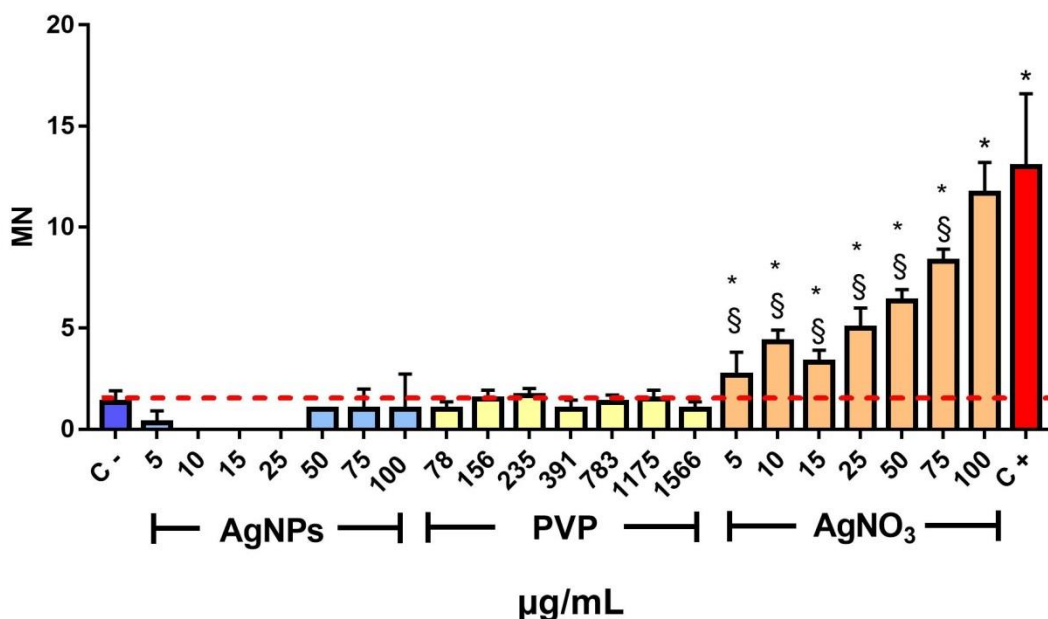
## *Evaluación Genotóxica*

Finalmente, es conocido que uno de los efectos de la sobreproducción de radicales libres puede ser un daño sobre el material genético, reversible o irreversible. Debido a la gran producción de radicales encontrada con las diferentes concentraciones de AgNPs, evaluamos la posible genotoxicidad cuantificando la presencia de micronúcleos (MN).

El ensayo MN permite detectar de forma rápida y confiable alteraciones no reversibles en el material genético en los modelos utilizados expuestos a mezclas complejas o sustancias específicas que se desean evaluar. El modelo es uno de los más sensibles, el número basal de MN en el modelo de *Allium test* se ha reportado como  $0.125 \pm 0.87$ ,  $0.3 \pm 0.5$  y  $0.9 \pm 1.25$  (Bianchi, Mantovani, & Marin-Morales, 2015; Dias et al., 2016; Leme & Marin-Morales, 2008).

Al comparar los efectos de los tratamientos de AgNPs con el control positivo, se pone de manifiesto otro factor importante para el daño genotóxico, el tiempo de exposición. Mientras que las cebollas se expusieron al arsenito de sodio durante una hora, el resto de los grupos de tratamiento con las diferentes concentraciones de AgNPs, PVP y  $\text{AgNO}_3$  estuvieron expuestas durante 72 horas al agente a evaluar.

Para nuestro control negativo el valor de MN fue de  $1.3 \pm 0.5$  que es similar a uno de los valores reportados por otro grupo. Por otro lado, el valor de MN encontrado para el control positivo es de  $13 \pm 3.6$ . El intervalo encontrado para el número de MN con los diferentes tratamientos con AgNPs es de  $0 \pm 0.0$  a  $1 \pm 1.7$ , **Figura 9**. El intervalo no muestra una diferencia significativa con nuestro control negativo, por lo que puede concluirse que ninguna de las concentraciones de AgNPs evaluadas presenta un efecto sobre el material genético de manera permanente, esto es, no son genotóxicos para el modelo *Allium cepa*.



**Figura 9.** Frecuencia de micronúcleos (MN) en la raíz de *Allium cepa* expuesta a diferentes estímulos. La frecuencia de MN se registró después de 72 horas de exposición a diferentes concentraciones de AgNPs, PVP y AgNO<sub>3</sub>. C- corresponde a plantas no tratadas y C + a las expuestas a 0,37 µg / ml de arsenito de sodio. \* indica diferencias significativas con el control negativo (p <0.05); § indica diferencias significativas con el control positivo (p <0.05).

De manera individual, el PVP que es usado como recubrimiento no presenta efectos sobre el material genético de manera permanente. En ninguna de las concentraciones evaluadas se encontraron más MN que los contabilizados en C-.

Todo lo contrario sucede con las evaluaciones donde se utilizó AgNO<sub>3</sub>. En este caso la aparición de MN presenta una dependencia con la concentración de AgNO<sub>3</sub>. Con la concentración más alta de este compuesto (100 µg/mL) se alcanzaron conteos de MN similares (11.6 ± 1.5) a nuestro control positivo de genotoxicidad, el arsenito de sodio (13 ± 3.6).

La diferencia en el daño del material genético puede deberse a los diferentes mecanismos por los que los agentes generan el daño. Se ha reportado que los iones plata a bajas concentraciones son capaces de afectar el flujo de iones  $K^+$  de manera unidireccional disminuyendo su concentración intracelular, mientras que a altas concentraciones son capaces de generar el mismo proceso, pero rompiendo la membrana celular (Coskun et al., 2012). Además, son capaces de bloquear los sitios de reconocimiento del etileno evitando que la ruta de señalización se complete (Binder & Schaller, 2017). Por otro lado, parece que el efecto producido por las AgNPs depende del estrés oxidante que induzcan a través de la generación de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, parece que el daño provocado por los ROS presenta consecuencias menos graves que el daño provocado por los iones plata.

En el presente trabajo, todas las formulaciones de AgNP encontradas en la literatura evaluadas habían mostrado fitotoxicidad sobre *Allium cepa*. Nuestros resultados muestran que las respuestas citotóxicas y genotóxicas de Argovit® PVP-AgNPs son menores que el efecto producido por otras formulaciones de AgNP. Aunque pudieran presentar el mismo recubrimiento, pero no la relación Ag/PVP, aspecto que puede explicar en parte el por qué Argovit® PVP-AgNPs no generó daño fitotóxico.

La relación [Ag/agente de recubrimiento] es el factor más evidente que podría explicar las principales diferencias en la respuesta toxicológica observadas en este trabajo con las reportadas previamente, ya que no existen diferencias toxicológicas tan asimétricas asociadas con la diferencia de tamaño, forma o contenido de plata (Ghosh, Ghosh, Godderis, Hoet, & Mukherjee, 2019; Jurašin et al., 2016; Nymark et al., 2013).

Considerando las nanopartículas secas, la relación [Ag]/[PVP] expresada en % de peso en la formulación Argovit® estudiada es 6:94. Mientras tanto, NanoComposix es 34:66, y el sintetizado por Cvjetko es 40:60. Desafortunadamente, no se cuenta con información sobre la formulación de Nanotech Ltd.'s. Por lo tanto, aunque la concentración de AgNP estudiada en este trabajo fue al menos de 10 a 17 veces más altos que los de las formulaciones de PVP-AgNPs reportadas anteriormente, sin daño citotóxico ni genotóxico para *Allium cepa*.

Si comparáramos las formulaciones con recubrimiento similar PVP-AgNPs que se encuentran en la **Tabla 6**, todas las formulaciones en la tabla producen aberraciones cromosómicas a diferencia de nuestras nanopartículas Argovit®. Aunque tengan el mismo recubrimiento (PVP) no comparten el mismo diámetro que nuestras AgNPs, por lo que este sería una de las principales causas de que presentes todas estas aberraciones cromosómicas. Por otro lado, las características como la forma, el tamaño y el recubrimiento de las nanopartículas juegan un papel importante para la toxicidad de éstas (Yan & Chen, 2019).

**Tabla 6.** Comparación de concentraciones para AgNPs-PVP de artículos publicados anteriormente con nuestro trabajo actual.

AgNPs-PVP	D <sub>Ag</sub> , nm	Min concentración de AgNPs con toxicidad, µg/mL	Duración de experimento, en horas	(Max concentración no tóxica de Argovit)/(Min concentración de con toxicidad AgNPs)	(Duración del estudio con Argovit)/ (Duración del estudio con otras PVP-AgNPs)
(Scherer et al., 2019)	75	5	48	333.3	1.5
(Fouad & Hafez, 2018)	20-30	5	3	333.3	24
(Cvjetko et al., 2017)	9.4	10	72	166.6	1
Trabajo actual	35	1,666.67	72	1	1

Scherer et al., 2019 la concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ya tenían efectos tóxicos, mientras para la concentración de Argovit 1,667  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no muestra efectos tóxicos. Es difícil hacer la comparación con resultados de Cvjetko et al., 2017, porque ellos trabajaron con AgNPs de tamaño de 9.4 nm, que es mucho menos que tamaño de AgNPs Argovit (35 nm). Pero Fouad & Hafez, 2018 y Scherer et al., 2019 trabajaron con PVP-gNPs 20-30 y 25, 50 nm, respectivamente que son muy cercanos con tamaño de AgNPs Argovit (35 nm), y para ambas formulaciones de estos dos trabajos publicados anteriormente, se observa toxicidad a concentraciones 333 veces menores, que la concentración de Argovit para la cual no se observa toxicidad.

La falta de daño en las condiciones experimentales evaluadas en nuestro trabajo podría ser una buena señal con respecto a su impacto ambiental, pero se deben realizar más experimentos donde se incluyan períodos de exposición más largos en para determinar los efectos de toxicidad crónica en *Allium cepa*, además de incluir otras especies referencia para medir la toxicidad ambiental y de esta manera tener un panorama más claro con respecto a los efectos al medio ambiente.

Dentro de nuestro grupo de trabajo se ha utilizado la misma formulación en periodos largos de exposición (30 días) en tres diferentes especies de plantas como caña de azúcar (Jericó J. Bello-Bello et al., 2017), vainilla (Spinoso-Castillo et al., 2017a) y stevia (Castro-González et al., 2019), y aun contando con 27 días más de exposición, en estas especies los resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo sobre efecto hormonal producido por estas AgNPs a través de la sobreproducción de ROS, pero sin daño en membrana lipídica o en ADN traducido en MN.

En lo concerniente a los problemas ambientales que pudieran traer la utilización de la formulación PVP-AgNPs Argovit® serían mínimas o nulas, ya el intervalo evaluado no produjo daños en índice mitótico, o daños al ADN expresado en micronúcleos, sin embargo se tiene que tomar en cuenta este intervalo para futuras aplicaciones dentro de nuestro grupos de trabajo, ya que Liu & Jiang, 2015 manifiesto durante la producción, transporte, erosión, lavado o eliminación de productos que contienen AgNPs, las AgNPs pueden liberarse al medio ambiente.

Si utilizamos en alguna de las aplicaciones la concentración más alta estudiada en este trabajo y el uso de esta aplicación tuviera residuos al medio ambiente, se estaría hablando de una dilución de la concentración inicial y como pudimos demostrar en nuestro trabajo en las concentraciones bajas de 5 y 10 µg / mL se puede observar un efecto de promotor de crecimiento de número de raíces y longitud. Si esto sucediera pudiéramos inferir que las diferentes especies de plantas que se encuentran en la zona de derrame tendrán promoción de crecimiento en la raíz y longitud. Esto se observó no solo con *Allim cepa* si no con otras investigaciones en caña de azúcar (Jericó J. Bello-Bello et al., 2017), vainilla (Spinoso-Castillo et al., 2017a) y stevia (Castro-González et al., 2019). Sin embargo se tendría que seguir trabajando para poder decir a ciencia cierta que esto pasaría.

## Conclusión

Los resultados demostraron que la formulación PVP-AgNPs (Argovit®) en las concentraciones de evaluadas de 5, 10, 15, 25, 50, 75 y 100 µg/mL calculados para Ag metálica (que corresponde a 83, 166.6, 249.9, 416.5, 833, 1249.5 y 1666.6 µg/mL de AgNPs) no presentan efecto citotóxico y ni genotóxico, y éstas se encuentran entre 167 a 333 veces más altas que otras formulaciones de PVP-AgNPs reportadas anteriormente que si presentan efectos tóxicos.

La consideración de cinco parámetros: índice de división celular, Especies Reactivas de Oxígeno, Actividad Antioxidante, Lipoperoxidación y frecuencia de micronucleos, nos permiten confirmar positivamente que Argovit® en las concentraciones evaluadas son nanoparticulas bioseguras y biocompatibles con el ambiente.

Se demostró la importancia de usar varios biomarcadores de daño, aunque existe una producción de Especies Reactivas de Oxígeno en las concentraciones de 15 a 100 µg/mL en las AgNPs evaluadas, no existe daño en membrana (lipoperoxidación lipídica) o en ADN (expresado en MN).

Los resultado obtenidos también revelaron que las concentraciones de 5 y 10 µg/mL de AgNPs Argovit® presentaron un incremento en la producción de raíces de *Allium cepa*, un mayor crecimiento radicular, un mayor IM y menor ERO, estos resultados son de gran importancia porque nos permite utilizar estas concentraciones como promotores de crecimiento celular o de raíces, para la producción de especies de plantas en peligro o nativas con fines de manejo.

Los resultados obtenidos revelaron que la formulación de PVP-AgNPs Argovit® y recubrimiento solo de PVP no mostraron daños, podemos inferir que esta ausencia de daño

es debido a las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs que evaluamos, a diferencia de  $\text{AgNO}_3$  como fuente de iones que mostro daño en Índice mitótico y la frecuencia de MN.

El uso por primera vez del colorante Verde Rapado como pigmento de contraste en la técnica de *Allium* test, facilito en gran medida el análisis y conteo de las células en división de los diferentes tratamientos evitando falsos positivos.

Estos resultados nos permiten concluir que las AgNPs producidas por nuestro grupo son biocompatibles con el ambiente, a diferencia de otras AgNPs reportadas en la literatura y mucho más seguras que los iones plata, pues bajo ninguno de los esquemas estudiados se presentó un daño irreversible en el material genético que se manifestara como MN.

## Recomendaciones

- Trabajar con concentraciones de 110, 120, 130, 140, 150 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para encontrar en que punto empieza el daño cito y genotoxico para la formulación PVP-AgNPs Argovit <sup>®</sup> y obtener un intervalo seguro de trabajo con estas AgNPs.
- Trabajar con la Bioacumulación en las concentraciones evaluadas.
- Trabajar con especies de importancia comercial utilizando las concentraciones bajas de 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para determinar si existe estimulación de crecimiento.

## Referencias

- (Dizdari), A. M., & Kopliku, D. (2013). Cytotoxic and Genotoxic Potency Screening of Two Pesticides on *Allium cepa* L. *Procedia Technology*, 8(Haicta), 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2013.11.005>
- Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. W. (2012). The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14(1), 1–16. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>
- Álvarez-Suárez, A. S., Dastager, S. G., Bogdanchikova, N., Grande, D., Pestryakov, A., García-Ramos, J. C., ... Villarreal-Gómez, L. J. (2020). Electrospun fibers and sorbents as a possible basis for effective composite wound dressings. *Micromachines*, 11(4), 1–24. <https://doi.org/10.3390/M111040441>
- Asita, a O., & Matobole, R. M. (2010). Comparative study of the sensitivities of onion and broad bean root tip meristematic cells to genotoxins. *African Journal of Biotechnology*, 9(27), 4165–4170. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1362>
- Barrena, R., Casals, E., Colón, J., Font, X., Sánchez, A., & Puntès, V. (2009). Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, 75(7), 850–857. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.078>
- Bartłomiejczyk, T., Lankoff, A., Kruszewski, M., & Szumiel, I. (2013). Silver nanoparticles - Allies or adversaries? *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(1), 48–54.
- Becharo, A. A., Siqueira, M. C., Puti, F. C., de Moura, M. R., Correa, D. S., Marconcini, J. M., ... Ferreira, M. D. (2017). Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticle/carboxymethyl cellulose on *Allium cepa*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(7). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6062-8>
- Bello-Bello, Jericó J., Chavez-Santoscoy, R. A., Lecona-Guzmán, C. A., Bogdanchikova, N., Salinas-Ruíz, J., Gómez-Merino, F. C., & Pestryakov, A. (2017). Hormetic response by silver nanoparticles on in vitro multiplication of sugarcane (*Saccharum* spp. Cv. Mex 69-290) using a temporary immersion system. *Dose-Response*, 15(4), 1–9. <https://doi.org/10.1177/1559325817744945>
- Bello-Bello, Jericó Jabín, Spinoso-Castillo, J. L., Arano-Avalos, S., Martínez-Estrada, E., Arellano-García, M. E., Pestryakov, A., ... Bogdanchikova, N. (2018). Cytotoxic, genotoxic, and polymorphism effects on *Vanilla planifolia* jacks ex andrews after long-term exposure to argovit® silver nanoparticles. *Nanomaterials*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/nano8100754>
- Benn, T. M., & Westerhoff, P. (2008). Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science and Technology*, 42(11), 4133–4139. <https://doi.org/10.1021/es7032718>
- Berrocal, A. M., Blas, R. H., Flores, J., Siles, M. A., Alfredo Miguel Berrocal Huallpa, B., &

- Amézaga, G. (2013). Evaluación del potencial mutagénico de biocidas (vertimec y pentacloro) sobre cebolla Evaluation of the mutagenic potential of biocides (vertimec and pentachloro) on onion. *Rev. Colomb. Biotecnol*, XV(1), 17–27.
- Bianchi, J., Mantovani, M. S., & Marin-Morales, M. A. (2015). Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 36, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.03.034>
- Binder, B. M., & Schaller, G. E. (2017). Ethylene Signaling. *Methods in Molecular Biology*, 1573(March), 75–86. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6854-1>
- Bogdanchikova, N., Vázquez-Muñoz, R., Huerta-Saquero, A., Pena-Jasso, A., Aguilar-Uzcanga, G., Picos-Díaz, P. L., ... Almanza, H. (2016). Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs. *International Journal of Nanotechnology*, 13(1–3), 227–237. <https://doi.org/10.1504/IJNT.2016.074536>
- Borrego, B., Lorenzo, G., Mota-Morales, J. D., Almanza-Reyes, H., Mateos, F., López-Gil, E., ... Bogdanchikova, N. (2016). Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus in vitro and in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(5), 1185–1192. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.01.021>
- Bosio, S., & Laughinghouse IV, H. D. (2012). Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. *Environmental Contamination*. <https://doi.org/10.5772/31371>
- Bravo-Guerra, C., Cáceres-Martínez, J., Vázquez-Yeomans, R., Petryakov, A., & Bogdanchikova, N. (2020). Lethal effects of silver nanoparticles on *Perkinsus marinus*, a protozoan oyster parasite. *Journal of Invertebrate Pathology*, 169(December 2019), 107304. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107304>
- Capaldi Arruda, S. C., Diniz Silva, A. L., Moretto Galazzi, R., Antunes Azevedo, R., & Zezzi Arruda, M. A. (2015). Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta*, 131, 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.050>
- Casillas-figueroa, F., Arellano-garcía, M. E., Leyva-aguilera, C., Ruíz-ruíz, B., Vázquez-gómez, R. L., Radilla-chávez, P., ... Bogdanchikova, N. (2020). Argovit<sup>TM</sup> silver nanoparticles effects on *allium cepa*: Plant growth promotion without cyto genotoxic damage. *Nanomaterials*, 10(7), 1–20. <https://doi.org/10.3390/nano10071386>
- Castañeda-Yslas, I. Y., Ruiz-Ruiz, B., Arellano-García, M. E., Juárez-Moreno, K. O., Torres-Bugarín, O., Bogdanchikova, N., ... Radilla-Chávez, P. (2018). Micronúcleos en Reticulocitos de Ratones Balb/c Tratados de Forma Oral con Nanopartículas de Plata. *Revista de Ciencias Tecnológicas*, 1(2), 65–68.
- Castro-González, C. G., Sánchez-Segura, L., Gómez-Merino, F. C., & Bello-Bello, J. J. (2019). Exposure of stevia (*Stevia rebaudiana* B.) to silver nanoparticles in vitro: transport and accumulation. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46828-y>
- Chichiriccò, G., & Poma, A. (2015). Penetration and Toxicity of Nanomaterials in Higher Plants.

*Nanomaterials*, 5(2), 851–873. <https://doi.org/10.3390/nano5020851>

- Coskun, D., Britto, D. T., Jean, Y. K., Schulze, L. M., Becker, A., & Kronzucker, H. J. (2012). Silver ions disrupt K<sup>+</sup> homeostasis and cellular integrity in intact barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Journal of Experimental Botany*, 63(1), 151–162. <https://doi.org/10.1093/jxb/err267>
- Cvjetko, P., Milošić, A., Domijan, A. M., Vinković Vrček, I., Tolić, S., Peharec Štefanić, P., ... Balen, B. (2017a). Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137(November 2016), 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.009>
- Cvjetko, P., Milošić, A., Domijan, A. M., Vinković Vrček, I., Tolić, S., Peharec Štefanić, P., ... Balen, B. (2017b). Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137(July 2016), 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.009>
- Debnath, P., Mondal, A., Hajra, A., Das, C., & Mondal, N. K. (2018). Cytogenetic effects of silver and gold nanoparticles on *Allium cepa* roots. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.07.007>
- Dias, J. F., da Silva, J., Machado, J. L., Duarte, A., dos Santos, C. E. I., Evangelista, S. R., ... da Silva, F. R. (2016). Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. *Chemosphere*, 164, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.091>
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Martineau, N., Britt, D. W., Haverkamp, R., & Anderson, A. J. (2013). Silver nanoparticles disrupt wheat (*Triticum aestivum* L.) growth in a sand matrix. *Environmental Science and Technology*, 47(2), 1082–1090. <https://doi.org/10.1021/es302973y>
- FISKESJÖ, G. (1979). Mercury and selenium in a modified *Allium* test. *Hereditas*, 91(2), 169–178. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1979.tb01659.x>
- FISKESJÖ, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102(1), 99–112. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>
- Fiskesjo, G. (1985). The *Allium* Test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 12, P. 99-112.
- Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D. A., Hoffmann, H. J., & Autrup, H. (2009). PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology Letters*, 190(2), 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.009>
- Fouad, A. S., & Hafez, R. M. (2018). The effects of silver ions and silver nanoparticles on cell division and expression of *cdc2* gene in *Allium cepa* root tips. *Biologia Plantarum*, 62(1), 166–172. <https://doi.org/10.1007/s10535-017-0751-6>
- Fuentes-Valencia, M. A., Fajer-Ávila, E. J., Chávez-Sánchez, M. C., Martínez-Palacios, C. A.,

- Martínez-Chávez, C. C., Junqueira-Machado, G., ... Bogdanchikova, N. (2020). Silver nanoparticles are lethal to the ciliate model *Tetrahymena* and safe to the pike silverside *Chirostoma estor*. *Experimental Parasitology*, 209(July 2019), 107825. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107825>
- Ghosh, M., Ghosh, I., Godderis, L., Hoet, P., & Mukherjee, A. (2019). Genotoxicity of engineered nanoparticles in higher plants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 132–145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.01.002>
- Ghosh, M., J. M., Sinha, S., Chakraborty, A., Mallick, S. K., Bandyopadhyay, M., & Mukherjee, A. (2012). In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 749(1–2), 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.08.007>
- Glotov, A., Glotova, T., Sergeev, A., Belkina, T., & Sergeev, A. (2004). Antiviral activity of different drugs in vitro against viruses of bovine infectious rhinotracheitis and diarrhea. *Voprosy Virusologii*, 49, 43–46.
- Gmshinski, I. V., Shumakova, A. A., Shipelin, V. A., Maltsev, G. Y., & Khotimchenko, S. A. (2016). Influence of orally introduced silver nanoparticles on content of essential and toxic trace elements in organism. *Nanotechnologies in Russia*, 11(9–10), 646–652. <https://doi.org/10.1134/S1995078016050074>
- Grant, W. F. (1978). Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 27(December), 37–43. <https://doi.org/10.1289/ehp.782737>
- Grant, William F. (1982). Chromosome aberration assays in allium. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 99(3), 273–291. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(82\)90046-X](https://doi.org/10.1016/0165-1110(82)90046-X)
- Gubbins, E. J., Batty, L. C., & Lead, J. R. (2011). Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution*, 159(6), 1551–1559. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.03.002>
- Handy, R. D., Owen, R., & Valsami-Jones, E. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17(5), 315–325. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0206-0>
- Harris, A. T., & Bali, R. (2008). On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(4), 691–695. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9288-5>
- Hatami, M., & Ghorbanpour, M. (2013). Effect of Nanosilver on Physiological Performance of Pelargonium Plants Exposed to Dark Storage. *Journal of Horticultural Research*, 21(1), 15–20. <https://doi.org/10.2478/johr-2013-0003>
- Hossain, Z., Mustafa, G., & Komatsu, S. (2015). Plant responses to nanoparticle stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26644–26653. <https://doi.org/10.3390/ijms161125980>

- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437–4444. <https://doi.org/10.1021/jf0201529>
- Juarez-Moreno, K., Mejía-Ruiz, C. H., Díaz, F., Reyna-Verdugo, H., Re, A. D., Vazquez-Felix, E. F., ... Bogdanchikova, N. (2017). Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response, and survival of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*, 169, 716–724. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.054>
- Jurašin, D. D., Ćurlin, M., Capjak, I., Crnković, T., Lovrić, M., Babič, M., ... Gajović, S. (2016). Surface coating affects behavior of metallic nanoparticles in a biological environment. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 7(1), 246–262. <https://doi.org/10.3762/bjnano.7.23>
- K. Patlolla, A. (2013). Environmental Toxicity Monitoring of Nanomaterials using Vicia Faba GENE-TOX Assay. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 04(02). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000e129>
- Kalmantaeva, O. V., Firstova, V. V., Potapov, V. D., Zyryna, E. V., Gerasimov, V. N., Ganina, E. A., ... Borisov, A. V. (2014). Silver-nanoparticle exposure on immune system of mice depending on the route of administration. *Nanotechnologies in Russia*, 9(9–10), 571–576. <https://doi.org/10.1134/S1995078014050061>
- Kazempour, S., Hashemabadi, D., & Kaviani, B. (2013). Effect of silver nanoparticles on the vase life and quality of cut chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) flower. *European Journal of Experimental Biology*, 3(6), 298–302.
- Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., & Schuster, E. W. (2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Protection*, 35, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.007>
- Kohan-Baghkheirati, E., & Geisler-Lee, J. (2015). Gene Expression, Protein Function and Pathways of *Arabidopsis thaliana* Responding to Silver Nanoparticles in Comparison to Silver Ions, Cold, Salt, Drought, and Heat. *Nanomaterials*, 5(4), 436–467. <https://doi.org/10.3390/nano5020436>
- Kumari, M., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2009a). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*, 407(19), 5243–5246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.024>
- Kumari, M., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2009b). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*, 407(19), 5243–5246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.024>
- Lee, W. M., Kwak, J. Il, & An, Y. J. (2012). Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere*, 86(5), 491–499. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.10.013>

- Leme, D. M., & Marin-Morales, M. A. (2008). Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water-A case study. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 650(1), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.006>
- Leme, D. M., & Marin-Morales, M. A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 682(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>
- Liu, J., & Jiang, G. (2015). Silver nanoparticles in the environment. *Silver Nanoparticles in the Environment*, 1–152. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-46070-2>
- Moore, M. N. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 32(8), 967–976. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.06.014>
- Mustafa, G., Sakata, K., Hossain, Z., & Komatsu, S. (2015). Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean under flooding stress. *Journal of Proteomics*, 122, 100–118. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.030>
- Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y., & Kumar, D. S. (2010). Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*, 179(3), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.012>
- Ng, C.-T., Li, J. J., Bay, B.-H., & Yung, L.-Y. L. (2010). Current Studies into the Genotoxic Effects of Nanomaterials. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 1–12. <https://doi.org/10.4061/2010/947859>
- Nowack, B., Krug, H., & Height, M. (2011). 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers (vol 45, pg 1177, 2011). *Environmental Science & Technology*, 45(7), 3189. <https://doi.org/10.1021/es200435m>
- Nunes, E. A., De Lemos, C. T., Gavronski, L., Moreira, T. N., Oliveira, N. C. D., & da Silva, J. (2011). Genotoxic assessment on river water using different biological systems. *Chemosphere*, 84(1), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.085>
- Nymark, P., Catalán, J., Suhonen, S., Järventaus, H., Birkedal, R., Clausen, P. A., ... Norppa, H. (2013). Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology*, 313(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.014>
- Panda, K. K., Achary, V. M. M., Krishnaveni, R., Padhi, B. K., Sarangi, S. N., Sahu, S. N., & Panda, B. B. (2011a). In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicology in Vitro*, 25(5), 1097–1105. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.03.008>
- Panda, K. K., Achary, V. M. M., Krishnaveni, R., Padhi, B. K., Sarangi, S. N., Sahu, S. N., & Panda, B. B. (2011b). In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicology in Vitro*, 25(5), 1097–1105. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.03.008>

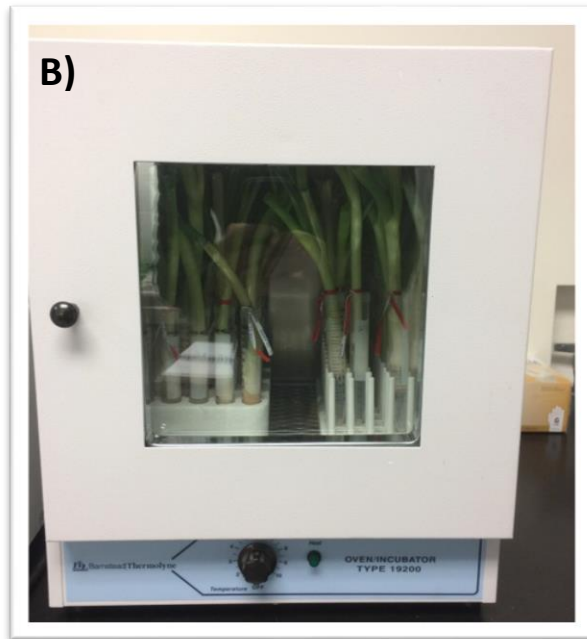
- Pereira, S. P. P., Jesus, F., Aguiar, S., de Oliveira, R., Fernandes, M., Ranville, J., & Nogueira, A. J. A. (2018). Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*: Surface coating and exposure period-related effects. *Science of the Total Environment*, *618*, 1389–1399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.275>
- Pimentel-Acosta, C. A., Morales-Serna, F. N., Chávez-Sánchez, M. C., Lara, H. H., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N., & Fajer-Ávila, E. J. (2019). Efficacy of silver nanoparticles against the adults and eggs of monogenean parasites of fish. *Parasitology Research*, *118*(6), 1741–1749. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06315-9>
- Rank, J., & Nielsen, M. H. (1998). Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *418*(2–3), 113–119. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00118-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00118-1)
- Rezvani, N., Sorooshzadeh, A., & Farhadi, N. (2012). Table I Analysis of Variance Mean Square Testing Traits, *6*(1). Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/8178/f0ccf45a03978d24fb8429fb5f8ceb05ab19.pdf>
- Romo-Quiñonez, C. R., Álvarez-Sánchez, A. R., Álvarez-Ruiz, P., Chávez-Sánchez, M. C., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., & Mejia-Ruiz, C. H. (2020). Evaluation of a new Argovit as an antiviral agent included in feed to protect the shrimp *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus infection. *PeerJ*, *2020*(2), 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.8446>
- Ruiz-Ruiz, B., Arellano-García, M. E., Radilla-Chávez, P., Salas-Vargas, D. S., Toledano-Magaña, Y., Casillas-Figueroa, F., ... Bogdanchikova, N. (2020). Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. *ACS Omega*, *5*(21), 12005–12015. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00149>
- Scherer, M. D., Sposito, J. C. V., Falco, W. F., Grisolia, A. B., Andrade, L. H. C., Lima, S. M., ... Caires, A. R. L. (2019). Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of *Allium cepa* roots: A close analysis of particle size dependence. *Science of the Total Environment*, *660*, 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.444>
- Science, E., Road, P., Haven, W., Agricultural, T. C., Station, E., & Haven, N. (2009). Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants: Masarykovy univerzity, *43*(24), 9473–9479. Retrieved from <http://eds.a.ebscohost.com.ezproxy.muni.cz/eds/detail/detail?vid=3&sid=9af5af93-bca9-4aee-82fb-a058b704edfa%40sessionmgr4004&hid=4113&bdata=JkF1dGhUeXBIPWlwLGNvb2tpZSx1aWQmbGFuZzljcyZzaXRIPWVkcylsaXZlJnNjb3BIPXNpdGU%3D#db=mdc&AN=19924897>
- Semenov, F., & Fidarova, K. (2012). [The treatment of the patients presenting with chronic inflammation of the trepanation cavity with a preparation containing silver nanoparticles following sanitation surgery of the open type.]. *Vestnik Otorinolaringologii*, *6*, 117–119.

- Shkil, N. N., Nefedova, E. V., & Burmistrov, V. A. (2018). Effect of Nanoparticles of Silver in Argovit Preparation on Antibiotic Resistance of Bacteria in Cow Mastitis Treatment. *Polythematic Online Scientific Journal of Kuban State Agrarian University*, 142(08). <https://doi.org/10.21515/1990-4665-142-031>
- Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., & Mohammad, F. (2015). Nanotechnology and plant sciences: Nanoparticles and their impact on plants. *Nanotechnology and Plant Sciences: Nanoparticles and Their Impact on Plants*, 1–303. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14502-0>
- Silbergeld, E. K. (1998). TOXICOLOGÍA: Herramientas y enfoques. *Enciclopedia de Salud y Seguridad En El Trabajo*, 33.1-33.83.
- Spinoso-Castillo, J. L., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J. A., Morales-Ramos, V., & Bello-Bello, J. J. (2017a). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129(2), 195–207. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1169-8>
- Spinoso-Castillo, J. L., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J. A., Morales-Ramos, V., & Bello-Bello, J. J. (2017b). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129(2), 195–207. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1169-8>
- Stephano-Hornedo, J. L., Torres-Gutiérrez, O., Toledano-Magaña, Y., Gradilla-Martínez, I., Pestryakov, A., Sánchez-González, A., ... Bogdanchikova, N. (2020). Argovit™ silver nanoparticles to fight Huanglongbing disease in Mexican limes (*Citrus aurantifolia* Swingle). *RSC Advances*, 10(11), 6146–6155. <https://doi.org/10.1039/c9ra09018e>
- Syu, Y. yu, Hung, J. H., Chen, J. C., & Chuang, H. wen. (2014). Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.07.010>
- Ulynets, V. Z., Batsmanova, L. M., Konotop, Y. O., Kovalenko, M. S., Meleshko, A. O., & Taran, N. Y. (2014). Phytotoxicity of colloidal solutions of metal-containing nanoparticles. *Cytology and Genetics*, 48(2), 99–102. <https://doi.org/10.3103/s0095452714020054>
- Uraskulova, B. B., & Gyusan, A. O. (2017). The clinical and bacteriological study of the effectiveness of the application of silver nanoparticle for the treatment of tuberculosis. *Vestnik Otorinolaringologii*, 82(3), 54–57. <https://doi.org/10.17116/otorino201782354-57>
- Wang, H., Ho, K., Scheckel, K. G., Wu, F., Cantwell, M. G., Katz, R., ... Burgess, R. M. (2014). Toxicity , Bioaccumulation and Biotransformation of Silver Nanoparticles in Marine Organisms Toxicity , Bioaccumulation and Biotransformation of Silver Nanoparticles in Marine Organisms. <https://doi.org/10.1021/es502976y>
- Wang, J., Koo, Y., Alexander, A., Yang, Y., Westerhof, S., Zhang, Q., ... Alvarez, P. J. J. (2013). Phytostimulation of poplars and Arabidopsis exposed to silver nanoparticles and

- Ag<sup>+</sup> at sublethal concentrations. *Environmental Science and Technology*, 47(10), 5442–5449. <https://doi.org/10.1021/es4004334>
- Wang, P., Lombi, E., Zhao, F. J., & Kopittke, P. M. (2016). Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. *Trends in Plant Science*, 21(8), 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.005>
- Xu, L., Li, X., Takemura, T., Hanagata, N., Wu, G., & Chou, L. L. (2012). Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel. *Journal of Nanobiotechnology*, 10(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-16>
- Yan, A., & Chen, Z. (2019). Impacts of silver nanoparticles on plants: A focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 23–25. <https://doi.org/10.3390/ijms20051003>
- Yao, Y., Geisler, M., Li, K., Zhang, W., Kolmakov, A., Geisler-Lee, J., ... Wang, Q. (2012). Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology*, 7(3), 323–337. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.658094>
- Yin, L., Colman, B. P., McGill, B. M., Wright, J. P., & Bernhardt, E. S. (2012). Effects of Silver Nanoparticle Exposure on Germination and Early Growth of Eleven Wetland Plants. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047674>
- Zeinalov, O. A., Kombarova, S. P., Bagrov, D. V., Petrosyan, M. A., Tolibova, G. H., Feofanov, A. V., & Shaitan, K. V. (2016). About the Influence of Silver Nanoparticles on Living Organisms Physiology. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 14(4), 42–51. <https://doi.org/10.17816/rcf14442-51>

## Anexos

*Imágenes de preparación de cebollas para los experimentos*



A) Preparación bulbo de *Allium cepa*. B) Vista de incubadora donde cultivaron los bulbos de *Allium cepa* dentro de los tubos falcon con diferentes tratamientos evaluados (AgNPs, PVP, AgNO<sub>3</sub>).

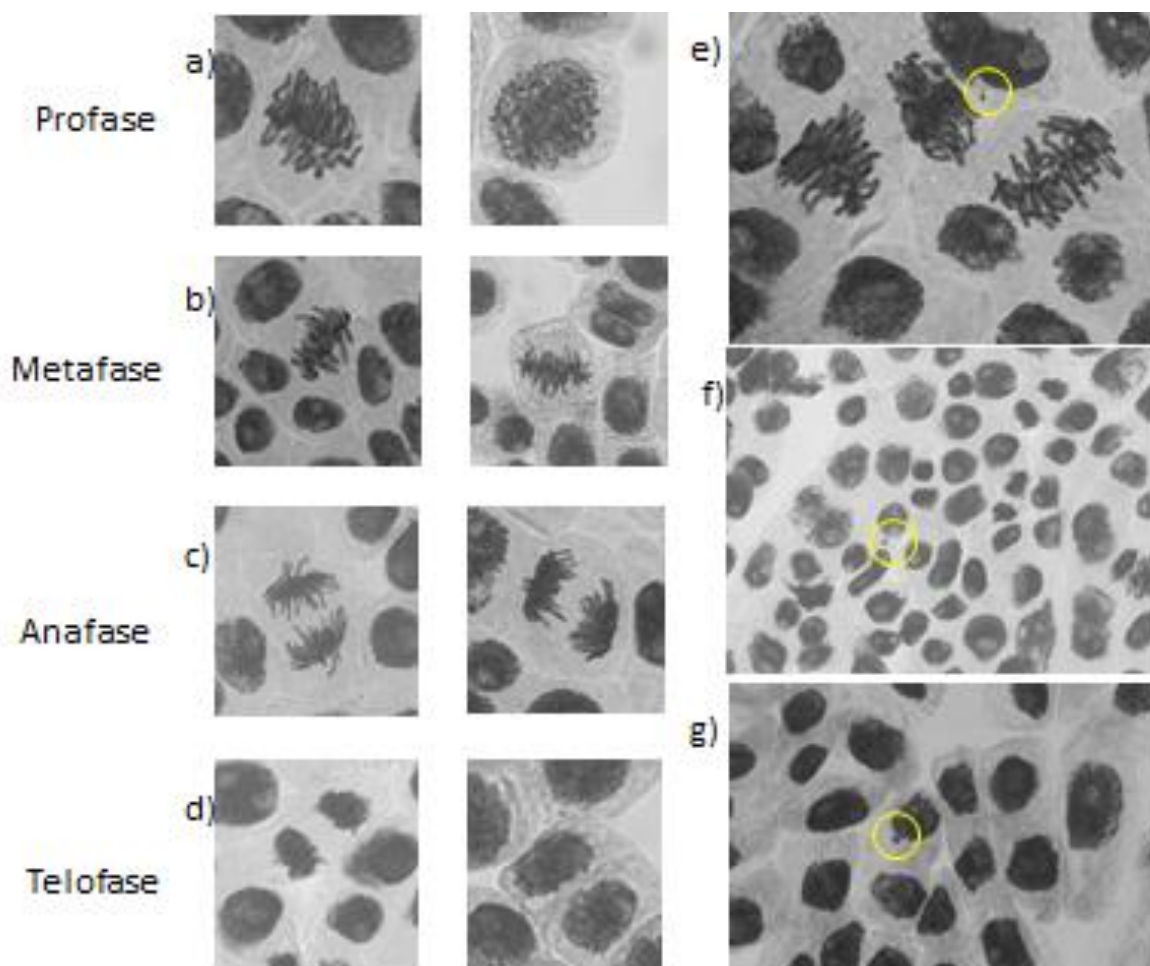


Bulbos de *Allium cepa* después de los diferentes tratamientos.

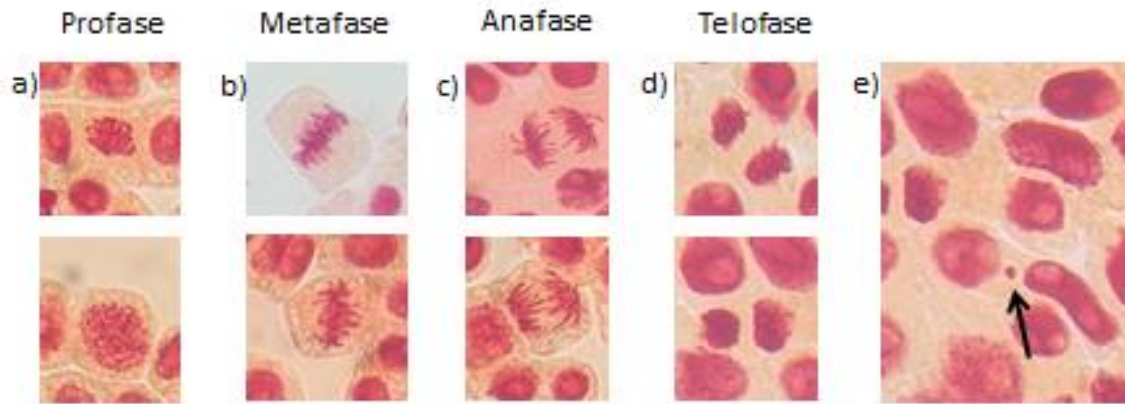


A) Raíces de *Allium cepa* en vidrio de reloj realizando hidrólisis de la pared celular con ácido clorhídrico 5 N. B) Raíces en vidrio de reloj realizando tinción con orceina acética.

*Observación a 40 X de células en el conteo del IM y MN*



Se observa células de *Allium cepa* expuestas a AgNPs, AgNO<sub>3</sub> y PVP. (a, b, c y d ), células normales de profase, metafase, anafase and telofase, (e, f and g ), Micronucleos en células en interfase.



Se observa células de *Allium cepa* expuestas a AgNPs, AgNO<sub>3</sub> y PVP. (a, b, c y d ), células normales de profase, metafase, anafase and telofase, e), Célula con Micronucleo en interfase.