UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES

"Caracterización genotoxicológica de agentes fungicidas y nanopartículas de plata aplicadas en cultivos para el control de enfermedades fúngicas"

Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Ambientales

Grace Stephany Mendoza Solano

Director de Tesis de Maestría: Dra. Nancy Beatriz Andrioli

Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE), Dpto. de Ecología Genética y Evolución, FCEyN, UBA

2022

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta D. Mudry directora del Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por poner a disposición el laboratorio y los recursos para la realización de la presente tesis.

Al Dr. Jorge Gastón Fernández y la Dra María Isabel Sanz Ferramola de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis por proporcionarnos las nanopartículas de plata biosintetizadas

Al Dr. Sebastian Sabatini y la licenciada Tatiana Noya Abad del Laboratorio de Enzimología Estrés y Metabolismo, Departamento de Química Biológica por su colaboración en el análisis de daño oxidativo y respuesta antioxidante.

A los integrantes del GIBE por su amabilidad y predisposición para integrarme al grupo.

Al Dra. Nancy Beatriz Andrioli, directora de esta tesis de maestria por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por todas sus sugerencias e ideas, por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas.

A mi familia quienes a pesar de la distancia siempre están presentes para acompañarme a afrontar las dificultades y celebrar los logros.

“Caracterización genotoxicológica de agentes fungicidas y nanopartículas de plata aplicadas en cultivos para el control de enfermedades fúngicas”

Resumen:

Se caracterizo el potencial el potencial genotóxico de los agentes fungicidas Tebuconazol, Iprodione y Nanopartículas de plata biosintetizadas, analizando la relación entre la concentración-efecto sobre las variables índice mitótico, anomalías de la mitosis y aberraciones cromosómicas por medio del test de *Allium cepa* como sistema in vivo.

La evaluación de la exposición de las raíces a Iprodione mostraron un patrón de respuesta que indica afectación del sistema segregacional con impacto en el IM a las 30 hs para las concentraciones más elevadas. El análisis estadístico indica que difiere significativamente el índice de metafase y la relación anafase/metafase. Este resultado es compatible con el patrón descriptivo y con la presencia de anormalidades de tipo C- metafase y desordenes en anafase. La exposición a tebuconazol sugiere que existen interacciones durante la interfase, además de las que ocurren durante la mitosis. Estos resultados se corresponden con los valores de índice de metafase y relación anafase metafase que no se ven afectados por la presencia del TCZ en las células expuestas a 4hs, aunque para el tiempo de 30 hs se muestra los valores muestran un patrón inestable en función de las concentraciones. La frecuencia de anomalías de la mitosis se incrementa con las concentraciones siendo la diferencia entre los valores estadísticamente significativa para las 2 concentraciones más elevadas (15 y 30 μg/ml). Los resultados obtenidos para la exposición a Ag NPs indican que las que provienen de *Aspergillus niger* son capaces de inducir genotoxicidad en términos de anomalías de la mitosis con una prevalencia de anormalidades de tipo C-metafases y desórdenes en anafase. Los patrones de respuesta para el índice de metafase y la relación anafase/metafase se ven afectados respecto al control negativo para la exposición a 30 hs, y este resultado es compatible con disturbios en la segregación.

Palabas clave: Allium cepa, Iprodione, Tebuconazol, Nanoparticulas, biomarcadores.

“Caracterización genotoxicológica de agentes fungicidas y nanopartículas de plata aplicadas en cultivos para el control de enfermedades fúngicas”

Abstract:

The genotoxic potential of the fungicidal agents Tebuconazole, Iprodione and Biosynthesized Silver Nanoparticles was characterized, analyzing the relationship between the concentration-effect on the mitotic index variables, mitosis abnormalities and chromosomal aberrations by means of the *Allium cepa* test as a system. live.

The evaluation of the exposure of the roots to Iprodione showed a response pattern that indicates affectation of the segregational system with an impact on the MI at 30 hours for the highest concentrations. Statistical analysis indicates that the metaphase index and the anaphase/metaphase ratio differ significantly. This result is compatible with the descriptive pattern and with the presence of C-metaphase abnormalities and anaphase disorders. Tebuconazole exposure suggests that interactions exist during interphase, in addition to those that occur during mitosis. These results correspond to the values of metaphase index and anaphase-telophase ratio that are not affected by the presence of TCZ in cells exposed to 4 hours, although for the time of 30 hours the values show an unstable pattern depending on the concentrations. The frequency of mitosis abnormalities increases with concentrations, the difference between the values being statistically significant for the 2 highest concentrations (15 and 30 μg/ml). The results obtained for exposure to Ag NPs indicate that those from *Aspergillus niger* are capable of inducing genotoxicity in terms of mitosis abnormalities with a prevalence of C-metaphase abnormalities and anaphase disorders. Response patterns for metaphase index and anaphase/telophase ratio are affected relative to the negative control for 30-h exposure, and this result is consistent with segregation disturbances.

Keywords: Allium cepa, Iprodione, Tebuconazole, Nanoparticles, biomarkers.

TABLA DE CONTENIDO

CARACTERIZACION GENOTOXICOLÓGICA DE AGENTES FUNGICIDAS Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA APLICADAS EN CULTIVOS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES FÚNGICAS.

1. INTRODUCCION 7
1.1 Problemática ambiental asociada a los fungicidas de uso agronómico 7
1.1.1 Fungicidas químicos 7
1.1.2 Tebuconazol 10
1.1.3 Iprodione 11
1.1.4 Nanopartículas 12
1.2 Allium cepa como modelo para ensayos toxicológicos 14
1.2.1 Ensayos biológicos 14
1.2.2 Allium cepa 16
2. OBJETIVOS 19
2.1 Objetivo general 19
2.2 Objetivos específicos 19
3. HIPÓTESIS 19
3.1 Hipótesis 1 19
3.2 Hipótesis 2 20
3.3 Hipótesis 3 20
4. MATERIALES Y METODOS 22
4.1 Materiales 22
4.1.1 Bulbos de *Allium cepa* 22
4.1.2 Agentes químicos 24
4.2 Métodos 25
4.2.1 Cultivo de los bulbos *Allium cepa* 25
4.2.2 Condiciones del cultivo 26
4.2.3 Preparación de las soluciones (muestras y controles). 27
4.2.4 Obtención de los preparados 28
4.2.5 Evaluación del estrés oxidativo 28
4.2.6 Evaluación de la genotoxicidad. 30
4.2.7 Determinación del índice mitótico y de fases 31

4.2.8 Determinación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas 31
4.3 Análisis exploratorio y estadísticos de los datos 31
5. RESULTADOS 34
5.1 Genotoxicidad 34
5.1.1 Iprodione - Análisis exploratorio 34
5.1.2 Iprodione - Análisis estadístico 43
5.1.3 Tebuconazol - Análisis exploratorio 44
5.1.4 Tebuconazol - Análisis estadístico 52
5.1.5 Nanopartículas de Plata (AgNPs) - Análisis exploratorio 53
5.1.6 Nanopartículas de Plata (AgNPs) - Análisis estadístico 58
5.2 Griseofulvina: control positivo 59
5.3 ESTRÉS OXIDATIVO 61
6. DISCUSIÓN 65
6.1 Ensayo Allium cepa 65
6.2 Evaluación genotóxica de los fungicidas 68
6.3 EVALUACION DEL ESTRÉS OXIDATIVO 72
7. BIBLIOGRAFIA 75

CARACTERIZACION GENOTOXICOLÓGICA DE AGENTES FUNGICIDAS Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA APLICADAS EN CULTIVOS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES FÚNGICAS.

1. INTRODUCCION

1.1 Problemática ambiental asociada a los fungicidas de uso agronómico

1.1.1 Fungicidas químicos

CONTEXTO

La producción de plaguicidas orgánicos o sintéticos mostró un aumento a nivel mundial desde comienzos del siglo XX, debido al desarrollo de la industria petrolera. A su vez, la producción y uso de estos compuestos, han aumentado la carga de estas sustancias en la atmósfera, hidrósfera y suelos, ocasionando eventos de contaminación en el ambiente (García-Gutiérrez & Rodríguez-Mesa, 2012). Los plaguicidas utilizados en el área agrícola son una parte del espectro de los productos químicos industriales utilizados actualmente. Según la base de datos de la American Chemical Society, en 1993 se habían identificado más de 13 millones de productos químicos, a los que se suman cada año unos 500.000 nuevos compuestos (Ongley et al., 2010).

El uso de estos agentes químicos en la agricultura, permitió alcanzar niveles productivos adecuados para la comercialización de productos en los mercados nacionales e internacionales.

FUNGICIDAS

Las enfermedades fúngicas que afectan los sistemas de producción frutihortícola, en especial la vid y cultivos de huerta, son difíciles de eliminar, debido a que los brotes continúan produciéndose a lo largo de todas las etapas de crecimiento del

cultivo, usualmente son las esporas quienes han permanecido latentes a lo largo del invierno las que desencadenan el brote de contagio. Por este motivo los fungicidas particularmente, se emplean en diversas etapas del cultivo: en el curado de las semillas, el crecimiento vegetativo y el almacenamiento post-cosecha (Wightwick et al., 2008).

Durante la aplicación del fungicida al cultivo, una porción del mismo ingresará al suelo donde persistirá durante algún periodo de tiempo y posiblemente migrará debido a procesos de lixiviación o escorrentía. A su vez, otra parte de los agroquímicos migraran fuera de la zona de cultivo ingresando a los cursos de agua más cercanos y las zonas de agua subterránea donde pueden causar efectos adversos sobre los organismos acuáticos (Wightwick et al., 2012).

RIESGO AMBIENTAL

El destino y comportamiento de los agroquímicos, incluyendo los fungicidas, en el ambiente está determinado por las propiedades de la molécula (capacidad de unirse a las partículas del suelo y susceptibilidad de degradación) y factores ambientales (Tipo de suelo, precipitación, topografía y prácticas de manejo agrícola), debido a la gran diversidad de factores existen muchos escenarios a considerar cuando se evalúa el potencial de migración fuera de la zona de cultivo y la persistencia en el ambiente (Arias-Estévez et al., 2008; Komárek et al., 2010).

Aunque los pesticidas se emplean selectivamente para controlar determinadas especies dañinas, esta especificidad no impide que sean tóxicos para organismos no blanco. Además, aunque se traten de pesticidas no persistentes, su aplicación continua genera desequilibrios ecológicos que alteran a los controladores naturales, beneficiando el desarrollo de plagas, siendo eventualmente las especies predominantes (Chambers et al., 2014; Choudhury & Choudhury, 2018).

RIESGO HUMANO

En respuesta a estas alteraciones ecológicas, el agricultor tiende a incrementar la dosis del plaguicida y el número de aplicaciones, y en algunos casos, a agregar nuevos productos (ya sea solos o combinados).

Esto, genera problemas ecológicos, agronómicos, económicos y de salud pública (Navarro et al., 2008). El uso periódico de fungicidas presenta un riesgo variable para la salud humana debido a que los residuos quedan presentes en los alimentos y la manipulación post cosecha favorece el contacto con las personas (Fantke & Jolliet, 2016). El uso intensivo de fungicidas en varios cultivos lleva a que los residuos de fungicidas, sea uno de los principales factores que influyen en la seguridad alimentaria y poseen un riesgo potencial para los humanos (Sun et al., 2015).

Los estudios sobre la dinámica de residuos de fungicidas están enfocados en su mayoría en evaluar principalmente el comportamiento del pesticida en condiciones de campo abierto debido a su riesgo ambiental. En condiciones de invernadero, los residuos pueden acumularse en niveles más altos debido a la contención que comprende el invernadero, la poca ventilación y alta humedad, (El-Nahhal, 2017; Rial-Otero et al., 2005; Sun et al., 2015) lo que podría afectar la foto degradación de los pesticidas y el proceso de evaporación (Jiao et al., 2020).
Una mayor prevalencia de síntomas respiratorios en invernaderos se ha asociado con espacios con poca renovación de aire, presencia de alérgenos, mal manejo en la aplicación de pesticidas y la cantidad de horas por día de trabajo (Behrens et al., 2004).

GENOTOXICIDAD Y CARCINOGENICIDAD

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) evalúa el potencial carcinogénico de varios insecticidas, fungicidas, herbicidas entre otros, clasificando a muchos pesticidas como carcinogénicos para animales de laboratorio (IARC, 2015).
Los efectos adversos producidos por un xenobiótico a nivel celular son referidos como citotóxicos y se manifiestan por la pérdida de funciones vitales celulares como la respiración o la permeabilidad de la membrana. Otros efectos citotóxicos afectan a la progresión del ciclo celular, como resultado de la muerte celular o la detención del ciclo celular en el tejido proliferante.

La genotoxicidad se circunscribe a los efectos adversos sobre el sistema de transmisión de la información genética e incluye el daño al ADN o a cualquier molécula que cumpla un rol en dicho proceso, como pueden ser las proteínas asociadas al control y regulación del ciclo celular o las proteínas que componen y regulan el funcionamiento del huso mitótico.

El potencial genotóxico es un factor de riesgo para efectos a largo plazo tales como carcinogénesis, toxicidad reproductiva y enfermedades neurodegenerativas. Los ensayos para evaluar el potencial genotóxico, presentaron resultados positivos para numerosos pesticidas (Bolognesi, 2003).

El tebuconazol y el Iprodione son fungicidas que pertenecen a los grupos químicos triazoles y dicarboxiamidas respectivamente. Son frecuentemente utilizados en las formulaciones, tanto de forma individual como combinada con otros productos, aunque su potencial genotóxico no se encuentra suficientemente caracterizado (Castro et al., 2018; Chaufan et al., 2019).

1.1.2 Tebuconazol

El tebuconazol es un fungicida de amplio espectro ampliamente utilizado en la agricultura. Los residuos de éste y otros fungicidas se detectan más frecuentemente en los productos frutihortícolas que los insecticidas y los herbicidas, indicando que su persistencia es elevada (Baša Česnik et al., 2015) (Ticha et al., 2008) (Cesnik et al., 2015, Ticha et al., 2008).

Estudios realizados en ratas demostraron que la exposición a 60 mg/kg/día de tebuconazol produce neurotoxicidad (Moser, Barone, Jr., Smialowicz, Harris, B. J. Davis, Overstreet, Mauney, 2001). Estudios posteriores realizados, también en ratas, demostraron toxicidad del desarrollo, actividad fetotóxica y reproductiva para dosis de entre 50 y 100 mg/kg/día de tebuconazol (Taxvig et al., 2007). No existen suficientes estudios sobre la genotoxicidad del tebuconazol y los informes de la Environmental Protection Agency indican que estudios realizados en diferentes sistemas como prueba de Ames, micronúcleos en

ratón, intercambio de cromátides hermanas en cultivos de ovario de hámster chino (CHO) y síntesis de ADN no programada en hepatocitos de rata, no aportan evidencias de mutagenicidad (EPA Environmental Protection Agency, 1999)

Estudios citogenéticos en sangre periférica de bovinos revelan inducción de aberraciones cromosómicas por exposición a tebuconazol en el rango de 3 - 60 µg/ml (Šiviková et al., 2013). El test de *Allium cepa* informó que concentraciones de la formulación comercial entre 1800 y 6000 µg/ml producen aberraciones en la división mitótica y meiótica (Fisun & Rasgele, 2009).
La escasez de estudios para evaluar la genotoxicidad de este fungicida, así como de otros triazoles es alarmante considerando el uso frecuente de estas sustancias químicas en la frutihorticultura y su persistencia en los productos y en el ambiente (EFSA, 2009).

1.1.3 Iprodione

Iprodione (IP) es un fungicida sistémico, protector y curativo perteneciente al grupo de las dicarboximidas, utilizadas para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades fúngicas. Es compatible con la mayoría de los pesticidas de uso común en la agricultura moderna. Se recomienda aplicar con agua ligeramente ácida, se aplica en hortalizas, plantas ornamentales, frutas, tubérculos, algodón y girasol, para controlar una variedad de plagas de hongos en los cultivos. Iprodione actúa como un fungicida sistémico inhibiendo la germinación de esporas y el crecimiento del micelio de hongos (Loutfy et al., 2015). Estudios previos han indicado que los fungicidas de dicarboximida tales como iprodione y vinclozolina inducen la peroxidación de lípidos por medio de especies reactivas oxígeno en los hongos.
La exposición alimentaria a los residuos de iprodione se produce a través del agua de alimentación y bebida. Iprodione es activo en el suelo y persiste durante períodos variables de tiempo. La población humana puede estar expuesta a iprodione por el uso a niveles residencial y laboral de la mezcla, carga y aplicación del compuesto en forma de polvo humectable o líquido (WHO/FAO, 2001).

Se han desarrollado diferentes métodos para detectar la presencia de IP en los alimentos (Bian et al., 2020; Loutfy et al., 2015; Xu et al., 2019). En este sentido, el IP fue clasificado como carcinógeno de categoría 2 de acuerdo con el Reglamento (CE) n.o 1272/2008 del Parlamento Europeo y reclasificado como carcinógeno de categoría 1B y tóxico para la reproducción de categoría 2 por el Reglamento de Ejecución de la Comisión (UE 2017/2091). La aprobación de la IP no fue renovada en 2017 debido a su actividad como disruptor endocrino y por el potencial genotóxico de su metabolito más importante (European Food Safety Authority (EFSA)., 2016; Pisani et al., 2016). Además, algunas cuestiones relacionadas con la evaluación del riesgo ecotoxicológico de IP no se han estudiado a fondo, como el destino de sus metabolitos residuales en el medio ambiente.

La citotoxicidad y genotoxicidad del IP se encuentra poco estudiada. Un estudio previo demostró que IP induce citotoxicidad, desequilibrio oxidativo y genotoxicidad en la línea celular HEp-2, y los resultados de los ensayos de MNi y el tipo de anomalías en la división sugirieron mecanismos de acción tanto aneugénicos o clastogénicos (Chaufan et al., 2019).

1.1.4 Nanopartículas

Actualmente, la aplicación de métodos químicos, es la estrategia más utilizada y efectiva para el manejo y control en enfermedades fúngicas, sin embargo, múltiples estudios han evidenciado que las nanopartículas metálicas poseen propiedades antimicrobianas contra diversos patógenos (Khan et al., 2019; Palencia et al., 2015).

Se han desarrollado varios métodos químicos y bioquímicos para la síntesis de nanopartículas metálicas, siendo la biosíntesis considerada amigable con el ambiente debido a que, a diferencia de los métodos químicos y físicos, presenta beneficios ambientales al emplear reactivos inocuos, minimizando los residuos tóxicos. Por las razones mencionadas, este método es conocido como síntesis verde o del inglés “green synthesis” de nanomateriales (Hulkoti & Taranath, 2014).

Uno de los principios mas llamativos en la síntesis verde, es la reducción y eliminación del uso y generación de sustancias peligrosas durante el proceso de

manufactura y aplicación de los productos químicos. Lo que apunta a rediseño de los procesos actualmente empleados y desarrollo de métodos alternativos, mediante la introducción de predicciones de su potencial impacto en la salud y medio ambiente durante el desarrollo de nuevas sustancias, productos o materiales. (Doria Serrano, 2009).

Los microorganismos han demostrado ser altamente eficaces sintetizando nanopartículas de distintas composiciones químicas con actividad antimicrobiana como oro, plata, sulfuro de cadmio, sulfuro de zinc, cobre, dióxido de titanio, óxido de zinc y nanopartículas magnéticas (Jaidev & Narasimha, 2010; Kuppusamy et al., 2016). Las nanoparticulas de plata, son una opción alternativa al uso de agentes químicos, para el control de enfermedades fúngicas. Son consideradas inocuas a nivel ambiental, sin embargo, su potencial citotóxico y genotóxico es aun debatido (Lim et al., 2012). La acción biocida se atribuye a la formación de radicales libres, los cuales dañan la membrana lipídica celular interrumpiendo su función celular (Schuster et al., 2014).

Tanto el uso de nanopartículas y fungicidas químicos, liberan residuos al ambiente que se encuentran presentes en los productos, especialmente sobre el suelo y cuerpos de agua. Por lo tanto, su aplicación continua pude generar desequilibrios ecológicos y ambientales (Ammar, 2018), conllevando a problemas de contaminación ambiental, alimentaria o enfermedades por exposición laboral. Por lo tanto, el uso y aplicación de nanopartículas para el control de enfermedades fúngicas, presenta la misma problemática ambiental que la señalada para los fungicidas químicos y existen pocos datos sobre el potencial citotóxico y genotóxico de estos materiales (Medina et al., 2007).

Los estudios de genotoxicidad en nanopartículas, revela que a bajas concentraciones los efectos no son importantes debido a que intervienen los mecanismos de chequeo y reparación del ADN y el control de los procesos vinculados a la segregación cromosómica (Kumari et al., 2009).

Las dosis umbrales para agentes genotóxicos pueden variar con el tiempo de exposición y su caracterización es esencial para establecer los niveles de riesgo genotóxico que se presentan a bajas dosis (Massarsky et al., 2014).
La relación dosis-respuesta es uno de los parámetros críticos del enfoque, en la evaluación de riesgos de salud desarrollado en 1983 por el Consejo Nacional de Investigación (NRC, 1983).

El conocimiento derivado de estos estudios contribuye con la gestión para establecer las medidas de control sanitario por parte de los organismos reguladores que intervienen en las autorizaciones de uso y comercialización, así como para implantar los niveles máximos permitidos de los residuos de pesticidas en los productos elaborados.

1.2 Allium cepa como modelo para ensayos toxicológicos

1.2.1 Ensayos biológicos

Los ensayos biológicos se basan en metodologías que permiten determinar los efectos de agentes físicos, químicos u otros organismos de prueba bajo condiciones experimentales controladas (Barr, 2008). La medida de la toxicidad se establece en base a los efectos observables denominados puntos finales o en inglés, “endpoints”. Estos efectos pueden presentarse en diferentes niveles de organización biológica, desde moleculares o celulares, hasta poblaciones o comunidades. A partir de la cuantificación de estos efectos, se obtienen los parámetros que permiten por medio de pruebas estadísticas establecer el nivel de toxicidad.

En este sentido, la toxicidad es la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto adverso sobre un sistema biológico y dependerá de las propiedades químicas del compuesto, la concentración, el tiempo de exposición (Pablo M. Demetrio, 2014).

Según el tiempo de exposición los bioensayos se clasifican en, agudo: donde el tiempo de exposición es corto en relación con el ciclo biológico evaluado. Crónico: el tiempo de exposición es prolongado y abarca un ciclo de vida completo o una etapa de desarrollo completa (Bedaux &. Kooijman, 1994; Klaassen et al., 1998) .

El tiempo de exposición es variable y es el lapso de tiempo que el agente incide sobre una población, organismo, órgano, tejido o célula en determinadas concentraciones o dosis. La concentración del compuesto es la cantidad de sustancia aplicada en el medio y la dosis se define como la cantidad del compuesto que ingresa al organismo. Los puntos finales registrados, están constituidos por parámetros bioquímicos, genéticos, morfológicos o comportamentales que permiten interpretar los efectos tóxicos.

Los bioensayos pueden ser uniespecificos en donde se obtiene información sobre la relación dosis-respuesta, los resultados a la exposición suelen no ser aplicados a otras especies o multiespecíficos pueden extrapolarse los resultados a otras especies, reproducen el efecto sobre la comunidad y presentan mayor aplicación ecológica (Cairns & Pratt, 1990).

El diseño de un bioensayo debe incluir aspectos tales como: controles, el control negativo es indispensable y en el caso de bioensayos de laboratorio debe ser un medio de exposición libre del compuesto analizado. Frecuentemente para el control negativo, se utiliza medio acuoso con elementos básicos que permitan el crecimiento adecuado de los organismos expuestos. El control positivo, se utiliza como una herramienta de validación que permite verificar la respuesta del organismo de prueba, por este motivo se emplean agentes de acción conocida. En algunos casos el control positivo es necesario, especialmente cuando se utilizan metodologías que pueden mostrar datos falsos negativos por cuestiones técnicas (Consuelo et al., 2004).

Algunos controles positivos utilizados en toxicología son: Dodecil sulfato 13 de sodio; Clorofenol; Fenol, Cloruro de cadmio; Dicromato de potasio, para evaluación de efectos genotóxicos pueden utilizarse, además: Bleomicina; Ciclofosfamida, Metilmetanosulfonato y Griseofulvina. El control solvente se utiliza cuando es necesario utilizar un vehiculizante en el caso que la sustancia a evaluar sea poco soluble o insoluble en agua. Los solventes más utilizados son: Formamida; Acetona; Dimetil sulfóxido; Trietilén glicol (Nancy Andrioli et al., 2012).

Los organismos de prueba para las aplicaciones de los bioensayos presentan las siguientes características: alta sensibilidad, disponibilidad, posibilidad de mantenimiento en el laboratorio y ser un organismo estudiado del cual se tenga suficiente conocimiento sobre la biología del mismo. Todos los organismos de prueba deben provenir de la misma fuente ya sea de origen comercial o natural y en este último caso se debe garantizar que no presenten efectos previos por contaminación del ambiente de origen (Consuelo et al., 2004).

1.2.2 Allium cepa

Las plantas vasculares son utilizadas como modelos para evaluar toxicidad de agentes químicos, mezclas y muestras ambientales (Int & Iqbal, 2019) Presentan una alta sensibilidad para detectar agentes mutagénicos ya que permiten evaluar tanto mutaciones puntuales como aberraciones cromosómicas en células de diferentes órganos y tejidos como las raíces, hojas y polen (Feretti, et al., 2008).

Las especies de plantas vasculares más utilizadas para la evaluación de contaminantes ambientales son: *Allium cepa, Vicia faba, Zea mays, Tradescantia, Nicotiana tabacum, Crepis capillaris y Hordeum*. Dentro de estas *Allium cepa* ha sido considerada como un modelo óptimo para evaluar daños cromosómicos y alteraciones en el ciclo mitótico, presenta unos cromosomas de gran tamaño y en número reducido (2n=16) (Grant, 1994).

Los ensayos de genotoxicidad en plantas son relativamente económicos, brindan resultados rápidos y confiables, el ensayo de *Allium cepa*, es una prueba eficaz para la detección y seguimiento *in situ* de la genotoxicidad de contaminantes ambientales y es comúnmente utilizada para el análisis de la genotoxicidad de muchos pesticidas los cuales inducen aberraciones cromosómicas en las células meristemáticas del sistema radicular (Leme & Marin-Morales, 2009). Además, estos ensayos son sensibles para medir y analizar efectos clastogénicos y aneugénicos (Andrioli et al., 2014) La primera estandarización del ensayo de *Allium cepa* fue realizada por Fiskesjo (1985) .

Este modelo permite además la recolección y conservación del ápice de la raíz, el cual es un tejido altamente proliferante que conserva intactos los procesos celulares siendo así un modelo in vivo, correspondiente al nivel 3 de análisis de genotoxicidad (Mudry & Carballo, 2006). Dicha estandarización incluye tanto los efectos toxicológicos basados en la inhibición en el crecimiento de la raíz, como los efectos citotóxicos como la Inhibición del Índice Mitótico (IM) medido como el número total de células en división en un ciclo celular, y genotóxicos como la frecuencia de mitosis anormales (MA).
Las anormalidades como puentes anafásicos y extremos pegoteados son resultado de la clastogénesis o rupturas cromosómicas, mientras que aquellas como C-metafases, anafases multipolares, anafases desorganizadas, cromosomas rezagados, células poliploides, estaría vinculadas con la aneugénesis, debido a la malformación o disrupción del huso mitótico, y como consecuencia a una mala segregación de las cromátidas (Saunders et al., 2000). Los fragmentos podrían formarse como consecuencia de ambos mecanismos de genotoxicidad durante la citocinesis (Lynch et al., 2019).

Se espera que estas anormalidades de la mitosis se manifiesten en la siguiente interfase como micronúcleos (MN). Estas estructuras son similares al núcleo celular, pero de tamaño reducido. La cuantificación de los MN permite evaluar el nivel de los efectos genotóxicos que son el resultado de rupturas de la cromatina o defectos en la segregación mitótica. Aunque pueden derivarse de otros procesos como la poliploidía como un mecanismo para eliminar el exceso de ADN.

Una de las ventajas del uso de *Allium cepa* como modelo, es la posibilidad de exponer la prueba directamente a mezclas complejas sin un tratamiento previo, se han evaluado una gran variedad de compuestos químicos, pero también compuestos solubles en cuerpos de agua (ríos, lagos, pozos, agua potable, etc.) como compuestos metálicos, mezclas de compuestos y muestras de suelos (Leme & Marin-Morales, 2009; Massarsky et al., 2014).

OBJETIVOS

E

HIPOTESIS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El presente trabajo tiene como objetivo general caracterizar, el potencial genotóxico de los agentes fungicidas tebuconazol, iprodione y nanopartículas de plata biosintetizadas, analizando la relación entre la concentración-efecto sobre las variables índice mitótico, anomalías de la mitosis y aberraciones cromosómicas por medio del test de *Allium cepa* como sistema *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la información brindada por el sistema de ensayo acerca de la acción genotóxica de los agentes químicos pertenecientes al grupo de los triazoles (Tebuconazol), dicarboxiamidas (Iprodione) y nanopartículas de plata biosintetizadas.

- Ampliar el conocimiento sobre los mecanismos involucrados en la respuesta genotóxica del sistema de ensayo *Allium cepa* como biomonitor de genotoxicidad.

- Caracterizar la respuesta celular del sistema de ensayo de *A. cepa* frente a dos tiempos de exposición a los agentes fúngicos iprodione, tebuconazol y nanoparticulas, que incluyen una duración menor y otra mayor a un ciclo celular.

3. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis 1

- Ho: Los agentes fungicidas Iprodione, tebuconazol y nanoparticulas de plata, no ejercen acción citotóxica sobre las células meristemáticas de *Allium cepa*.

- Ha: Los agentes fungicidas Iprodione, tebuconazol y nanoparticulas de plata, ejercen acción citotóxica sobre las células meristemáticas de *Allium cepa*.

3.2 Hipótesis 2

- Ho: Los agentes fungicidas Iprodione, tebuconazol y nanoparticulas de plata, no ejercen acción genotóxica sobre las células meristemáticas de *Allium cepa*.
- Ha: Los agentes fungicidas Iprodione, tebuconazol y nanoparticulas de plata, ejercen acción genotóxica sobre las células meristemáticas de *Allium cepa*.

3.3 Hipótesis 3

- Ho: La respuesta celular por exposición a los agentes fungicidas Iprodione, tebuconazol y nanoparticulas de plata, no difieren con el tiempo de exposición para las células meristemáticas de *Allium cepa*.

- Ha: La respuesta celular por exposición a los agentes fungicidas Iprodione, tebuconazol y nanoparticulas de plata, difieren con el tiempo de exposición para las células meristemáticas de *Allium cepa*.

MATERIALES

Y

METODOS

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Bulbos de *Allium cepa*

Para el presente trabajo se emplearon bulbos de cebolla (Allium cepa *L.*), como modelo experimental en plantas vasculares. En este tipo de ensayos, los tejidos meristemáticos y de elongación (que son parte del crecimiento de la raíz), son expuestos a las sustancias cuyo efecto se quiere evaluar. Se analizan indicadores genotoxicológicos como la inhibición de la división mitótica, alteraciones durante las fases del ciclo celular y aberraciones cromosómicas inducidas durante la anafase y la metafase.

La cebolla cumple un ciclo bienal, durante el primer año se forma el bulbo y durante el segundo florece. Después de cosechados los bulbos son seleccionados de acuerdo a las características de cada variedad (forma, tamaño y color) (Gaviola & Oliva, 1997).

El fotoperiodo es el factor más importante en la formación del bulbo, la bulbificación es inducida por la interacción entre la temperatura y el largo del día, las de día corto corresponden al tipo valencianita, las de día intermedio al tipo torrentina y las tardías al tipo valenciana (Silva, 2014).

En Argentina la cebolla (*Allium cepa*) se cultiva en San Juan, Mendoza y sur de Buenos Aires. Pertenece a la familia de las *Liliaceas* y comercialmente representa el 16% de las exportaciones de hortalizas.

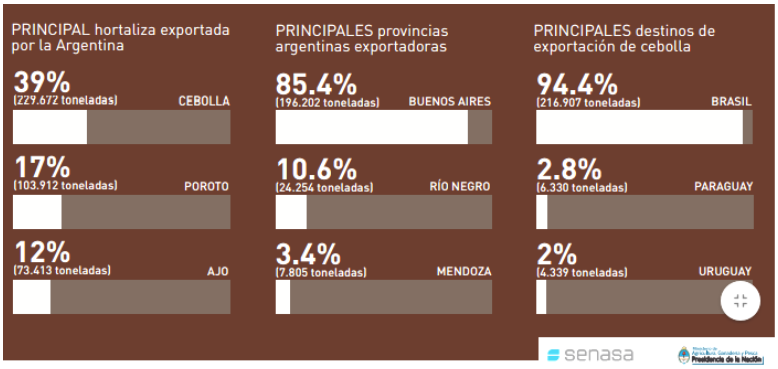

Figura 1: Porcentaje de Hortalizas y provincias exportadoras.

La producción de cebollas tempranas se ha mantenido estable durante la última década, mientras que las cebollas tardías registran un importante crecimiento a partir de 1988, debido al aumento en las exportaciones, especialmente al mercado brasilero. La mayor parte del área cultivada con cebollas de día largo está constituida por el cultivar "Valcatorce" perteneciente al tipo valenciana (Foschi et al., 2009).

Está adaptada a condiciones de día largo, los bulbos son redondos de tamaño mediano, con numerosas capas de catáfilas de color bronceado, pulpa firme, blanca y pungente. Es muy resistente a la floración prematura y al brotado en almacenaje. Se usa para consumo fresco, actualmente cerca del 80% de la superficie implantada con cebolla en Argentina se realiza con este cultivar (DNA - Dirección Nacional de Agroindustria, 2009).

En este trabajo de tesis se empleó la variedad valcatorce desarrollada por el INTA, debido a su alta disponibilidad, rendimiento y conservación post-cosecha (INTA, 2016).

Figura 2: *Allium cepa*, variedad Valcatorce**.**

4.1.2 Agentes químicos

Para el desarrollo de las investigaciones del siguiente trabajo de tesis se utilizaron los siguientes compuestos:

- Tebuconazol: laboratorio Sigma Aldrich, PESTANAL®, estándar analítico, número de CAS: 107534-96-3, fórmula química: C16H22CIN3O, peso molecular: 307.82

- Iprodione: laboratorio sigma aldrich, PESTANAL®, estándar analítico, numero de CAS: 36734-19-7, fórmula química: CL2C6H3N2C3H2O2CONHCH(CH3)2, peso molecular: 330.17

- Griseofulvina: (Sigma, CAS Number: 126-07-8). Se empleó como control positivo en los ensayos debido a sus efectos citotóxico y genotóxico en *Allium cepa* (Control positivo).

- Dimetil sulfóxido: Laboratorio Baker, numero de CAS: 67-68-5, fórmula química: C2H5SO, peso molecular: 78.13 (Solvente).

- Orceína acética (colorante).

- Ácido acético glacial: Laboratorio Merck, numero de CAS: 64-19-7, fórmula química CH3COOH/C2H4O2, peso molecular: 46.1 (Fijador).

- Los nanoparticulas de plata biosintetizadas (AgNPs) fueron suministradas y caracterizadas por el Laboratorio de Microbiología Industrial de la Universidad Nacional de San Luis, Argentina. Los organismos mediadores fueron *Aspergillus niger* (NRRL 1419), *Cryptococcus laurentii* (BNM 0525) y *Rhodotorula glutinis* (BNM 0524). Los métodos de síntesis y caracterización fueron los descritos en Fernández et al, 2016 e incluyeron el tamaño promedio y la naturaleza química de los compuestos que rodean las nanopartículas.

- Los AgNP biosintetizados de *Aspergillus niger* (AgNPs-An) mostraron un tamaño de 40 ± 5 nm y presentaron una alta concentración de proteínas y una baja concentración de carbohidratos. Los AgNP de *Cryptococcus laurentii* (AgNPs-Cl) y *Rhodotorula glutinis* (AgNPs-Rg) mostraron un tamaño de 35 ± 10 y 15 ± 8 nm respectivamente. En el caso de los AgNPs-Cl, los compuestos que rodean a los AgNPs fueron una alta concentración de carbohidratos tipo arabinogalactano y una baja concentración de proteínas. Mientras que para los AgNPs-Rg se detectó una alta concentración de carbohidratos tipo arabinan y galactoglucomanan.

Para todos los experimentos se utilizó agua corriente filtrada no clorada, como diluyente y control negativo.

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivo de los bulbos *Allium cepa*

Para los ensayos se eligieron bulbos de tamaño pequeño y uniforme, se indujo el crecimiento de las raíces adventicias que surgen del primordio ubicado en el disco inferior del bulbo mediante la hidratación del mismo.
Se sumergió la parte inferior de los bulbos en cada uno de los recipientes que contienen las sustancias a evaluar (y sus diferentes concentraciones).

Las raíces crecen en el medio líquido y su crecimiento esta mediado por dos procesos: La división celular que ocurre en la región meristemática de la raíz ubicada en el extremo distal con respecto al bulbo y la posterior elongación de las células que se originan en el meristemo dando lugar a una región contigua conocida como zona de elongación. En la región próxima al bulbo la raíz presenta células más diferenciadas.

La exposición se inicia luego de permitir el surgimiento de las raíces (longitud de 1cm aproximadamente) lo cual normalmente ocurre pasadas las 24 - 48 horas.
De forma preliminar a la exposición, a los bulbos se le retiraron los catáfilos exteriores y las raicillas del disco de crecimiento, fueron lavados y parcialmente sumergidos en tubos plásticos los cuales contenían agua filtrada no clorada con el fin de estimular el crecimiento de las raíces (24- 48 horas). Pasado este periodo se eligieron los bulbos que tuvieran raíces con una longitud entre 0.5 y 1 cm.

Para el crecimiento posterior de las raíces se implementó un diseño de 5 tubos de 50ml cada uno, con sus respectivas entradas de aire.

Figura 3: Montaje de ensayos *Allium Cepa*.

4.2.2 Condiciones del cultivo

Las condiciones de los ensayos se establecieron en base a la bibliografía consultada. Se instaló un sistema de suministro constante de aire y el tiempo de exposición se estableció en función al ciclo celular de las células meristemáticas en división de *Allium cepa*, se trabajaron dos tiempos 4 horas (Tiempo menor al que transcurre un ciclo celular) y 30 horas (Tiempo en el que ocurren aproximadamente dos ciclos celulares), a una temperatura de 25°C y un pH: 7.

4.2.3 Preparación de las soluciones (muestras y controles).

Todas las diluciones se realizaron con agua filtrada no clorada que se utilizó como control negativo.

IPRODIONE

Se utilizaron 150mg de Iprodione el cual fue diluido en 600ml para preparar la solución madre a partir de la cual se realizaron las siguientes diluciones [25], [50], [100], [250] µg/ml.

TEBUCONAZOL

Se utilizaron 18mg de iprodione el cual fue diluido en 600ml para preparar la solución madre a partir de la cual se realizaron las siguientes diluciones [1], [5], [10], [30] µg/ml.

NANOPARTICULAS

Las muestras de AgNPs de concentraciones conocidas se sometieron a ultrasonidos cada tres ciclos de 10 segundos con intervalos de enfriamiento. Se prepararon las siguientes diluciones AgNPs biosintetizados, AgNPs-An: [1] y [10] µg/ml; AgNPs-Cl: [0,01], [0,1] y [1] µg/ml y AgNPs-Rg: [0,01], [0,1] y [1] µg/ml.

GRISEOFULVINA

A partir de 500 mg de griseofulvina (Sigma, Número CAS: 126-07-8) diluida en 10ml de DMSO se preparó la solución madre para realizar las diluciones [200] y [300] µg/ml como controles positivos para los efectos de genotoxicidad y citotoxicidad.

4.2.4 Obtención de los preparados

ANALISIS DE GENOTOXICIDAD

Las raíces se colocan durante 10 min en una solución de ácido clorhídrico 1N, con el objetivo de disgregar la pared celular y permitir posteriormente el ingreso del colorante al interior de la célula. Al finalizar la digestión de la pared celular se separa el ápice de la raíz y se coloca sobre un portaobjetos con una gota de orceína acética.

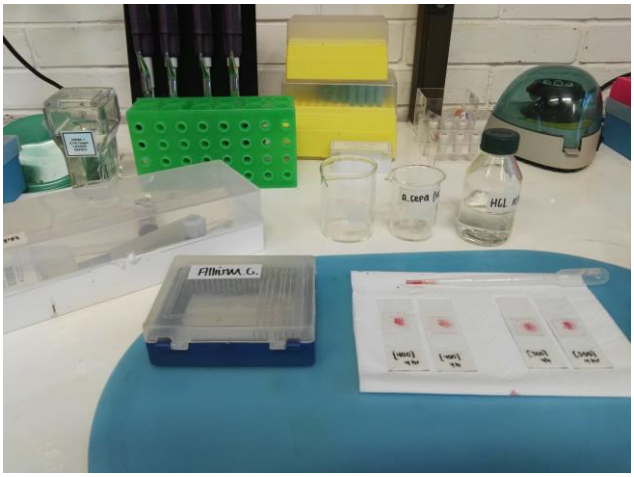

Figura 4: Montaje de láminas, Microscopio Leica DMLB.

Con una aguja de disección se disgrega el material y se coloca un cubre objetos aplicando presión, aplicando la técnica de aplastamiento. Para la observación de las células se utiliza un microscopio de campo claro en 400x y 1000x (Leica DMLB).

4.2.5 Evaluación del estrés oxidativo

Para conseguir los homogenatos se cortaron los ápices de las raíces, hasta obtener 200mg de tejido por cada determinación.

Los tejidos fueron colocados en tubos cónicos descartables de 2ml (Eppendorf, que fueron mantenidos en hielo constantemente) con buffer fosfato 50mM a pH: 7 contenido 1mM de EDTA. Como inhibidores de proteasas se utilizaron benzamidina 0.2mM y PMSF 0.5mM.

El tejido fue macerado durante 20 minutos y el extracto fue centrifugado (centrifuga refrigerada a 4 °C) a 8000rpm durante 20 minutos. Al sobrenadante se le agregaron inhibidores de proteasa benzamidina 0.2mM y fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 0.5mM. Los sobrenadantes se utilizaron como fuente para la determinación de la actividad de agentes antioxidantes catalasa (CAT) y glutatión (GSH) y del daño oxidativo por medición de malón dialdehído (MDH).

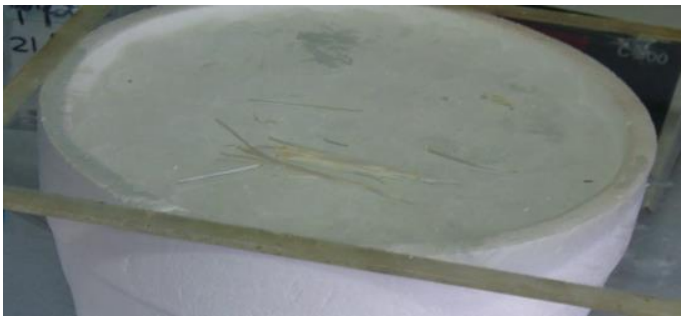

Figura 5: procesado de raíces en frio, para estudios de estrés oxidativo

Contenido de proteínas

El contenido de proteína soluble total fue medido por el método de Bradford que utiliza albúmina de suero bovino como patrón. Los resultados se expresaron como mg de proteína por ml. (BRADFORD, 1976)

Peroxidación lipídica

El nivel de peroxidación lipídica se midió según Marnet 1999, por la cuantificación de productos finales, específicamente el malondialdehído (MDA) (Marnett LJ., 1999).

Contenido reducido de glutatión

Los niveles de GSH se midieron siguiendo el Anderson en presencia de ácido. 5,5-ditiobis nitrobenzoico. Se utilizó una solución recién preparada de glutatión para generar una curva estándar. Los resultados se expresaron como nmol de GSH por mg de proteína. (Monostori et al., 2009)

La actividad de catalasa (EC 1.11.1.6) se midió como la disminución en concentración de H2O2 registrando la absorbancia a 240 nm. Los resultados se

expresaron como unidades CAT por mg de proteína. La unidad CAT se definió como la cantidad de enzima que transforma 1 mmol de H2O2 por min. (Aebi, 1984).

4.2.6 Evaluación de la genotoxicidad.

Una vez finalizada la exposición de las raíces se cortaron con una longitud aproximada de 2 cm desde el ápice y se fijaron en 3 partes de etanol absoluto y una parte de ácido acético, durante 48 horas. Posteriormente se transfirieron y se conservaron en una solución de etanol 70% hasta el momento de la elaboración de los preparados.

La respuesta genotóxica se midió a través de la cuantificación de los biomarcadores los cuales permiten indicar las alteraciones inducidas en el ciclo celular, daño cromosómico y anormalidades en la segregación de las cromátidas.

Los biomarcadores asociados son:

- Alteraciones del ciclo celular: inhibición del índice mitótico e índice de fases.
- Alteraciones en los índices de fase: se analizó la relación anafase/metafase.
- Se consideraron las anomalías de las mitosis: indicadoras de daño cromosómico o clastogénesis como fragmentos acéntricos, puentes anafásicos/telofásicos, anillos y extremos pegajosos e indicadoras de disrupción en la segregación de las cromátides: C-metafase, desordenes de las anafases (cromosomas rezagados o errantes, migraciones no sincronizadas de las cromátides), telofases multipolares.
- Las anormalidades de la interfase. Micronúcleos, células binucleadas, minicélulas, yemas nucleares fueron cuantificadas, aunque no se incluyeron en el análisis. Esto se debe a que son resultado de las anteriores y su inclusión interfiere con el análisis de las respuestas obtenidas en diferentes duraciones del ciclo celular

4.2.7 Determinación del índice mitótico y de fases

El índice mitótico (IM) se calculó como el número de células en división cada 1000 células observadas.

Los índices de fases (Profase, metafase, anafase, telofase) se calcularon como el número de células en cada fase / células totales en división. La relación metafase/ anafase y el índice de metafase se consideraron para analizar efectos en la dinámica de la segregación de las cromátides.

$$\text{Indice Mitotico} = \frac{\text{Numero de células en mitosis}}{\text{Numero total de celulas}} \times 100$$

$$\text{Indice de Fase} = \frac{\text{Numero de celulas en cada fase}}{\text{Numero de celulas en mitosis}} \times 100$$

$$\text{Relacion M/A} = \frac{\text{Numero de celulas en metafase}}{\text{Numero de celulas en anafase}}$$

4.2.8 Determinación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas

Anormalidades en anafase-metafase: se cuantificaron los indicadores de daño cada 500 células en anafases-metafases.

4.3 Análisis exploratorio y estadísticos de los datos

Para ambos análisis se utilizaron los programas R studio 3.3.6 (R Core Team 2019) y Graphpad prism 7 (GraphPad Software, Inc. 2016).

Se realizo un análisis exploratorio de los datos con el objetivo de visualizar las respuestas obtenidas por la exposición cada agente y a cada tiempo. Cuando los supuestos de normalidad y homocedasticidad se cumplieron se empleó ANOVA para las comparaciones de los datos del índice mitótico, índice de fases y de

anormalidades de la mitosis y la interfase para cada tratamiento que incluyo el agente, las concentraciones y los tiempos de exposición.

En caso contrario se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis. Se compararon los datos obtenidos en los diferentes tratamientos con respecto a los controles negativos mediante una prueba poshoc de Dunnet o Dunn según el caso.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Genotoxicidad

5.1.1 Iprodione - Análisis exploratorio

Los resultados provenientes de las células meristemáticas en raíces de *Allium cepa* expuestas a Iprodione (IP) indican que los valores del índice mitótico (IM) presentan un patrón de variación más marcado en las células expuestas a 30 hs (entre 1 y 2 ciclos de división). Además, en este grupo se observan valores de IM mayores a los valores control como respuesta a las concentraciones más bajas (Figura 6a).

Fig. 6 (a)

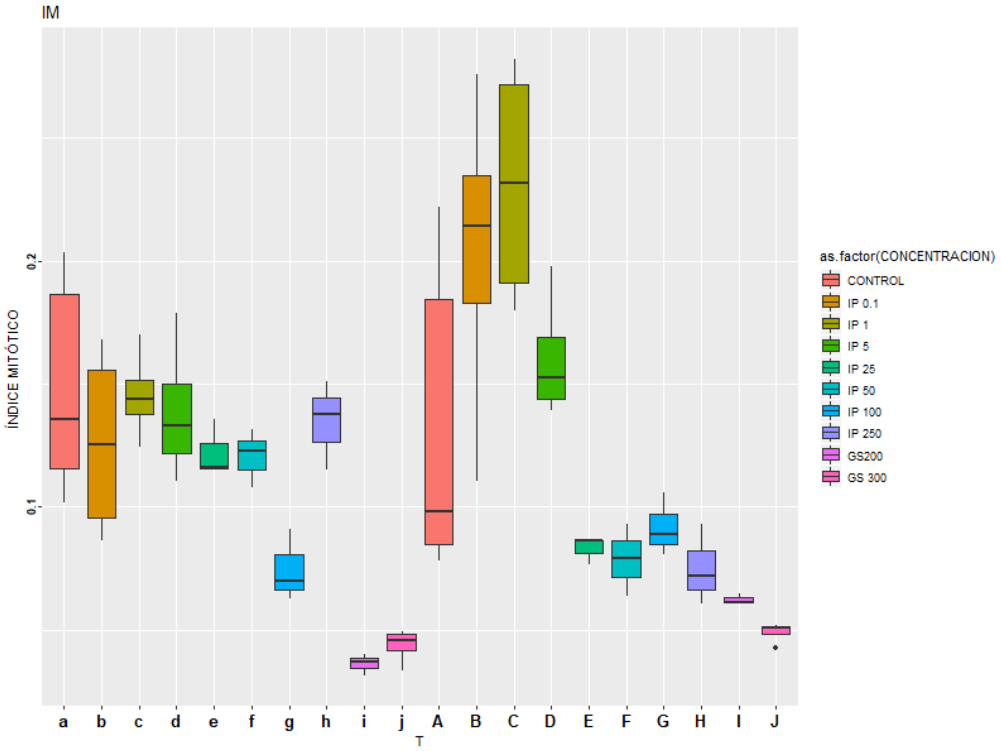

Fig. 6 (b)

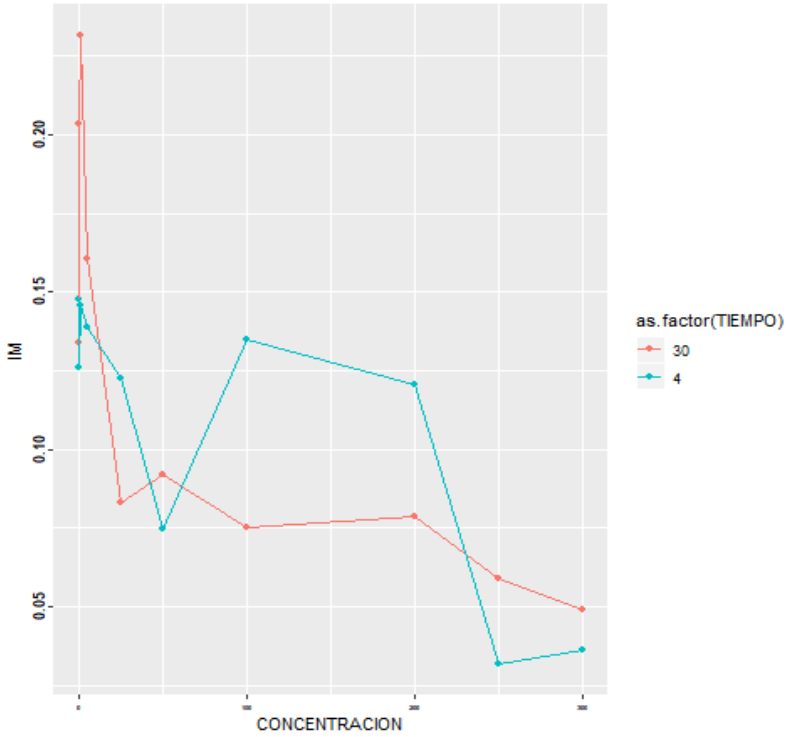

Figura 6 a: Distribución de valores de IM para los tratamientos con IP y controles a los 2 tiempos ensayados (a-j: 4hs, A-J: 30 hs). **b:** Patrones de respuesta para los valores promedio de IM en los 2 tiempos ensayados.

La relación anafase/metafase (RA) presenta importante variabilidad en ambos grupos mostrando una depleción en el grupo de células expuestas a IP durante 30 hs entre las concentraciones 50 y 200 µg/ml (Figura 7a). De acuerdo a lo observado dicha depleción se produce a expensas del aumento del índice de metafases (IMET) (Figura 8a).

Fig. 7 (a)

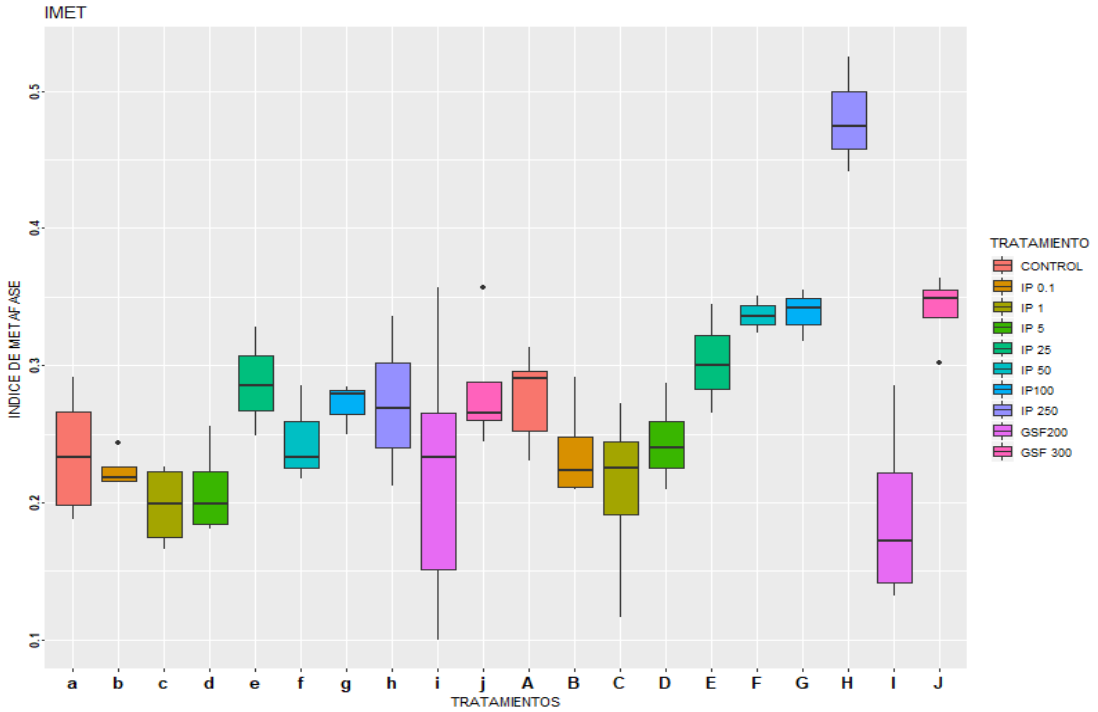

Fig. 7 (b)

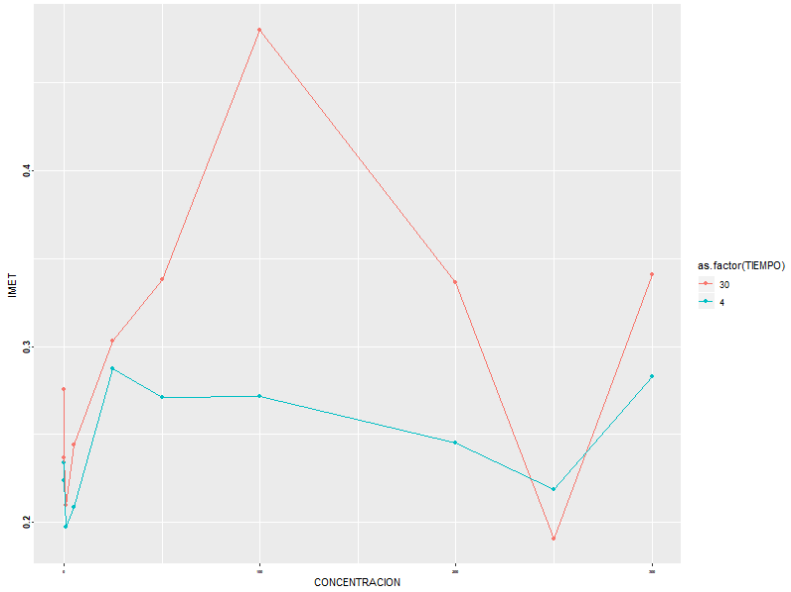

Figura 7 a: Distribución de valores de IMET para los tratamientos con IP y controles a los 2 tiempos ensayados (a-j: 4hs, A-J: 30 hs). **b:** Patrones de respuesta para los valores promedio de IMET en los 2 tiempos ensayados.

Fig. 8 (a)

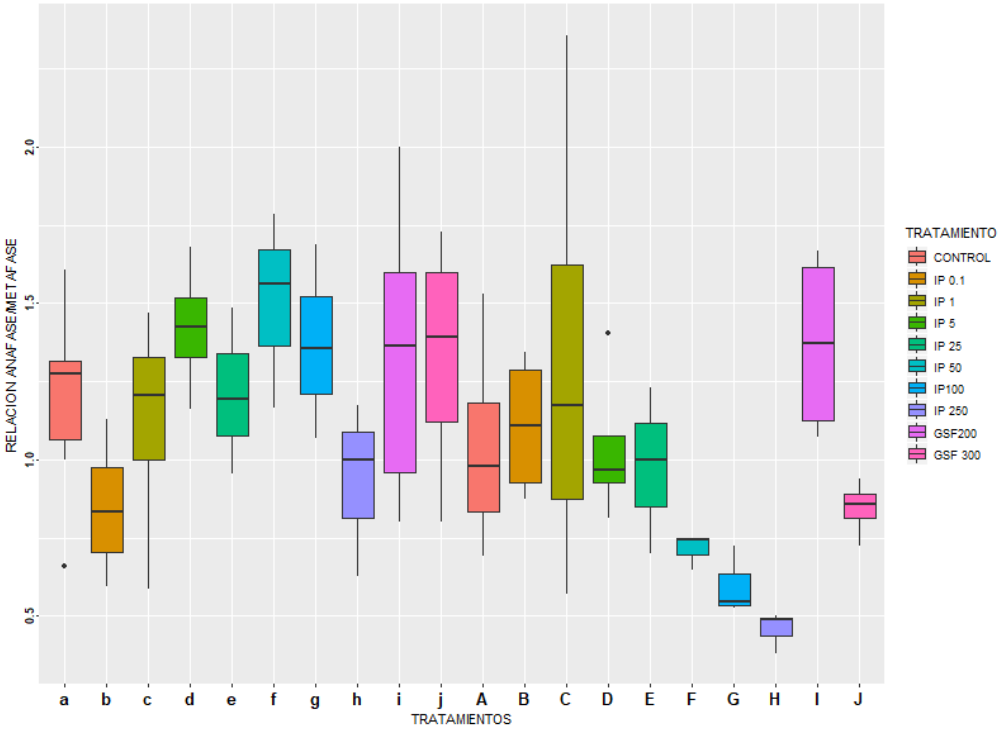

Fig. 8 (b)

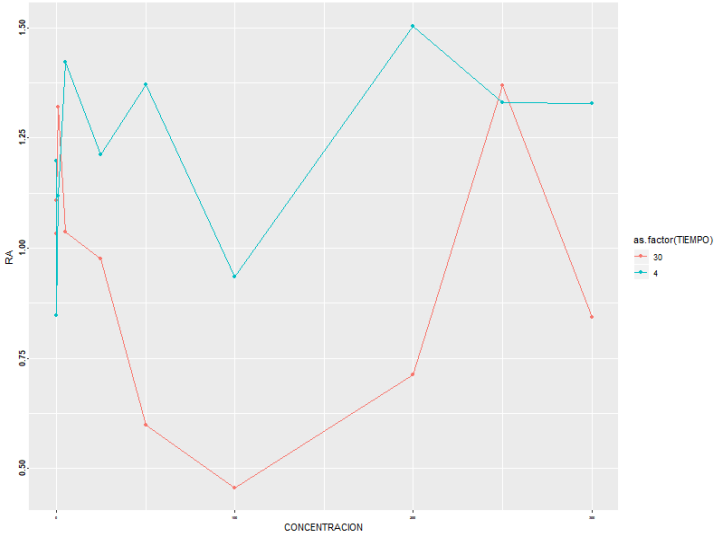

Figura 8 a: Distribución de valores de la relación anafase/ metafase para los tratamientos con IP y controles a los 2 tiempos ensayados (a-j: 4hs, A-J: 30 hs). **b:** Patrones de respuesta para los valores promedio de la relación anafase/ metafase en los 2 tiempos ensayados.

Los patrones de variación para cada parámetro estudiado en los 2 tiempo de exposición pueden visualizarse en los gráficos correspondientes (Figuras 6b-8b) indicando las interacciones entre los tratamientos y el tiempo de exposición, así como los rangos en los que se conservan dichos patrones

Si observamos el comportamiento de los Índice de fases en general, se observa que, para el tiempo de exposición de 4 horas, el ciclo celular en *Allium cepa* no se altera por la exposición a Iprodione en las condiciones de ensayo aplicadas en este trabajo de tesis. La frecuencia de las fases más abundantes varía dependiendo de la duración del ciclo. Teniendo en cuenta que la duración del ciclo celular en *Allium cepa* es de aproximadamente 13 horas, en el ensayo de exposición 4 horas donde no se alcanza a completar el ciclo, la fase más abundante fue anafase, comportándose de forma muy similar al control negativo (Figura 9).

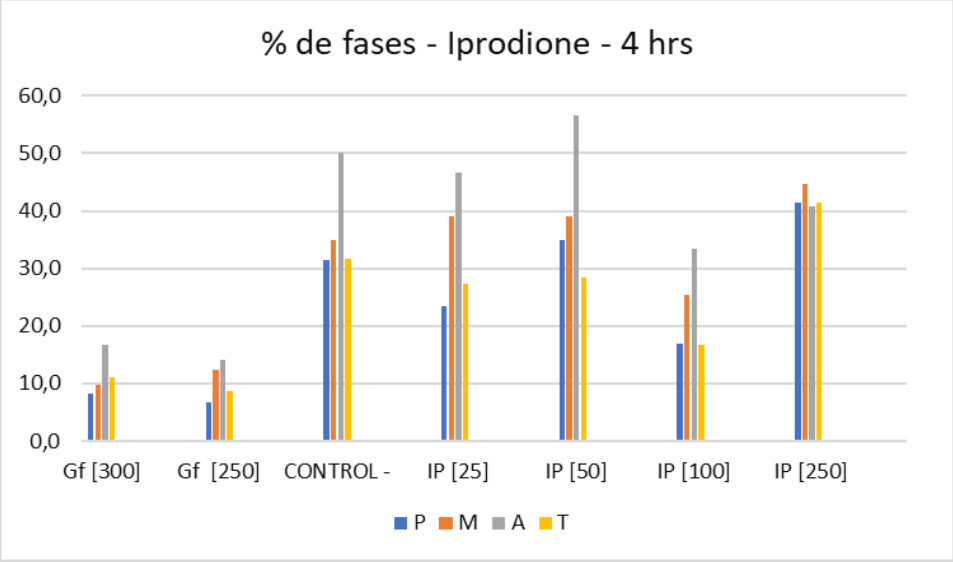

Figura 9 : Numero de fases en celulas meristematicas raices de *Allium cepa,* expuestas a diferentes concentraciones de Iprodione **(IP), 4 horas**. **P:** profase**, M:** metafase**, A:** anafase**, T: t**elofase**, Gf:** griseofulvina**.**

Para el tiempo de exposición de 30 horas, los valores correspondientes a los índices de fase, presentaron diferencias, comparados con lo observado en el control negativo (-) mostrando que el ciclo celular en *Allium cepa* se ve alterado por la exposición a Iprodione.

La fase más abundante fue la metafase, la misma se incrementa con el aumento de las concentraciones de iprodione evaluadas.

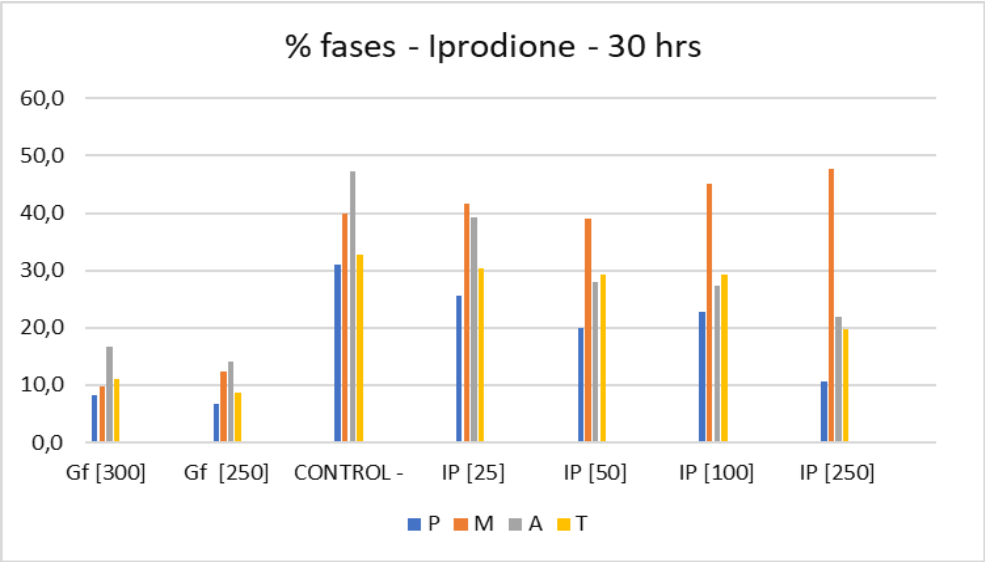

Figura 10 : Numero de fases en celulas meristematicas raices de *Allium cepa,* expuestas a diferentes concentraciones de Iprodione **(IP), 30 horas**. **P:** profase**, M:** metafase**, A:** anafase**, T: t**elofase**, Gf:** griseofulvina**.**

Las anomalías de la mitosis presentan un patrón de respuesta con un incremento no lineal con las concentraciones, para ambos tiempos de exposición, siendo más variable para la exposición más prolongada (Figura 11a).

Los patrones de variación para cada parámetro estudiado en los 2 tiempos de exposición son similares con poca o nula interacción entre los tiempos de exposición.

Fig 11 (a)

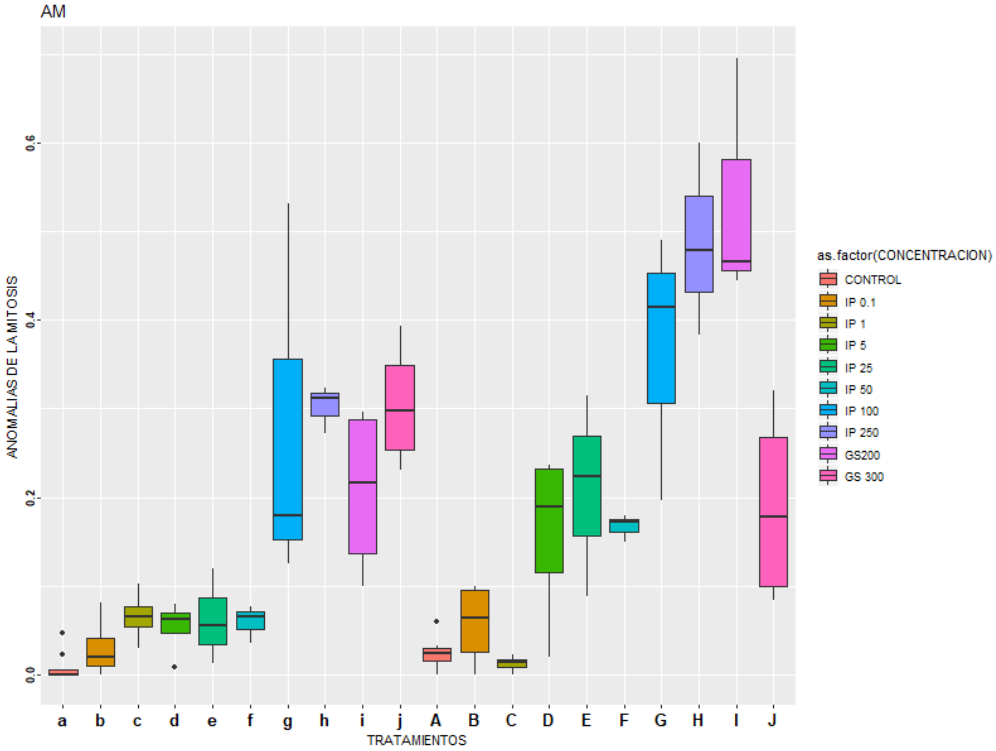

Fig 11 (b)

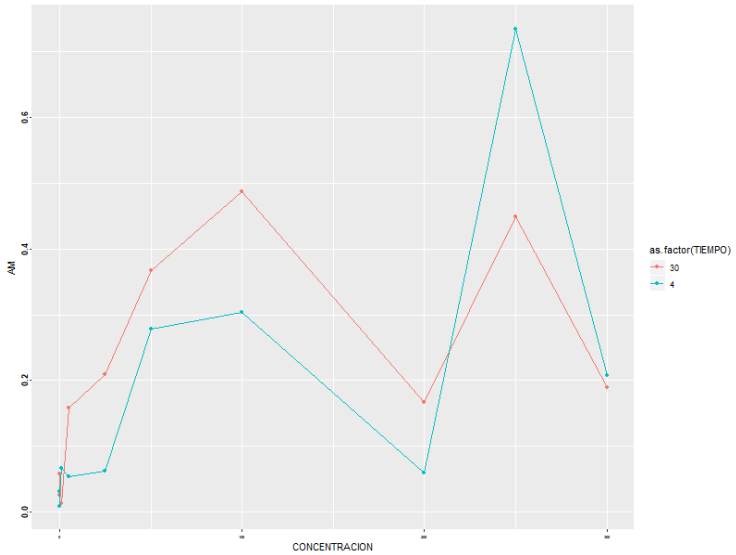

Figura 11. a: Distribución de valores de la AM para los tratamientos con IP y controles a los 2 tiempos ensayados (a-j: 4hs, A-J: 30 hs). **b:** Patrones de respuesta para los valores promedio de AM en los 2 tiempos ensayados.

Con respecto Al tipo de anomalías o aberraciones cromosómicas de la mitosis (AM), se observan diferencias en las proporciones entre las concentraciones de IP y entre IP y GSF (Figura 12).

Para el tiempo de exposición de 30 horas donde consideramos que ya transcurrió más de 1 ciclo celular, la presencia de aberraciones es mucho más frecuentes comparado con el control negativo, que para la exposición de 4 horas.

Se detectaron en gran proporción C-metafases y anafases desorganizadas presentes en todo el rango de concentraciones evaluadas [25 – 250 µg/ml], para ambos tiempos de exposición (Figuras 12).

Fig 12 (a)

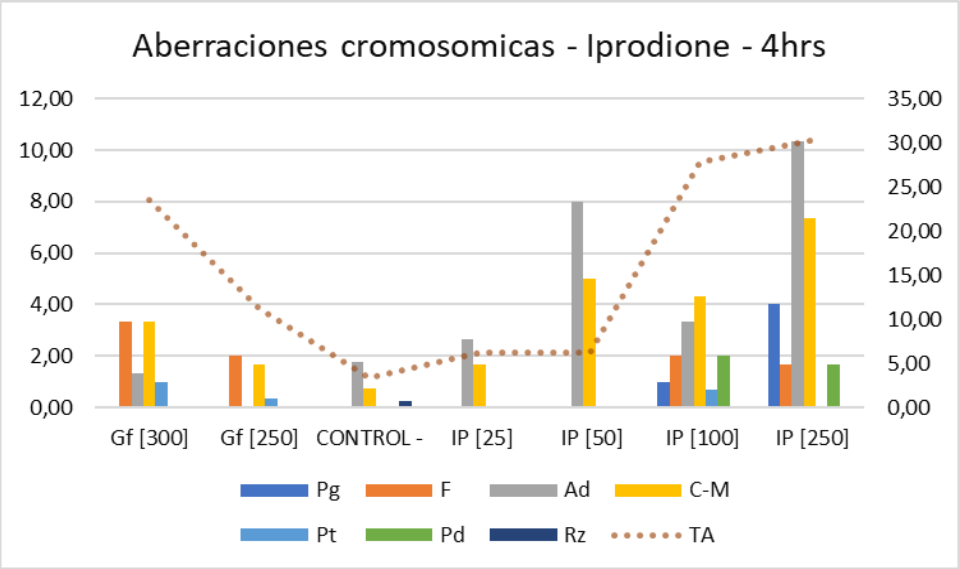

Fig 12 (b)

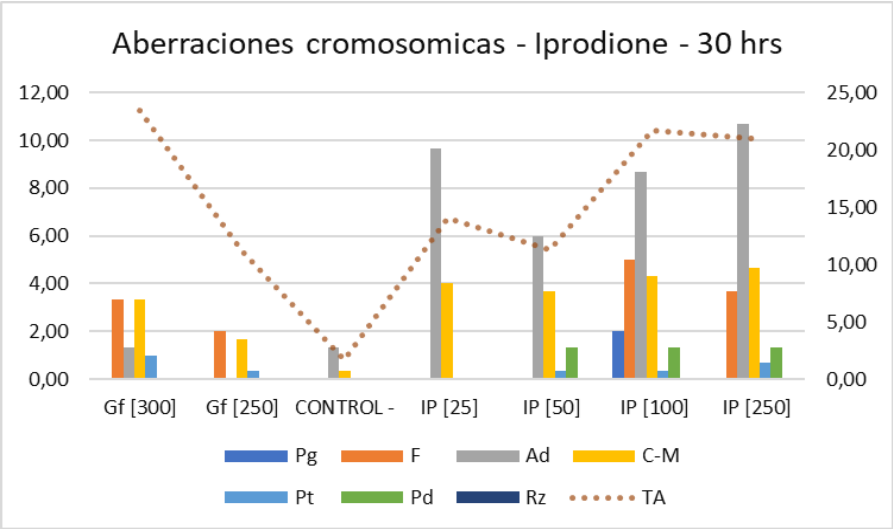

Figura 12: Aberraciones cromosomicas en celulas meristematicas en raices de *Allium cepa,* expuestas a diferentes concentraciones de Iprodione **a) 4 horas, b) 30 horas**. **Pg:** Extremos Pegoteados; **F:** Fragmentos; **Ad:** Anafases desorganizadas; **C-M:** C-metafases; **Pt:** puente; **Pd:** Poliploide, **Rz**: rezagado, **TA**: Total de aberraciones

Las anomalías cromosómicas detectadas tienden a estar relacionadas con problemas en la migración y segregación de las cromátidas, como las C-metafase o cromosomas errantes (Figura 21 a, b, e y f) lo cual podría indicar dificultades en la formación del huso mitótico. Para el tiempo de exposición 30 horas se identificaron puentes anafásicos y cromosomas pegoteados en las concentraciones [50] – [100] – [250] µg/ml (Figura 21 c y d).

Estas aberraciones cromosómicas estas asociadas o son indicios de rotura de la cromátida. Comparado ambos momentos de exposición se presentó un mayor número de anafases desorganizadas para 30 horas (presentes en todas las concentraciones evaluadas) y fragmentos en el rango [100] – [250] µg/ml.

5.1.2 Iprodione - Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó sobre los datos correspondentes a los siguientes parámetros : IM, AM, RA y IMET.

Los supuesto de normalidad y homocedasticidad de los residuos se cumplieron para los parámetros RA e IMET por lo que las comparaciones fueron realizadas con ANOVA. Mientras que para IM y AM se apico la prueba no parametrica Kruskal-wallis ya que no cumplian con el supuesto de homocedasticidad.

Los resultados de los análisis inidcan diferencias significativas para el IM entre los controles negativos y positivos, siendo las diferencias entre los tratamientos con IP no significativas respescto al control negativo ni entre los dos tiempos de exposcion. La comparacion entre los tratamientos fue significativa con respecto al control negativo para AM pero no hubo diferencias entre los tiempos de exposcion.

El parametro RA no arrojo diferencias significativas entre los tratamientos pero si entre los tiempos de exposcion mientras el tratamiento IP 250 y los tiempos de exposcion mostraron diferencias significativas para IMET .En la tabla 1 se resumen los analisis realizados y sus resultados

Prueba estadística	Parámetro	p-valor	Poshoc rel a C^-
KRUSKAL-WALLIS	IM e/ tratamientos	1.668e-09	GSF (todas las conc)
ANOVA	IM e/tiempo de exposición	0,196	-
KRUSKAL-WALLIS	AM e/ tratamientos	1.506e-09	GSF IP (todas las conc)
KRUSKAL-WALLIS	AM e/tiempo de exposición	0.3308	-
ANOVA	RA e/ tratamientos	0.07073	
ANOVA	RA e/tiempo de exposición	0.00443 **	-

ANOVA	IMET e/ tratamientos	5.22e-08 ***	IP [250]
KRUSKAL-WALLIS	IMET e/ tiempo de exposición	0.00245**	-

Tabla 1: **RA**; relacion anafase/metafase, **AM** Anormalidads mitoticas, **IMET** indice metafase.

5.1.3 Tebuconazol - Análisis exploratorio

El análisis descriptivo muestra que la exposición de las células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a concentraciones crecientes de tebuconazol (TBZ) produjo una disminución en el índice mitótico (IM) con respecto al control negativo en ambos tiempos de exposición (Figura 13 a).

Fig 13 (a)

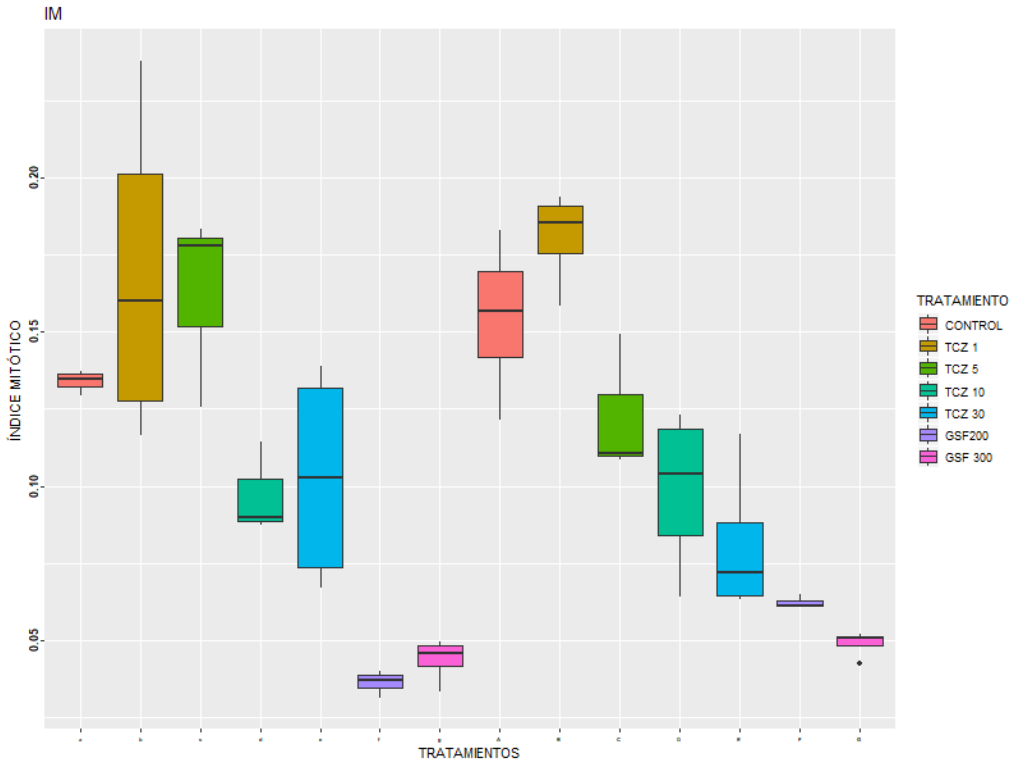

Fig 13 (b)

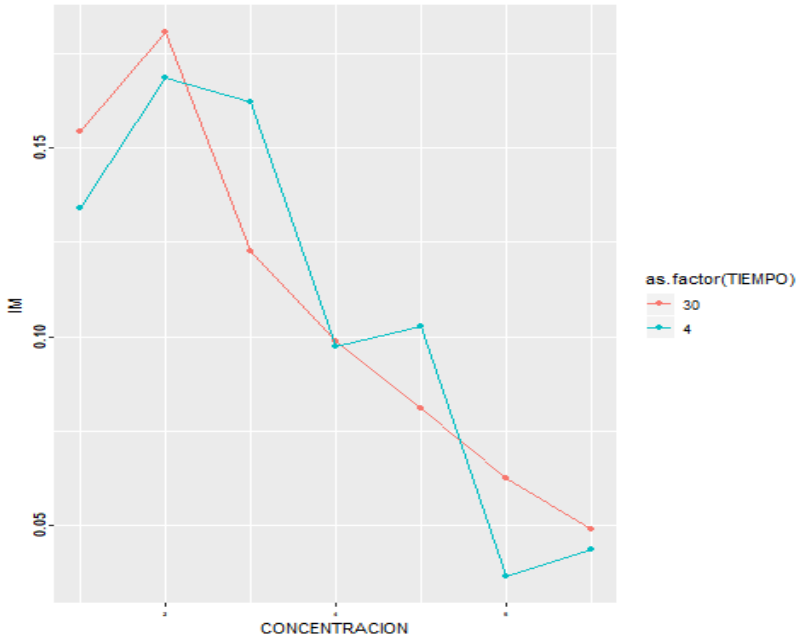

Figura 13. a: Distribución de valores de la IM para los tratamientos con TCZ y controles a los 2 tiempos ensayados (a-g: 4hs, A-G: 30 hs). **b:** Patrones de respuesta para los valores promedio de IM en los 2 tiempos ensayados.

Mientras que con 30 horas de exposición los valores de IM son menores que el control desde la concentración [5 µg/ml] en adelante, para el tiempo de 4 horas la disminución del IM comienza a hacerse notoria a partir de la concentración [10 µg/ml].

Al analizar los patrones de repuesta obtenidos para la relación anafase/ metafase y para el índice de metafases es posible observar un efecto de la exposición tanto a TCZ como al control positivo, GSF. Valores disminuidos en el Índice metafase están asociado con la inhibición del IM mientras que el incremento en dicho valor junto con la disminución en los valores de la relación A/M indica detención del ciclo en metafase, posiblemente debido al punto de control en esa instancia del ciclo celular. (Figuras 13 a y 14 a).

Fig 14 (a)

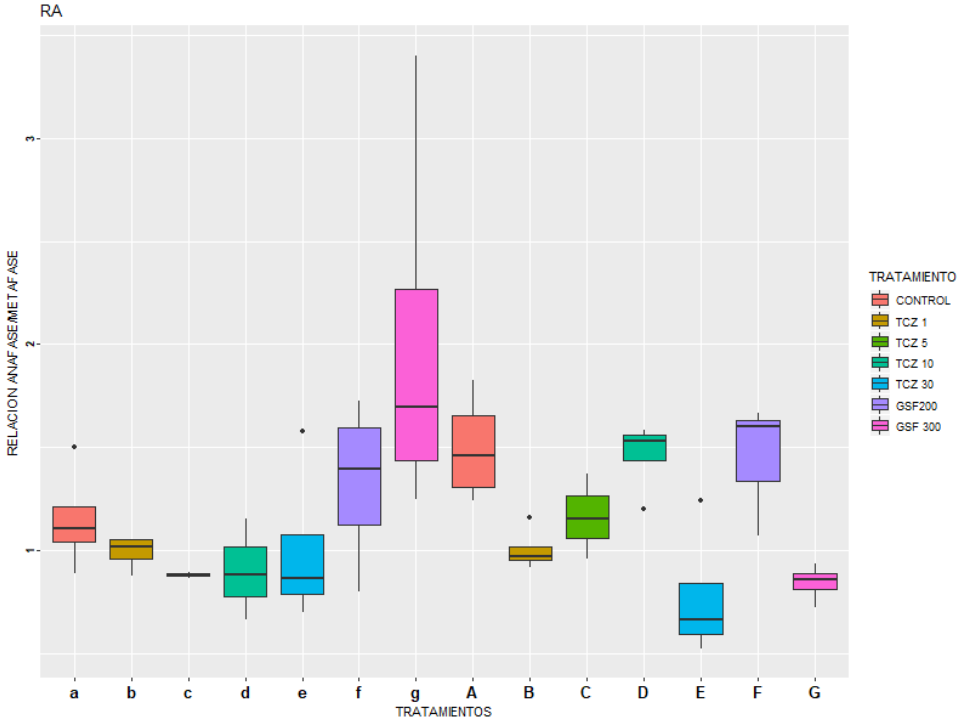

Fig. 14 (b)

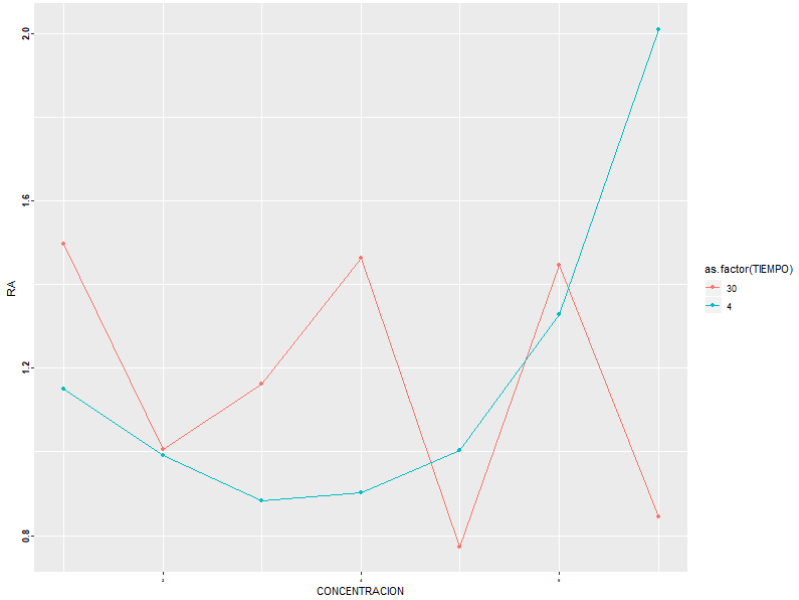

Figura 14. a: Distribución de valores de la relación anafase/ metafase para los tratamientos con TCZ y controles a los 2 tiempos ensayados (a-g: 4hs, A-G: 30 hs). **b:** Patrones de respuesta para los valores promedio de la relación anafase/ metafase en los 2 tiempos ensayados.

Fig. 15 (a)

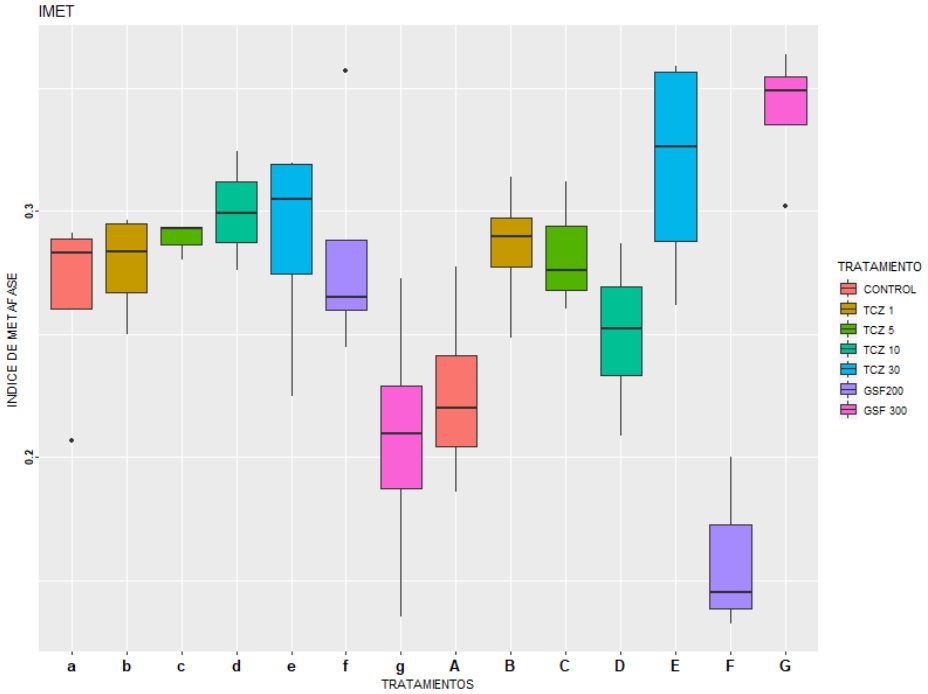

Fig.15 (b)

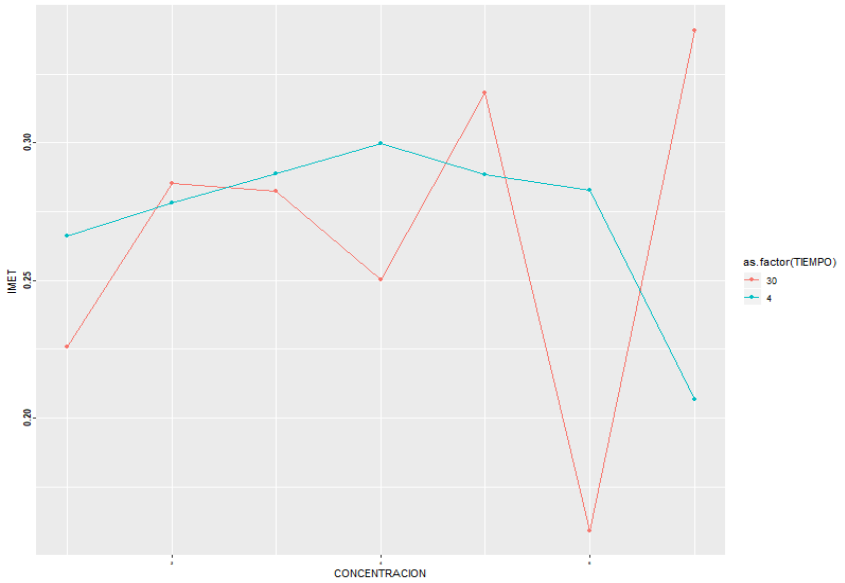

Figura 15. a: Distribución de valores de la IMET para los tratamientos con TCZ y controles a los 2 tiempos ensayados. **b:** Patrones de respuesta para los valores promedio de IMET en los 2 tiempos ensayados (a-g: 4hs, A-G: 30 hs).

Al analizar el porcentaje de las células en mitosis respecto de las totales y diferenciando las fases puede observarse que la exposición a tebuconazol interfiere en el ciclo celular de las células meristemáticas de *Allium cepa* disminuyendo las células que ingresan a la mitosis y en algunos casos retrasando el avance de la misma entre la metafase y la anafase.

Para la exposicion a 4 horas, la respuesta manifiesta una caida de la mitosis comparado con el control negativo en la concentracion [10 µg/ml] y [30 µg/ml]. Para el momento de evaluación de 30 horas se observa una relación inversamente proporcional entre la frecuencia de células en mitosis y el aumento de las concentraciones evaluadas de TCZ. La relación entre las fases se encuentra alterada respecto del control negativo y entre las concentraciones de TCZ para ambos tiempos de exposición.

Fig 16 (a)

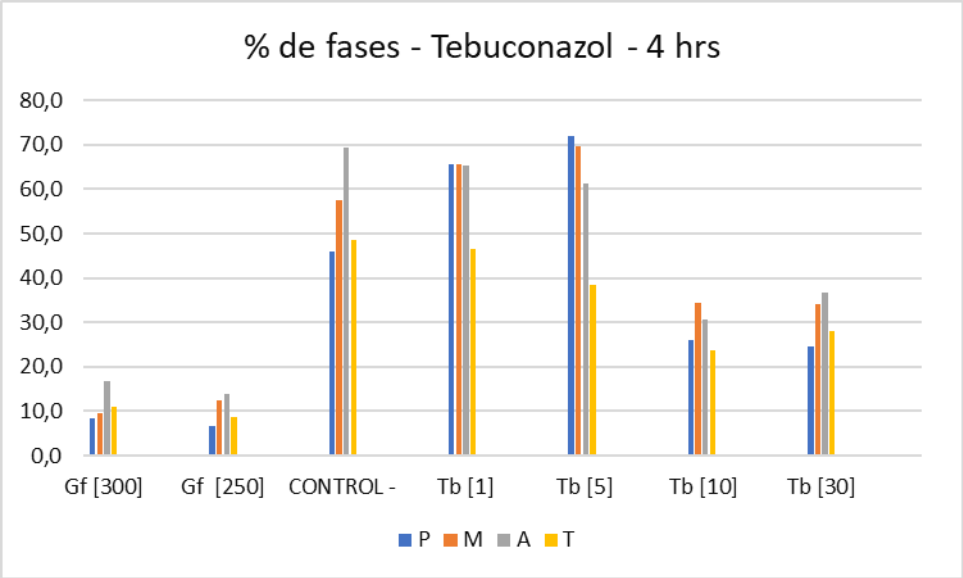

Fig 16 (b)

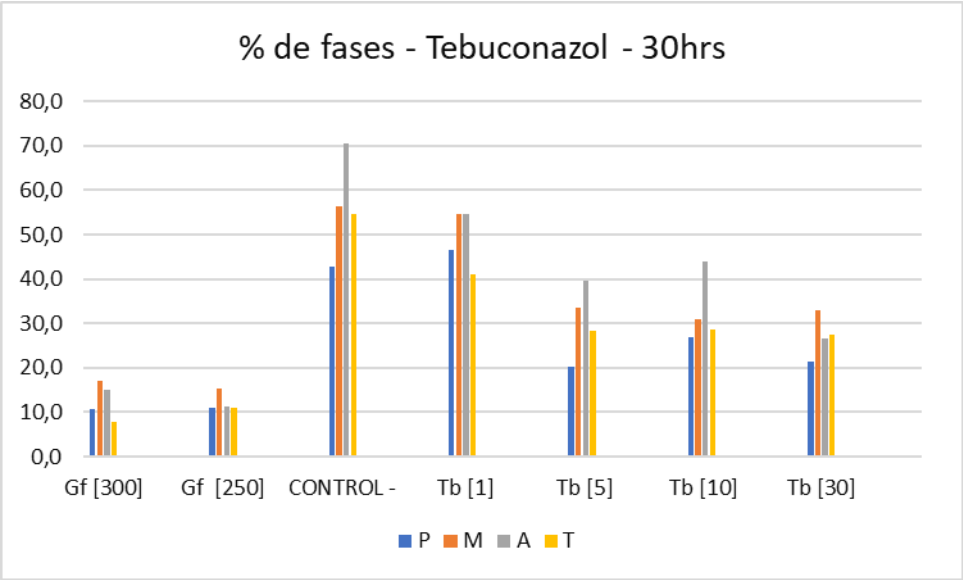

Figura 16: Numero de fases en celulas meristematicas raices de *Allium cepa,* expuestas a diferentes concentraciones de Tebuconazol **(TCZ), a) 4 horas,b) 30 horas**. **P:** profase**, M:** metafase**, A:** anafase**, T: t**elofase**.**

Los resultados obtenidos en el análisis de las aberraciones cromosómicas en células meristemáticas de *Allium cepa*, muestra que las concentraciones de TBZ evaluadas inducen aberraciones cromosómicas en anafase-metafase comparadas con el control negativo.

La exposición de las células meristemáticas de *Allium cepa* a diferentes concentraciones de tebuconazol mostro valores superiores al control para la formación de anormalidades mitóticas en todas las concentraciones ensayadas. La respuesta a 4 hs de exposición muestra una relación concentración efecto de tipo lineal mientras que la respuesta después de 30 hs no presenta el mismo patrón.

Fig 17 (a)

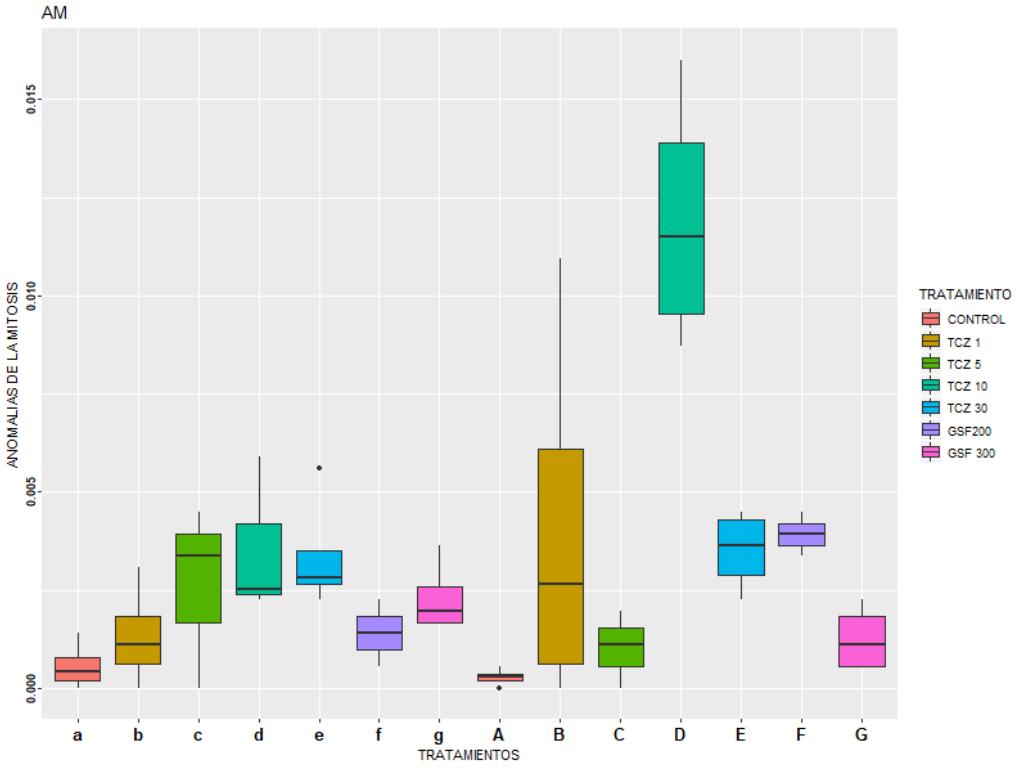

Fig 17 (b)

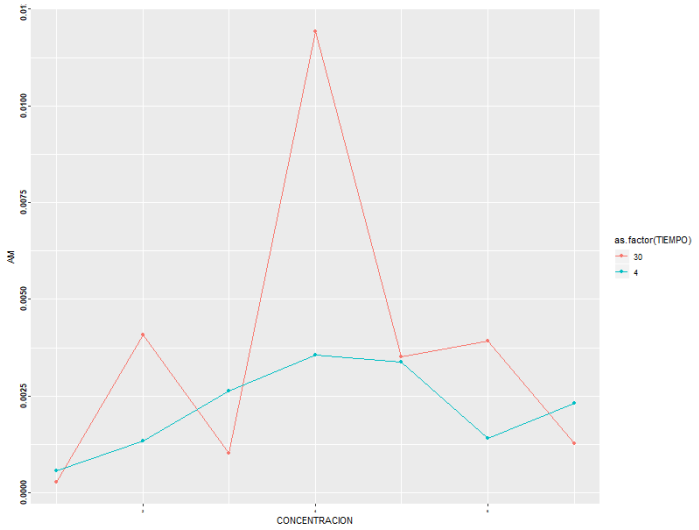

Figura 17. a: Distribución de valores de AM para los tratamientos con TCZ y controles a los 2 tiempos ensayados. **b:** Patrones de respuesta para los valores promedio de AM en los 2 tiempos ensayados (a-g: 4hs, A-G: 30 hs).

La comparación de los patrones de respuesta de los parámetros analizados muestra las interacciones entre las diferentes concentraciones y los tiempos de exposición. (Figuras 13b-17b)

En concordancia con los resultados obtenidos en la relación anafase / metafase, la cuantificación de cada tipo de aberración o anomalía cromosómica de la mitosis permite observar que las aberraciones cromosómicas detectadas con mayor frecuencia y abundancia (anafases desorganizadas y c-metafases) están asociadas con dificultades en la migración y segregación de las cromátidas, y en menor frecuencia puentes y poliploides (Figura 18).

Fig 18 (a)

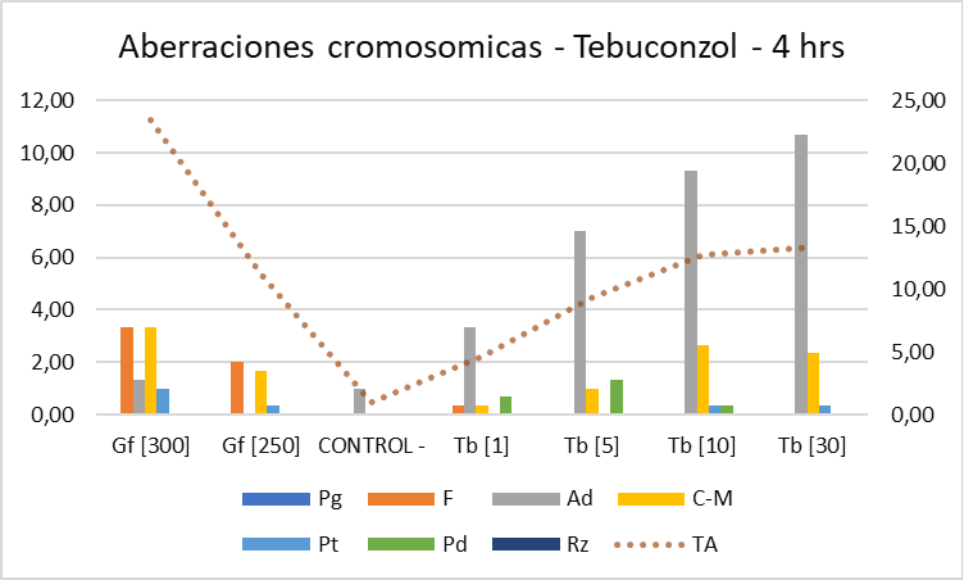

Fig 18 (b)

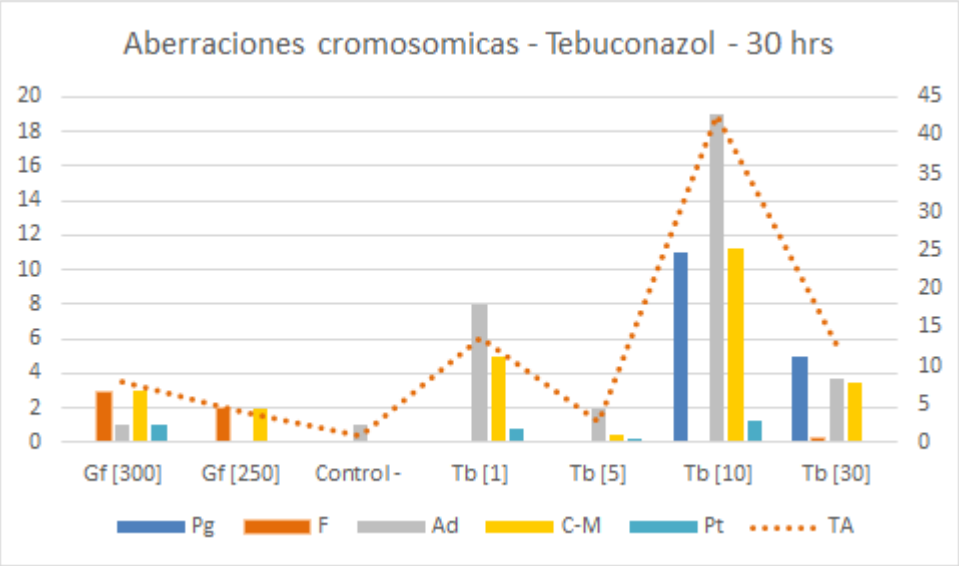

Figura 20 : Aberraciones cromosomicas en celulas meristematicas en raices de *Allium cepa,* expuestas a diferentes concentraciones de Tebuconazol **(Tb), 4 horas**. **Pg:** Pegoteados; **F:** Fragmentos; **Ad:** Anafases desorganizadas; **C-M:** C-metafases; **Pt:** puente; **Pd:** Poliploide, **Rz**: rezagado y **TA**: Total de aberraciones.

5.1.4 Tebuconazol - Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó sobre los datos correspondentes a los siguientes parámetros : IM, AM, AR y IMET.

Los supuesto de normalidad y homocedasticidad de los residuos no se cumplieron por lo que las comparaciones se realizaron con la prueba no parametrica Kruskal-Wallis. Los resultados inidcan diferencias significativas para el IM entre los controles negativos y positivos, siendo las diferencias entre los tratamientos con TCZ no significativas respecto al control negativo ni entre los dos tiempos de exposcion.

La comparacion entre los tratamientos con TCZ y GSF 200 µg/ml fue significativa con respecto al control negativo para AM pero no hubo diferencias entre los

tiempos de exposcion. En la tabla 2 se resumen los analisis realizados y sus resultados

Prueba estadística	Parámetro	p-valor	Poshoc rel a C-
KRUSKAL-WALLIS	IM e/ tratamientos	2.512e-07***	GSF (200-300 µg/ml)
	IM e/tiempo de exposición	0.6473	-
	AM e/ tratamientos	0.0004382***	GSF (200 µg/ml) TCZ (15_30 µg/ml)
	AM e/tiempo de exposición	0.4038	-
	RA e/ tratamientos	0.059	-
	RA e/tiempo de exposición	0.6277	-
	IMET e/ tratamientos	0.1534	
	IMET e/ tiempo de exposición	0.8476	-

Tabla 2: **RA**; relacion anafase/metafase, **AM** Anormalidads mitoticas, **IMET** indice metafase.

5.1.5 Nanopartículas de Plata (AgNPs) - Análisis exploratorio

La comparación de los valores de IM obtenidos por exposición a las AgNPs y GSF con los obtenidos por exposición al control negativo, muestra que las AgNPsAn y GSF. producen inhibición de la mitosis para ambos tiempos de exposición mientras que AgNPsCl y AgNPsRg estimulan la división celular cuando la exposición es de 4 hs pero se acercan a los valores control en las células expuestas a de 30 hs. (Figura 17 a).

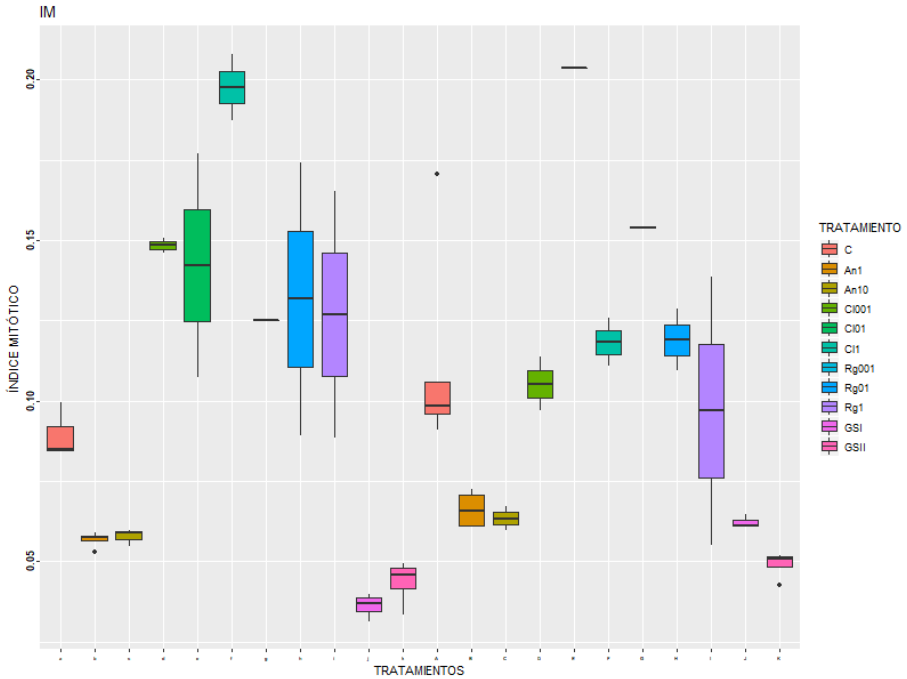

Figura 19. Distribución de valores de IM para los tratamientos con AgNPs y controles a los 2 tiempos ensayados (a-k: 4hs, A-K: 30 hs).

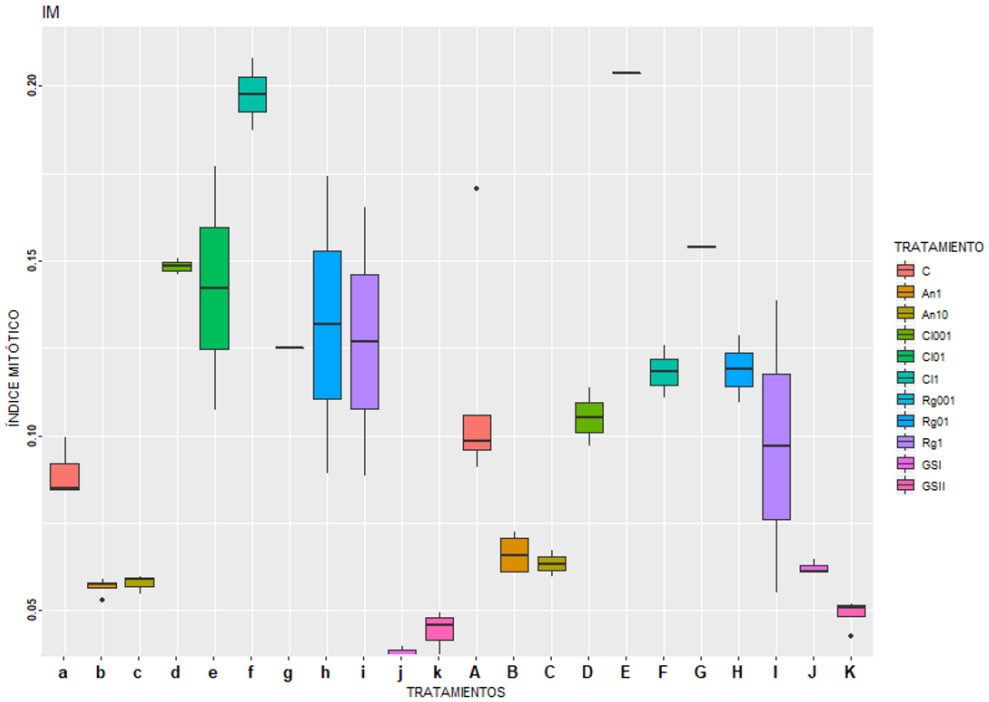

Figura 20: Distribución de valores de la relación anafase/metafase para los tratamientos con AgNPs y controles a los 2 tiempos ensayados (a-k: 4hs, A-K: 30 hs).

Los parametros relacion anafase/ metafase e indice de metafase muestran que las metafases estan aumentadas para AgNPAn en ambos tiempos de exposcion y estan disminuidas para AgNPsCl, AgNPsRg y GSF, con 4 hs de exposición, mientras que a las 30 hs los valores se acercan a los valores control excepto para la exposición a AgNPsRg 1µg/ml y GSF 300 µg/ml en las que se observa que es superior, mientras que la exposición a GSF 200 µg/ml incrementa los valores de IMET.

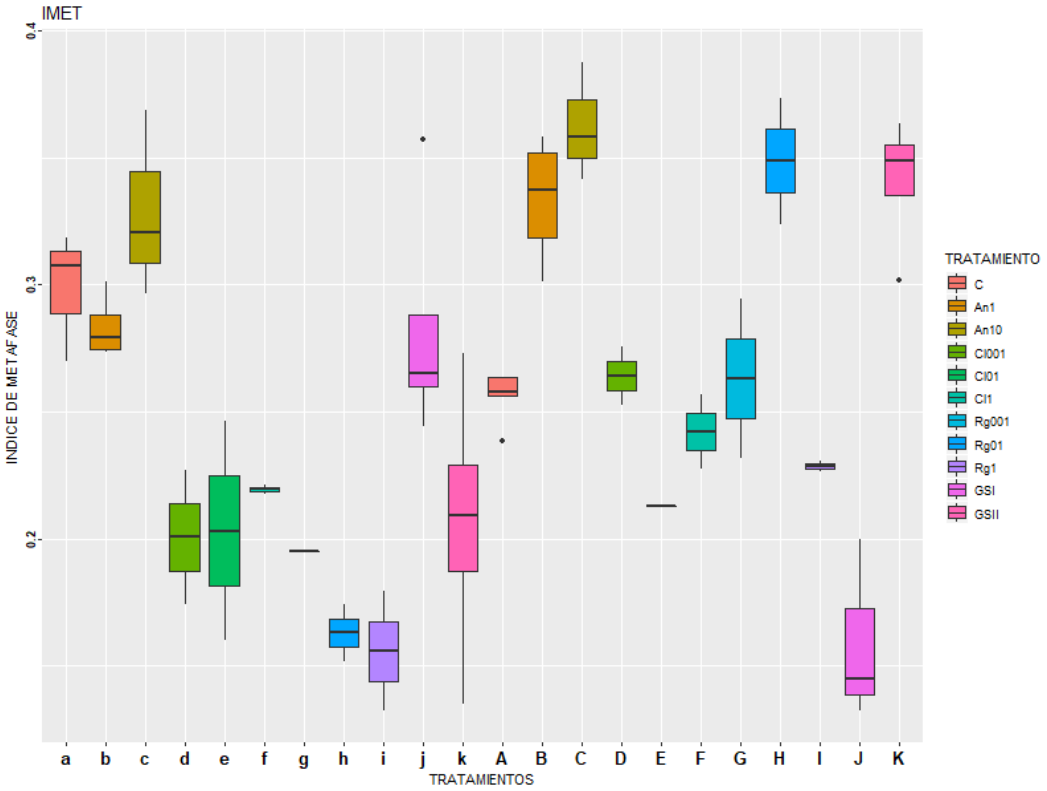

Figura 21: Distribución de valores de la IMET para los tratamientos con AgNPs y controles a los 2 tiempos ensayados(a-k: 4hs, A-K: 30 hs).

La relación anafase/ metafase permiten inferir que la respuesta temprana de los valores de IM para las células expuestas a AgNPsCl y AgNPsRg son superiores a expensas de un detenimiento de las células en metafase.

Mientras que después de 30 hs de exposición, los valores de IM cercanos al valor del control con valores de IMET superior y de A/M inferior sugiere que las mismas se mantienen más tiempo en metafase que en anafase, pero manteniendo la

dinámica de proliferación. Este patrón difiere del obtenido por exposición al control positivo GSF 300 µg/ml en el que la inhibición del IM se produce con detención de las células en metafase con caída de la dinámica de proliferación.

Las anomalías de la mitosis se muestran aumentadas respecto al control negativo para la exposición a las AgNPsAn y para GSF mientras que AgNPsCl y AgNPsRg inducen baja frecuencia de anomalías a las 4 hs de exposición y casi nula a las 30 hs de exposición (Figura 22)

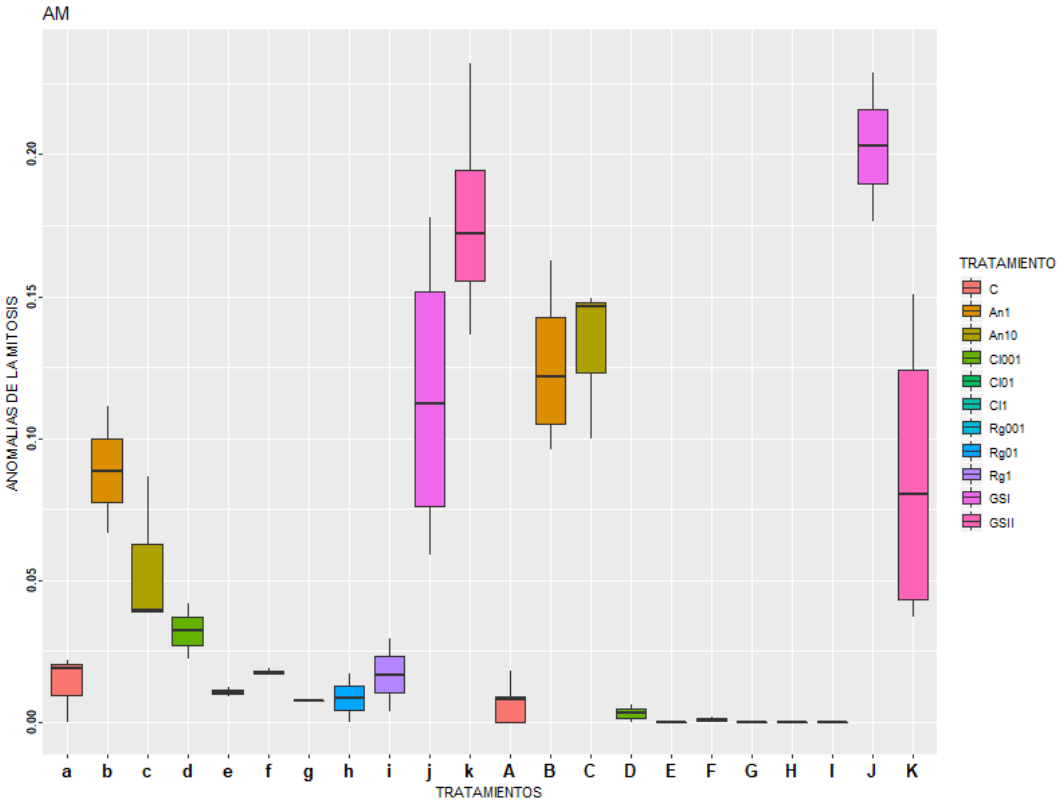

Figura 22: Distribución de valores de AM para los tratamientos con AgNPs y controles a los 2 tiempos ensayados (a-k: 4hs, A-K: 30 hs).

Las aberraciones cromosómicas más frecuentes, están relacionadas con efectos segregacionales caracterizados por anafases desorganizadas y C- metafases y en menor frecuencia cromosomas rezagados y puentes, para ambos tiempos de exposición 4 y 30 horas.

Para ambos momentos del ciclo celular evaluados, las aberraciones más abundantes fueron los anafases desorganizados y las c-metafases, y el total de aberraciones más alto se obtuvo en el conteo del control positivo griseofulvina.

Fig 23 (a)

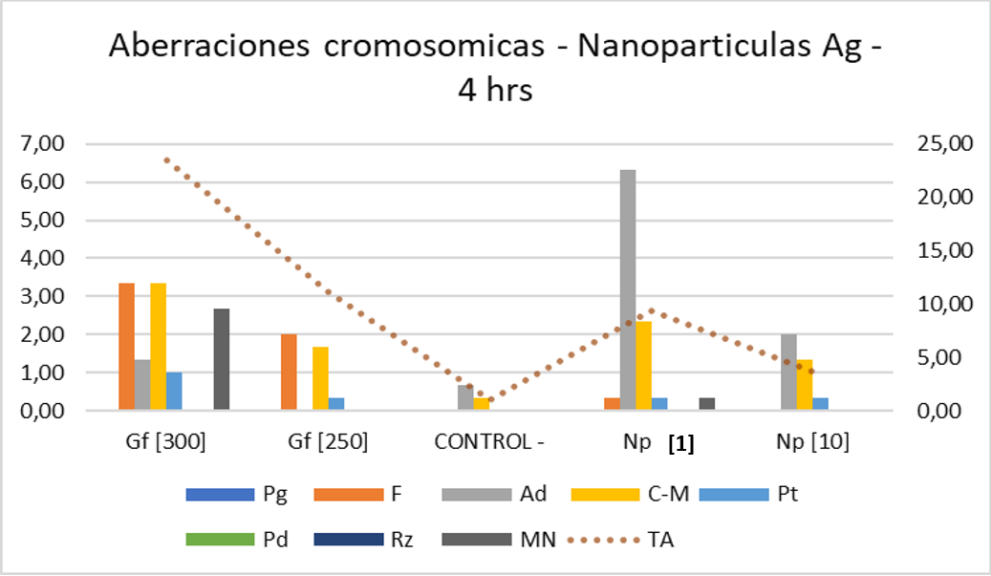

Fig 23 (b)

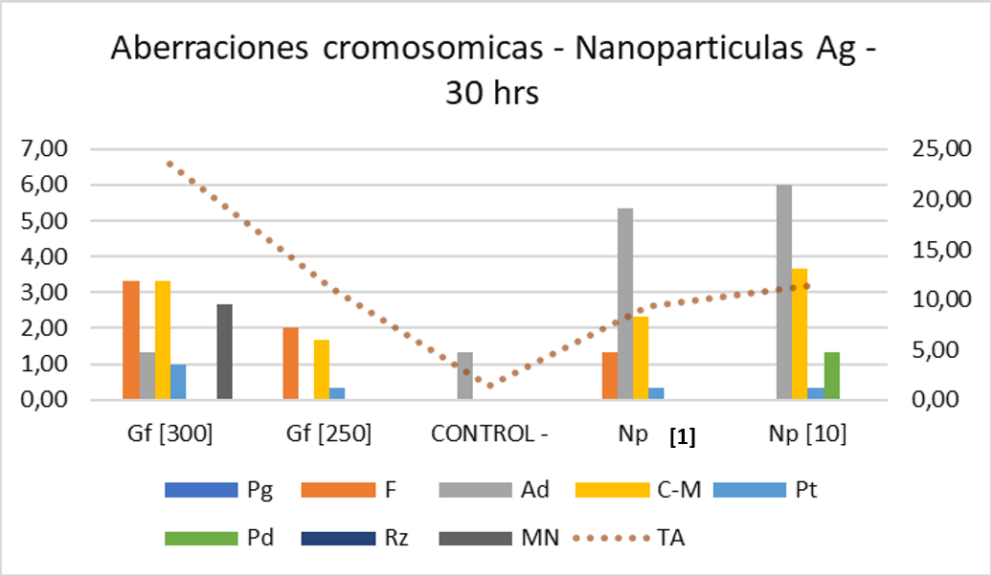

Figura 23 : Aberraciones cromosomicas en celulas meristematicas en raices de *Allium cepa,* expuestas a diferentes concentraciones de Nanoparticulas de Ag **(Np), a) 4 horas, b) 30 horas**. **Pg:** Pegoteados; **F:** Fragmentos; **Ad:** Anafases desorganizadas; **C-M:** C-metafases; **Pt:** puente; **Pd:** Poliploide, **Rz**: rezagado, **Mn**: micronúcleos y **TA**: Total de aberraciones.

Para el tiempo de 4 horas las aberraciones fueron más abundantes en la concentración evaluada más baja de AgNPs (Figura 23 a).
Mientras que para el tiempo 30 horas la abundancia de aberraciones fue bastante similar en ambas concentraciones evaluadas (Figura 23 b).

5.1.6 Nanopartículas de Plata (AgNPs) - Análisis estadístico

Los supuesto de normalidad y homocedasticidad de los residuos no se cumplieron por lo que las comparaciones se realizaron con la prueba no parametrica Kruskal-wallis. Los resultados inidcan diferencias significativas para el IM entre los controles negativos y las AgNPsAn y las concetraciones de GSF, sin diferencias entre los dos tiempos de exposcion.

La comparacion entre los tratamientos con AgNPsAn y GSF 200 µg/ml y el control negativo fue significativa para AM pero no hubo diferencias con AgNPsRg y AgNPsCl. En la tabla 3 se resumen los analisis realizados y sus resultados .

Prueba estadística	Parámetro	p-valor	Poshoc rel a C^-
KRUSKAL-WALLIS	IM e/ tratamientos	9.404e-07***	GSF (todas las conc)
	IM e/tiempo de exposición	0.231	-
	AM e/ tratamientos	0.0003438***	GSF (200 µg/ml) AgNPsAn(1-10 µg/ml)
	AM e/tiempo de exposición	0.1551	-
	RA e/ tratamientos	0.1925	-
	RA e/tiempo de exposición	0.004469**	-

IMET e/ tratamientos	0.00473**	-
IMET e/ tiempo de exposición	0.04373	-

Tabla 3 : **RA**; relacion anafase/metafase, **AM** Anormalidads mitoticas, **IMET** indice metafase.

Las anomalías cromosómicas observadas en los ensayos se ejemplifican en la figura 24 a través de fotos tomadas en la observación al microscopio óptico

5.2 Griseofulvina: control positivo

Es interesante destacar que los resultados obtenidos para GSF fueron los esperados para un control positivo. Las células meristemáticas sometidas a tratamiento con griseofulvina mostraron varios tipos de aberraciones asociadas tanto a la ruptura de cromatina y a la disrupción microtúbulo, La GSF es una sustancia derivada de la coumarina, utilizada como agente antifúngico y que es comúnmente utilizada como control positivo debido a su acción sobre el huso mitótico induciendo c-metafase, desorganización del huso mitótico y poliploidía.

Entre los mecanismos que se podrían verse afectados por agentes disruptores de los microtúbulos se encuentran el balance entre el ensamblaje y desensamblaje de los monómeros de tubulina (Cassimeris *et al*., 1988). La inestabilidad dinámica de los microtúbulos en metafase-anafase (Taylor *et al*., 2004) y la regulación y control de la transición metafase-anafase de los complejos proteicos (Meraldi et al., 2004).

Como puede observarse en los resultados, el IM obtenido por el análisis de células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a [300 µg/ml] de griseofulvina muestra valores que indican toxicidad mitótica, mientras que para la exposición a 200µg/ml los valores son compatibles con la evaluación genotóxica.

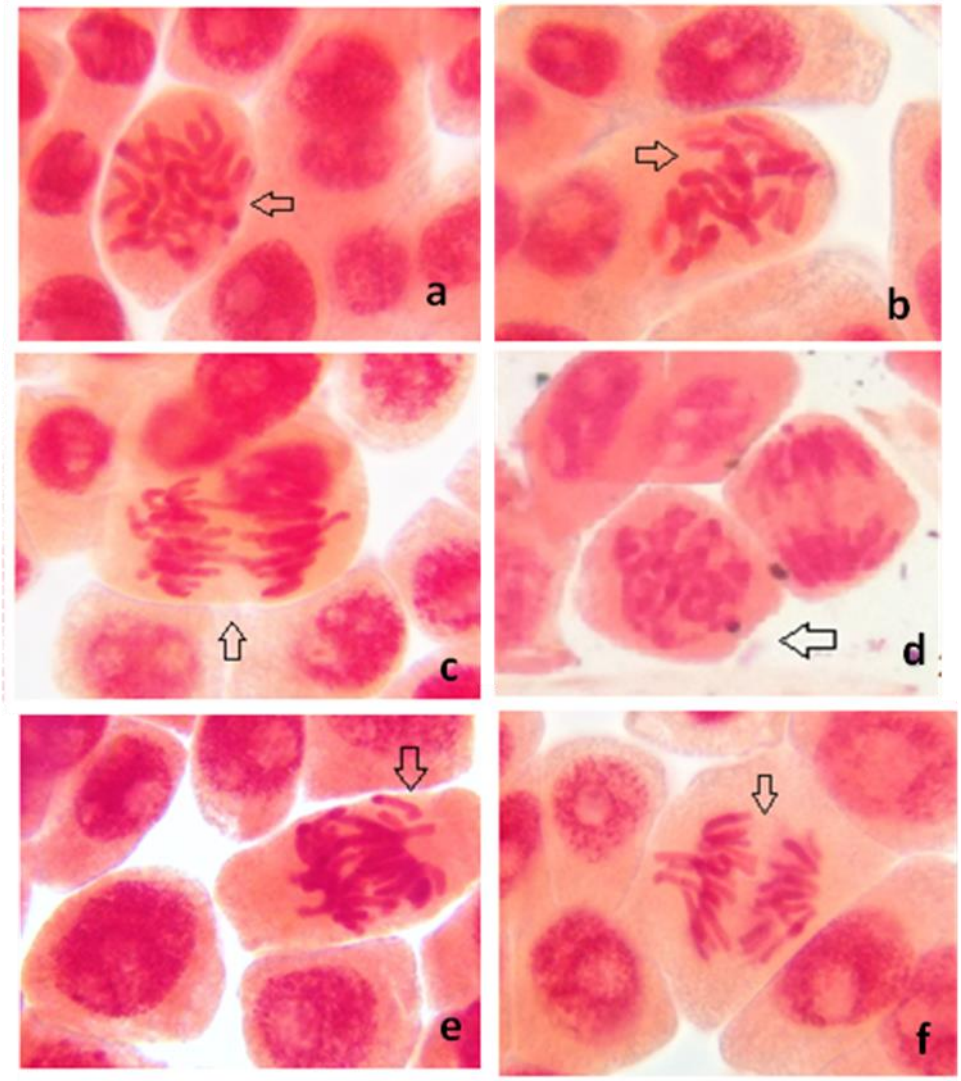

Figura 24 : a-b) c-metafase, **c-d)** puentes anafasicos, **e-f)** anafase desorganizada con cromosoma errante.

La frecuencia de anomalías de la mitosis a las 30 hs de exposición es menor para la mayor concentración como consecuencia de la citotoxicidad, que lleva a que las pocas células que progresan en la mitosis sean en su mayoría tolerantes al daño. Esta forma de utilizar un control positivo implica no solo demostrar que el sistema de ensayo responde a la exposición sino comparar los patrones de citotoxicidad y genotoxicidad que caracterizan los mecanismos de acción.

Cuando el daño opera solo a nivel de la segregación, las células que vuelven a ingresar son nuevamente afectadas por la interacción con el agente mientras que el daño a nivel de la cromatina puede ser en parte reparado en la interfase y la siguiente mitosis mostrara algunas anomalías relacionadas junto con mitosis normales.

5.3 ESTRÉS OXIDATIVO

La evlauacion del estrés oxidativo se realizó por medición de los niveles de catalasa y glutation mientras que el daño oxídativo se obtuvo a partir de los niveles de malondialdehido. La evaluación se realizo en un ensayo independiente que incluyo la exposcion de las raices durante 30 hs a los controles y los agentes ipriodione, griseofulvina y AgNPAn. Los resultados se meustran en las figuras

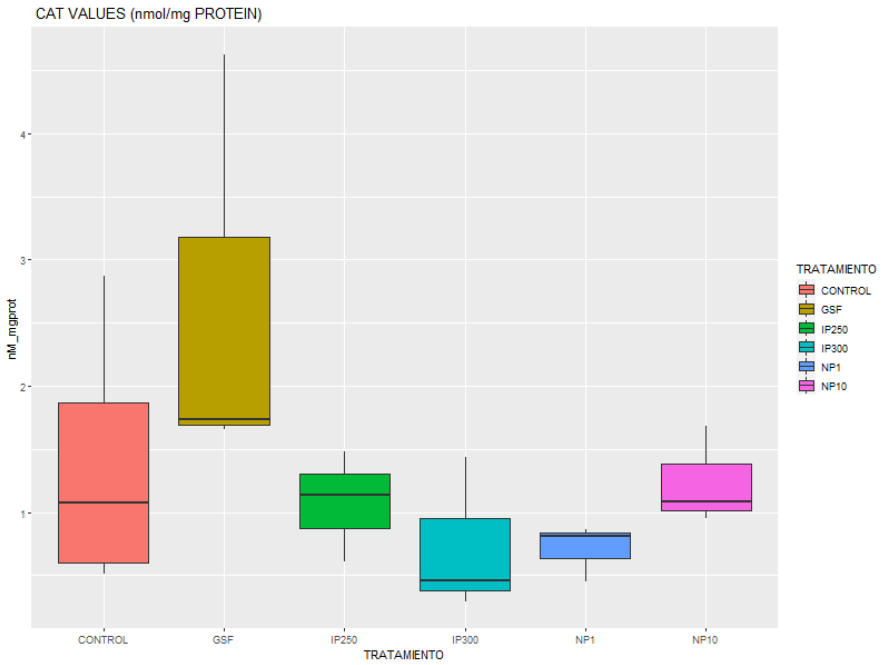

Fig. 25: Actividad de la enzima catalasa medida en las celulas meristematicas expuestas a GSF (250 µg/ml), IP (250 y 300 µg/ml), AgNPsAn (1 -10 µg/ml) y controles.

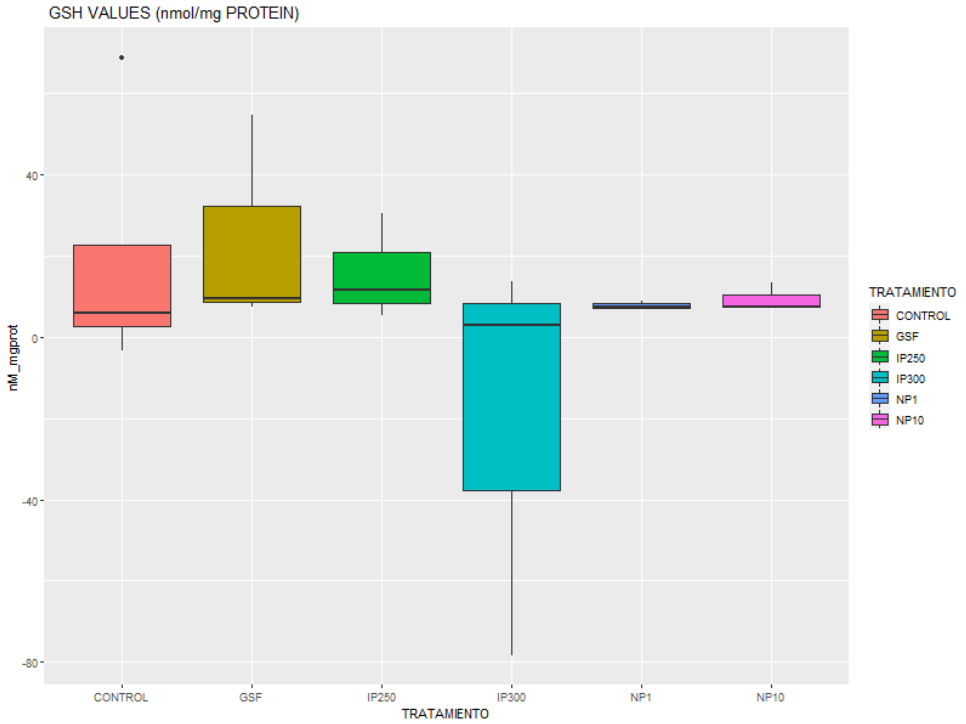

Fig. 26: Niveles de glutation medido en las celulas meristemáticas expuestas a GSF (250 µg/ml), IP (250 y 300 µg/ml), AgNPsAn (1 -10 µg/ml) y controles.

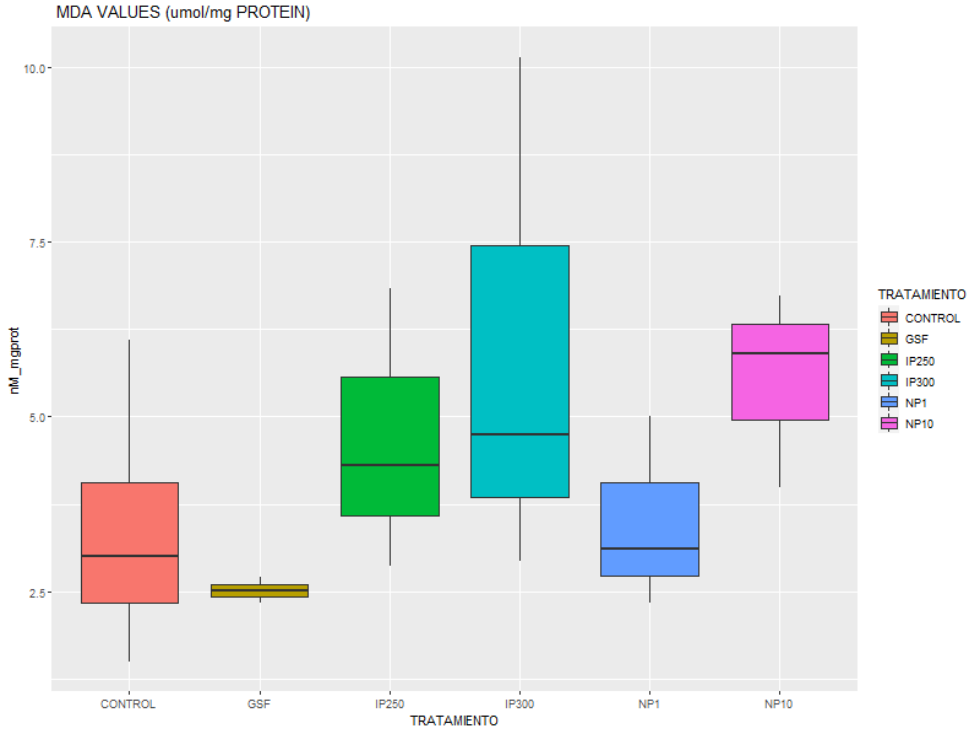

Fig. 27: Niveles de malondialdehido medido en las celulas meristemáticas expuestas a GSF(250 µg/ml), IP (250 y 300 µg/ml), AgNPsAn (1 -10 µg/ml) y controles.

Los valores de MDA fueron analizados con ANOVA mientras que los valores de CAT y GSH se analizaron con Kruskal-Wallis debido a que no cumpieron con los supestos de normalidad y homocedadticidad.

En todos los casos no existieron diferencias significativas entre los tratamientos.

DISCUSION

6. DISCUSIÓN

6.1 Ensayo Allium cepa

El ensayo de *Allium cepa* es una metodología propuesta para evaluar la potencial toxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad de agentes químicos y mezclas, especialmente mezclas ambientales. El ensayo es valorado debido a su versatilidad, factibilidad y respuesta compatible con otros sistemas de ensayo en animales (Grant, 1982). Además, la respuesta que ofrecen modelos basados en plantas recrea el potencial efecto tóxico en el nivel trófico de los productores y por lo tanto los resultados podrían ser valorados en ese nivel de análisis.

La literatura menciona lo ventajoso que resulta el uso del test de *Allium cepa* como biomodelo de ensayo ya que permite identificar agentes contaminantes, mutagénicos o cancerígenos obteniendo datos que podrían ser transferidos a toda la biodiversidad de plantas y animales (Maria Sabeen, Qaisar Mahmood, Zulfiqar Ahmad Bhatti, Faridullah Muhammad Irshad, Muhammad Bilal, Malik Tahir Hayat, Usman Irshad, Tahir Ali Akbar, Muhammad Arslan, 2020).

En la presente tesis, los ensayos realizados con *Allium cepa* como modelo biológico experimental *in vivo* permitió obtener información sobre los efectos producidos en las células meristemáticas de la raíz, por la exposición a agentes xenobióticos de interés por su amplio uso en el control de enfermedades fúngicas.

Los valores basales obtenidos en el presente estudio fueron contrastados con la literatura encontrando que los mismos se encuentran en el rango compatible con los valores obtenidos por otros autores y por los obtenidos en nuestro laboratorio en estudios anteriores (Chaufan et al., 2019; Tripodi et al., 2020)

La variabilidad observada en valores basales tiene su origen en la variabilidad propia de la población de plantas utilizada y de las condiciones experimentales propias de cada ensayo como la temperatura, disponibilidad de oxígeno y tiempo de exposición. Los resultados obtenidos en los ensayos a partir de los puntos

finales considerados en la prueba de *Allium cepa* para evaluar citotoxicidad deben interpretarse a la luz del proceso global, considerando que la respuesta celular primaria ante la exposición de agentes genotóxicos es la detención del ciclo celular. Esto puede deberse al efecto que tiene el agente químico sobre el proceso normal de la mitosis reduciendo el número de células que se dividen (George., 1997).

Otras investigaciones asocian la disminución de la actividad mitótica con la inhibición de la síntesis de proteínas las cuales suelen estar asociadas o dar lugar a la inhibición de la síntesis del ADN (Bard, 1983). No se descarta además el papel de la reducción de la fosforilación oxidativa que se genera como resultado a un bajo nivel de ATP en la célula como factor de inhibición de la síntesis de ADN y ARN en (S. Chand & S. C. Roy, 1981). En los casos en que el agente induce anormalidades cromosómicas, la inhibición de la mitosis también puede ser a expensas de la genotoxicidad, debido a que los sistemas de chequeo y reparación, se activan y aumenta la duración de la interfase (Andrioli, 2011; Casillas-figueroa et al., 2020; Pelayo et al., 2001).

En esta investigación la inhibición del índice mitótico sugiere que los compuestos químicos empleados generan cambios citológicos que inducen aberraciones cromosómicas en las células del ápice de la raíz de *Allium cepa*. Este resultado es similar al obtenido por otros autores al tratar células meristemáticas con insecticidas y pesticidas (Bianchi et al., 2017; Firdos Fatma, Sonam Verma, 2018). Los efectos citotóxicos son evidenciados por los cambios en el índice mitótico y de fases además de la relación de fases, especialmente la relación anafase/metafase. El análisis conjunto de los indicadores contribuye a interpretar los procesos e inferir mecanismos involucrados.

Cuando la inhibición del índice mitótico está por encima del 50% con respecto al control negativo, la respuesta genotóxica es muy variable y poco informativa debido a la ausencia significativa de células en mitosis. (Kater et al., 2016). Por este motivo es importante tener información global y obtener una curva concentración respuesta que refleje la relación entre los procesos involucrados.

Para evaluar los efectos sobre el ciclo celular, se empleó la información obtenida y descrita por Andrioli, 2011, que determina el tiempo de duración del ciclo celular en *Allium cepa* de 13.5 horas (N. B. Andrioli et al., 2014) se sobreestimó en 15 horas para cada ciclo. La exposición de las raíces a los agentes estudiados a 4 y 30 horas permitió analizar el impacto de los procesos que intervienen durante un ciclo celular completo, que a su vez son dependientes del tipo de daño. Así, en la exposición a 4 horas las células que están transcurriendo la mitosis podrán afectarse rápidamente por efectos debidos a disrupción segregacional deteniendo las células en metafase, con disminución en la relación anafase/metafase comparados con el control, debido al retraso en el ingreso a anafase, además como anomalías de la mitosis es posible encontrar figuras como C- metafases.

Si el agente estudiado interacciona en células que aún están en interfase las células afectadas quedaran detenida en interfase y se observara disminución del IM respecto al control negativo. Al transcurrir más de un ciclo celular una fracción de las células afectadas habrán podido reparase o sobrepasar el control prosiguiendo la mitosis con algún daño evidenciado en figuras como puentes, fragmentos, extremos pegajosos y anafases desordenadas.

Otra contribución del diseño es la comparación de la respuesta con el control positivo griseofulvina. Se sabe que esta sustancia interfiere con procesos que llevan a inducir genotoxicidad y citotoxicidad en concentraciones mayores a 200 µg/ml en las células meristemáticas de *A. cepa.*

El patrón observado indica que entre 200 y 300 µg/ml se produce el nivel de citotoxicidad que impide la observación de los efectos genotóxicos. Por tal motivo se puede observar que al comparar los dos tiempos ensayados los patrones de citotoxicidad (IM) y genotoxicidad (AM) se invierten. La interpretación de estos patrones es que la inhibición de la mitosis lleva a una menor manifestación de las anomalías ya que las pocas células que se dividen fueron reparadas y solo unas pocas progresan con errores o son detenidas en metafase.
Estos patrones indican que el daño producido induce detención en interfase y en metafase, sugiriendo que la genotoxicidad presenta múltiples blancos de acción.

Esto es coincidente con la categorización de las anomalías observadas donde los fragmentos y las C- metafases son las más abundantes en las células meristemáticas expuestas al control positivo.

6.2 Evaluación genotóxica de los fungicidas

Los resultados obtenidos indican, que el rango de concentraciones de los fungicidas químicos evaluados en este trabajo de tesis, iprodione y tebuconazol y de nanopartículas de plata presenta niveles de citotoxicidad en términos de índice mitótico compatible con el análisis de genotoxicidad.

IPRODIONE

La evaluación del índice mitótico por la exposición de las raíces de *Allium cepa* a Iprodione mostraron un patrón de respuesta que indica afectación del sistema segregacional con impacto en el IM a las 30 hs. Para las concentraciones más elevadas.

El análisis estadístico indica que el IM no difiere significativamente entre las concentraciones ni entre los tiempos de exposición, pero si difiere el índice de metafase y la relación anafase/ metafase. Este resultado es compatible con el patrón descriptivo y con la presencia de anormalidades de tipo C- metafase y desordenes en anafase.

Podríamos atribuir efectos genotóxicos a iprodione en las concentraciones ensayadas sobre las células meristemáticas de *Allium cepa* por inducción de biomarcadores de disrupción de la segregación de cromátides y la citocinesis. Estos resultados son compatibles con los obtenidos recientemente en otros modelos utilizando micronúcleos con sonda Centroamérica como indicador de efectos segregacionales o aneugenicidad (Chaufan et al., 2019).

Un punto a considerar es que las concentraciones ensayadas se encuentran en un rango inferior al recomendado para la aplicación (100 g de polvo al 50%/100L de

agua= 500 µg/ml IP). Esta información es relevante a la hora de analizar los potenciales riesgos de exposición considerando prácticas de manejo y eliminación de recipientes, así como los residuos que permanece en alimentos que se espera que contengan mucha menor concentración debido al lavado y degradación del IP. Sin embargo, en este caso, se deben tener en cuenta los efectos por exposición a bajas concentraciones en diferentes tipos celulares.

TEBUCONAZOL

El modo de acción propuesto para el tebuconazol es la inhibición en la polimerización de las tubulinas por unión covalente (Prichard., 1994).

Sin embargo, la observación de los valores del IM indica que, a diferencia de lo observado para el IP, la curva concentración-respuesta es descendente con un patrón similar para ambos tiempos de exposición. Este patrón sugiere que existen interacciones durante la interfase, además de las que ocurren durante la mitosis.

Estos resultados se corresponden con los valores de índice de metafase y relación anafase metafase que no se ven afectados por la presencia del TCZ, en las células expuestas a 4hs, aunque para el tiempo de 30 horas se muestra los valores muestran un patrón inestable en función de las concentraciones. El análisis estadístico indica que los valores del IM, IMET y RA no presentan diferencias significativas para los valores de células expuestas y no expuestas.

La frecuencia de anomalías de la mitosis se incrementa con las concentraciones siendo la diferencia entre los valores estadísticamente significativa para las 2 concentraciones más elevadas (15 y 30 µg/ml) respecto al control negativo.

Los tipos de anomalía para las células expuestas un tiempo de 4 hs son las C-metafases y desordenes en anafase como resultado de interacciones tempranas, para las 30 horas de exposición se observan otras anomalías resultantes de daño a la cromatina. En base a los resultados obtenidos podría inferirse que los efectos del TCZ podrían presentar un espectro más amplio que el IP con relación concentración respuesta. Las formulaciones de TCZ contienen hasta 43 % de TCZ y las aplicaciones se realizan al 25 %, variando la dosis de acuerdo al cultivo. De lo anterior se desprende que las concentraciones aplicadas son mucho más elevadas que las ensayadas en la presente tesis. Esto se debe a que es considerado como un

fungicida con baja toxicidad sistémica. Sin embargo, un estudio reciente usando semillas de Allium *cepa* indicó que las células meristemáticas expuestas a un rango entre 50 y 200 µg/ml presentan inhibición del índice mitótico, incompatibles con el análisis de anomalías cromosómicas.
Este resultado es concordante con el de la presente tesis en la que concentraciones entre 5 y 30 µg/ml mantienen valores de inhibición del índice mitótico compatible con el análisis de anomalías cromosómicas y estas se inducen significativamente a 15 y 30 µg/ml.

Otros estudios en linfocitos de bovinos en el mismo rango de concentraciones reportar efectos citotóxicos (Šiviková et al., 2013). Estos resultados junto con el hecho de que el TCZ se ha detectado en el ambiente y en alimentos (Butinof et al., 2017), aun cuando estos residuos se presenten en concentraciones menores a las ensayadas representan un riesgo para exposiciones prolongadas y procesos de acumulación.

NANOPARTICULAS DE PLATA

En base a los resultados obtenidos para la exposición a Ag NPs indican que las que provienen de *Aspergillus niger* son capaces de inducir genotoxicidad en términos de anomalías de la mitosis con una prevalencia de anormalidades de tipo C-metafases y desórdenes en anafase.

Los patrones de respuesta para el índice de metafase y la relación anafase / metafase se ven afectados respecto al control negativo para la exposición a 30 hs, y este resultado es compatible con disturbios en la segregación. En cambio, los valores de índice de metafase obtenidos por 4 hs de exposición a las AgNPs cuyos mediadores son *C. laurentii* y *R glutinis* se ven disminuidos respecto al control negativo cuando el índice mitótico es elevado, estos resultados juntos con los de relación anafase/metafase sugieren una desregulación de la proliferación celular y mayor proporción relativa de células en profase respecto del control.
Este efecto mitogénico podría interpretarse como el resultado colateral del estrés oxidativo cuando los niveles del mismo no conducen a apoptosis. Este mecanismo se describe para los agentes oxidativos en bajas concentraciones, por intervenir en

la regulación del ciclo celular y que en concentraciones elevadas producen la muerte celular por oxidación.

Considerando que el mecanismo de toxicidad propuesto para las nanopartículas metálicas es el daño oxidativo y que este es dependiente de la relación de superficie, se considera que el tamaño es inversamente proporcional al daño. En el caso de las nanopartículas metálicas biosintetizadas el aporte de sustancias por parte del microrganismo mediador formando la corona pueden modificar la interacción con las células favoreciendo o impidiendo el ingreso a las mismas, así como interactuar con las proteínas.

En este sentido se considera que la presencia de proteínas en la corona podría ser más reactivo que la presencia de otras moléculas como carbohidratos.
Este hecho podría explicar que las Ag NP provenientes de *A. niger* que son las únicas que presentan una corona rica en proteínas presente interacciones aun cuando su tamaño es mayor que las otras AgNPs ensayadas. Por otro lado los efectos oxidativos de las AgNPs provenientes de *R. glutinis* y *C.lurentii* se manifestaron de manera leve y no presentaron una relación con la concentración. Este hecho sugiere que el ingreso a la célula no fue dirigido por la cantidad de las AgNPs en el medio de crecimiento de la raíz.

La relevancia que tienen estos resultados está vinculada con las potenciales interacciones de las AgNPs y de las sustancias que rodean a las mismas aportadas por los microrganismos mediadores, además de la posible influencia de la corona en la capacidad de ingreso de las AgNPs a las células de las plantas una vez captadas por el sistema radicular. Esto es un aspecto importante para futuras investigaciones ya que presenta implicancia en la presenciad estos materiales en los ecosistemas.

La literatura presenta numerosos trabajos que confirman que el de acción de las AgNPs es la interacción con las cargas de la superficie que llevan al estrés oxidativo y esto explica la relación inversa entre dicho efecto con el tamaño de la AgNPs. En esta tesis las AgNPs se muestra que las AgNP biosintetizadas no siguen el

mencionado paradigma y que aun cuando los tamaños se encuentran en el mismo rango, otros aspectos propios del origen microbiológico pueden estar interviniendo en dar lugar a otras interacciones. Estos resultados indican que es necesario profundizar los estudios con métodos para cuantificar el ingreso de las AgNPs a las células meristemáticas y analizar las interacciones con las moléculas de la corona aportada por los microrganismos mediadores.

6.3 EVALUACION DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Para la evaluación de estrés oxidativo en la presente tesis se consideraron los agentes antioxidantes CAT y GSH y el indicador de daño oxidativo MAD . Las mediciones se limitaron a los controles (negativo y positivo) y a los agentes IP y AgNPs An, resultando en un patrón que muestra valores mayores de CAT para GSF y valores bajos de GSH para IP 300 µg/ml junto con valores altos de MDA. ninguno de los indicadores de estrés oxidativo arroja diferencia significativa entre los tratamientos. Los valores se presentan muy variables y no permiten inferir un mecanismo mediado por radicales libres en la acción genotóxica. Este enfoque debería ampliarse en un futuro incluyendo un mayor número de muestras y de antioxidantes.

CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTIRAS

Los potenciales efectos tóxicos de agentes que pueden estar presentes en el ambiente como son los agroquímicos, puede ser evaluado con diferentes modelos, los cuales darán información valiosa sobre efectos específicos. Los modelos que utilizan células meristemáticas de plantas por un lado permiten el análisis de los efectos sobre sistemas conservados en la biodiversidad como los procesos de control del ciclo celular en células proliferantes, aun cuando los patrones de dosis respuesta sean diferentes, debido la sensibilidad diferencial de los tejidos.

Los agentes genotóxicos que interactúan con el ADN o las proteínas microtubulares no diferencian entre organismos ya que son moléculas muy conservadas. Las sustancias que inducen estrés oxidativo, son capaces de inducirlo en las biomoléculas de todos los organismos, aunque las defensas antioxidantes

pueden ser más eficientes en tejidos proliferantes. Una de las variables determinantes del potencial genotóxico de las sustancias, es la actividad metabólica de las células que es muy diferente entre los organismos y los tejidos.

En este sentido hay que considerar que el modelo que se selecciono para el análisis en la presente tesis, representa a los productores primarios de los ecosistemas que además en muchos casos son capaces de la bioacumular sustancias.

Esto hace que sean elegidas para analizar potenciales afectaciones en los ecosistemas, aun cuando, se trate de un ensayo de laboratorio, los resultados abren el interrogante sobre los efectos reales en el ambiente debido a la exposición de los fungicidas estudiados y sobre las mezclas que se presentan en las aplicaciones. Este interrogante es una perspectiva futura que requiere un diseño observacional a campo con información detallada sobre la presencia de los agroquímicos en el ambiente a lo largo del tiempo, es decir que requiere un abordaje múltiple e interdisciplinario, que no solo incluyan el análisis de puntos finales celulares sino poblacionales seleccionando marcadores de variabilidad genética para así poder alcanzar una conclusión satisfactoria.

.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. Methods in Enzymology, 105(1947), 121–126.

Ammar, A. S. (2018). Nanotechnologies associated to floral resources in agri-food sector Nanotecnologías asociadas a recursos florales en el sector agroalimentario. 67, 146–159.

Andrioli, N. (2011). Tesis Doctoral Evaluación de agentes químicos con potencial genotóxico en células meristemáticas de Allium cepa. 41–49.

Andrioli, N. B., Soloneski, S., Larramendy, M. L., & Mudry, M. D. (2014). Induction of microtubule damage in Allium cepa meristematic cells by pharmaceutical formulations of thiabendazole and griseofulvin. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 772, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.06.009

Andrioli, Nancy, Sabatini, S. E., Mudry, M. D., & Ríos de Molina, M. del C. (2012). Oxidative damage and antioxidant response of Allium cepa meristematic and elongation cells exposed to metronidazole. Environmental Toxicology and Chemistry, 31(5), 968–972. https://doi.org/10.1002/etc.1799

Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J. C., & García-Río, L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. Agriculture, Ecosystems and Environment, 123(4), 247–260. https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.07.011

Bard, A. (1983). Mitodepressive and Chromotoxic Activities of Two Herbicides in Allium cepa. Cytologia, 48, 451–457.

Barr, D. B. (2008). Biomonitoring of exposure to pesticides. Journal of Chemical Health and Safety, 15(6), 20–29. https://doi.org/10.1016/j.jchas.2008.07.001

Baša Česnik, H., Velikonja Bolta, Š., & Lisjak, K. (2015). Plant protection product residues in red grapes and Teran PTP wine. Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance, 8(2), 113–122. https://doi.org/10.1080/19393210.2014.1002816

Behrens, S., Wu, J., Habicht, W., & Unger, E. (2004). Silver nanoparticle and nanowire formation by microtubule templates. Chemistry of Materials, 16(16), 3085–3090. https://doi.org/10.1021/cm049462s

Bian, Y., Wang, J., Liu, F., Mao, B., Huang, H., Xu, J., Li, X., & Guo, Y. (2020). Residue

behavior and removal of iprodione in garlic, green garlic, and garlic shoot. In Journal of the Science of Food and Agriculture (Vol. 100, Issue 13). https://doi.org/10.1002/jsfa.10527

Bianchi, E., Lessing, G., Brina, K. R., Angeli, L., Andriguetti, N. B., Peruzzo, J. R. S., do Nascimento, C. A., Spilki, F. R., Ziulkoski, A. L., & da Silva, L. B. (2017). Monitoring the Genotoxic and Cytotoxic Potential and the Presence of Pesticides and Hydrocarbons in Water of the Sinos River Basin, Southern Brazil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 72(3), 321–334. https://doi.org/10.1007/s00244-016-0334-0

Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies. Mutation Research - Reviews in Mutation Research, 543(3), 251–272. https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2

BRADFORD, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 72, 248–254. https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003

Butinof, M., Fernández, R., Muñoz, S., Lerda, D., Blanco, M., Lantieri, M. J., Antolini, L., Gieco, M., Ortiz, P., Filippi, I., Franchini, G., Eandi, M., Montedoro, F., & Díaz, M. del P. (2017). Valoración de la exposición a plaguicidas en cultivos extensivos de Argentina y su potencial impacto sobre la salud. Revista Argentina de Salud Pública, 8(33), 8–15.

Cairns, J., & Pratt, J. R. (1990). The scientific basis of bioassays. Environmental Bioassay Techniques and Their Application. Proc. Conference, Lancaster, 1988, 5–20. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1896-2_2

Casillas-figueroa, F., Arellano-garcía, M. E., Leyva-aguilera, C., Ruíz-ruíz, B., Vázquez-gómez, R. L., Radilla-chávez, P., Chávez-santoscoy, R. A., Pestryakov, A., Toledano-magaña, Y., García-ramos, J. C., & Bogdanchikova, N. (2020). Argovit™ silver nanoparticles effects on allium cepa: Plant growth promotion without cyto genotoxic damage. Nanomaterials, 10(7), 1–20. https://doi.org/10.3390/nano10071386

Castro, T. F. D., da Silva Souza, J. G., de Carvalho, A. F. S., de Lima Assis, I., Palmieri, M. J., Vieira, L. F. A., Marcussi, S., Machado, M. R. F., & Murgas, L. D. S. (2018). Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult Danio rerio

exposed to tebuconazole-based commercial product. Environmental Toxicology and Pharmacology, 62, 140–146. https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.06.011

Chambers, J. E., Greim, H., Kendall, R. J., Segner, H., Sharpe, R. M., & Van Der Kraak, G. (2014). Human and ecological risk assessment of a crop protection chemical: A case study with the azole fungicide epoxiconazole. Critical Reviews in Toxicology, 44(2), 176–210. https://doi.org/10.3109/10408444.2013.855163

Chaufan, G., Galvano, C., Nieves, M., Mudry, M. D., Ríos De Molina, M. D. C., & Andrioli, N. B. (2019). Oxidative Response and Micronucleus Centromere Assay in HEp-2 Cells Exposed to Fungicide Iprodione. Chemical Research in Toxicology, 32(4), 745–752. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00405

Choudhury, N., & Choudhury, N. (2018). Ecotoxicology of Aquatic System: A Review on Fungicide Induced Toxicity in Fishes. Progress in Aqua Farming and Marine Biology Review Article, 2018(1), 180001. https://chembiopublishers.com/submit-manuscript.php

Consuelo, M., Ronco, A., & Pica, Y. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla Allium cepa L mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces Reactivos y soluciones. G. Castillo, 33–40.

D Feretti, I Zerbini, E Ceretti, M Villarini, C Zani, M Moretti, C Fatigoni, G Orizio, F Donato, S. M. (2008). Evaluation of chlorite and chlorate genotoxicity using plant bioassays and in vitro DNA damage tests. 42.

DNA - Direccion nacional de agroindustria. (2009). Protocolo de calidad para las cebollas frescas. 7. http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/valorAr/sello/SAA019_Cebollas_V07.pdf

Doria Serrano, M. del C. (2009). Química verde: un nuevo enfoque para el cuidado del medio ambiente. Educación Química, 20(4), 412–420. https://doi.org/10.1016/s0187-893x(18)30044-2

EFSA. (2009). Scientific Opinion on Risk Assessment for a Selected Group of Pesticides from the Triazole Group to Test Possible Methodologies to Assess Cumula-tive Effects from Exposure through Food from these Pesticides on

Human Health. https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2009.1167

El-Nahhal, Y. (2017). Risk Factors among Greenhouse Farmers in Gaza Strip. Occupational Diseases and Environmental Medicine, 05(01), 1–10. https://doi.org/10.4236/odem.2017.51001

EPA Environmental Protection Agency. (1999). Pesti- cide Tolerance, Tebuconazole (Elite, Folicur). Federal Register, 64(5), 1132–1138.

European Food Safety Authority (EFSA). (2016). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance iprodione. EFSA Journal, 14(11). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4609

Fantke, P., & Jolliet, O. (2016). Life cycle human health impacts of 875 pesticides. International Journal of Life Cycle Assessment, 21(5), 722–733. https://doi.org/10.1007/s11367-015-0910-y

Firdos Fatma, Sonam Verma, A. K. & A. S. (2018). Phytotoxicity of pesticides mancozeb and chlorpyrifos: correlation with the antioxidative defence system in Allium cepa. Physiology and Molecular Biology of Plants, 24, 115–123.

Fisun, K., & Rasgele, P. G. (2009). Genotoxic effects of raxil on root tips and anthers of allium cepa l. Caryologia, 62(1), 1–9. https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589659

Foschi, M. L., Martínez, L., Ponce, M. T., & Galmarini, C. R. (2009). Doblehaploides , una estrategia biotecnológica para el mejoramiento genético en cebolla (Allium cepa). Horticultura Argentina, 28(66), 40–47.

García-Gutiérrez, C., & Rodríguez-Mesa, G. D. (2012). Ra Ximhai. Ra Ximhai, 8(3), 41–49.

Gaviola, J., & Oliva, R. (1997). Alternativas en la multiplicación de la cebolla. Horticultura Argentina. Avances En Horticultura 2 (1) : 2-12.(1997), 8(5567), 2–12.

George., A. G. and N. M. (1997). Cytotoxicity of Insecticide Temik 15 G (Decarb) in Mitotic and Meiotic Cells of Vicia faba Plant. The Japan Mendel Society, 62, 259–263.

Grant, W. F. (1982). Chromosome aberration assays in allium: A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. Mutat Res, 99(3), 273–291.

Hulkoti, N. I., & Taranath, T. C. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 121, 474–483. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.027

IARC. (2015). IARC Monographs Volume 112: Evaluation of Five Organophosphate Insecticides and Herbicides. International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization (WHO), 112, 1–2. https://doi.org/10.1111/j.1742-6723.2004.00593.x

Int, C., & Iqbal, M. (2019). Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: A review. 5(1), 1–80. https://doi.org/10.31221/osf.io/z2ynm

INTA. (2016). Cebolla: infaltable y exportable. https://inta.gob.ar/noticias/cebolla-infaltable-y-exportable

J. J. M. Bedaux & S. A. L. M. Kooijman. (1994). Statistical analysis of bioassays, based on hazard modelling. Environmental and Ecological Statistics, 1, 303–314.

Jaidev, L. R., & Narasimha, G. (2010). Fungal mediated biosynthesis of silver nanoparticles, characterization and antimicrobial activity. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 81(2), 430–433. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.033

Jiao, X., Li, Z., He, J., & Wang, C. (2020). Enhanced photodegradation of applied dithianon fungicides on plant leaves by dissolved substances in atmosphere under simulated sunlight. Chemosphere, 254, 126807. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126807

Kater, S., Goulvestre, C., Laurent, A., Nicco, C., Che, C., Goldwasser, F., Panis, Y., Soubrane, O., Alves, A., Le, E., Weill, B., Caperta, A. D., Delgado, M., Ressurreição, F., Meister, A., Jones, R. N., Viegas, W., Houben, A., Rank, J., … Johnson, G. E. (2016). Genetic toxicology at the crossroads-from qualitative hazard evaluation to quantitative risk assessment. Mutagenesis, 31(3), 233–237. https://doi.org/10.1093/mutage/gew011

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arabian Journal of Chemistry, 12(7), 908–931. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011

Klaassen, C., Amdur, M., & Doull, J. (1998). Casarett & Doull ' s Toxicology : The basic science of poisons Route & Site of Exposure - P 13 Duration & Frequency

of Exposure - P 14 Local versus Systemic Toxicity - p 16 Reversible versus Irreversible Toxic Effects - P 16 Selective toxicity - P24 Descr. Caserett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, May, 1–2. http://scholar.google.com.au/scholar?q=toxic+effects+of+pesticides+on+humans&btnG=&hl=en&as_sdt=0,5&as_vis=1

Komárek, M., Čadková, E., Chrastný, V., Bordas, F., & Bollinger, J. C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. Environment International, 36(1), 138–151. https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.005

Kumari, M., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2009). 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

Kuppusamy, P., Yusoff, M. M., Maniam, G. P., & Govindan, N. (2016). Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report. Saudi Pharmaceutical Journal, 24(4), 473–484. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.013

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

Lim, H. K., Asharani, P. V., & Hande, M. P. (2012). Enhanced genotoxicity of silver nanoparticles in DNA repair deficient mammalian cells. Frontiers in Genetics, 3(JUN), 1–13. https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00104

LJ., M. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutation Research, 424(1–2), 83–95.

Loutfy, N., Malhat, F., Kamel, E., & Saber, A. (2015). Residual Pattern and Dietary Intake of Iprodione on Grapes under Egyptian Field Conditions: A Prelude to Risk Assessment Profile. Human and Ecological Risk Assessment, 21(1), 265–279. https://doi.org/10.1080/10807039.2014.909206

Lynch, A. M., Eastmond, D., Elhajouji, A., Froetschl, R., Kirsch-Volders, M., Marchetti, F., Masumura, K., Pacchierotti, F., Schuler, M., & Tweats, D. (2019). Targets and mechanisms of chemically induced aneuploidy. Part 1 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis

and hereditary diseases. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 847(December 2018), 403025. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.02.006

Maria Sabeen, Qaisar Mahmood, Zulfiqar Ahmad Bhatti, Faridullah Muhammad Irshad, Muhammad Bilal, Malik Tahir Hayat, Usman Irshad, Tahir Ali Akbar, Muhammad Arslan, N. S. (2020). Allium cepa assay based comparative study of selected vegetables and the chromosomal aberrations due to heavy metal accumulation. Saudi J Biol Sci, 27(5), 1368–1374. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32346347/

Massarsky, A., Trudeau, V. L., & Moon, T. W. (2014). Predicting the environmental impact of nanosilver. Environmental Toxicology and Pharmacology, 38(3), 861–873. https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.10.006

Medina, C., Santos-Martinez, M. J., Radomski, A., Corrigan, O. I., & Radomski, M. W. (2007). Nanoparticles: Pharmacological and toxicological significance. British Journal of Pharmacology, 150(5), 552–558. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707130

Monostori, P., Wittmann, G., Karg, E., & Túri, S. (2009). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 877(28), 3331–3346. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.016

Mudry MD & Carballo MA. (2006). Genetica Toxicologica.

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., Quigg, A., Santschi, P. H., & Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology, 17(5), 372–386. https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0

Ongley, E. D., Xiaolan, Z., & Tao, Y. (2010). Current status of agricultural and rural non-point source Pollution assessment in China. Environmental Pollution, 158(5), 1159–1168. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.047

Pablo M. Demetrio, C. B. & A. E. R. (2014). The Effect of Cypermethrin, Chlorpyrifos, and Glyphosate Active Ingredients and Formulations on Daphnia magna (Straus). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology Volume, 93, 268–273.

Palencia, S., Buelvas, A., & Palencia, M. (2015). Interaction Mechanisms of Inorganic Nanoparticles and Biomolecular Systems of Microorganisms. Current Chemical Biology, 9(1), 10–22. https://doi.org/10.2174/2212796809666151022201811

Pelayo, H. R., Lastres, P., & De la Torre, C. (2001). Replication and G2 checkpoints: Their response to caffeine. Planta, 212(3), 444–453. https://doi.org/10.1007/s004250000415

Pisani, C., Voisin, S., Arafah, K., Durand, P., Perrard, M. H., Guichaoua, M. R., Bulet, P., & Prat, O. (2016). Ex vivo assessment of testicular toxicity induced by carbendazim and iprodione, alone or in a mixture. ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation, 33(4), 393–413. https://doi.org/10.14573/altex.1601253

Prichard., R. (1994). Anthelmintic resistance. Veterinary Parasitology, 54(1–3), 259–268.

Rial-Otero, R., Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2005). Variation in concentrations of the fungicides tebuconazole and dichlofluanid following successive applications to greenhouse-grown lettuces. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(11), 4471–4475. https://doi.org/10.1021/jf047848h

S. Chand & S. C. Roy. (1981). Effects of herbicide 2,4-dinitrophenol on mitosis, DNA, RNA and protein synthesis inNigella sativa L. Biologia Plantarum, 23.

Schuster, J. M., Laczeski, M. E., Rosenberger, M. R., & Schvezov, C. E. (2014). Estudio in vitro de la citotoxicidad de nanopartículas de TiO 2. October, 1–5. https://doi.org/10.13140/2.1.3867.8726

Silva, Hugo A. Zarza, F. N. G. G. & C. R. E. (2014). Calidad de bulbos de variedades de cebolla en tres épocas de trasplante. III CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS AGRARIAS, 40–43.

Šiviková, K., Dianovský, J., Holečková, B., Galdíková, M., & Kolesárová, V. (2013). Assessment of cytogenetic damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to in vitro tebuconazole-based fungicide. Chemosphere, 92(5), 555–562. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.001

Sun, C., Cang, T., Wang, Z., Wang, X., Yu, R., Wang, Q., & Zhao, X. (2015). Degradation of three fungicides following application on strawberry and a risk assessment

of their toxicity under greenhouse conditions. Environmental Monitoring and Assessment, 187(5). https://doi.org/10.1007/s10661-015-4539-x

Taxvig, C., Hass, U., Axelstad, M., Dalgaard, M., Boberg, J., Andeasen, H. R., & Vinggaard, A. M. (2007). Endocrine-disrupting activities In Vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. Toxicological Sciences, 100(2), 464–473. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm227

Ticha, J., Hajslova, J., Jech, M., Honzicek, J., Lacina, O., Kohoutkova, J., Kocourek, V., Lansky, M., Kloutvorova, J., & Falta, V. (2008). Changes of pesticide residues in apples during cold storage. Food Control, 19(3), 247–256. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.03.011

Tripodi, M. A., Andrioli, N. B., & Suárez, O. V. (2020). Genotoxicity evaluation using micronucleus test in Rattus norvegicus captured in urban ecosystems of Buenos Aires, Argentina. Environmental Science and Pollution Research, 27(22), 27626–27634. https://doi.org/10.1007/s11356-020-08897-9

V. C. Moser, S. Barone, Jr., R. J. Smialowicz, M. W. Harris, B. J. Davis, D. Overstreet, M. Mauney, R. E. C. (2001). The Effects of Perinatal Tebuconazole Exposure on Adult Neurological, Immunological, and Reproductive Function in Rats. Toxicological Sciences, Volume 62(2), Pages 339–352.

WHO/FAO. (2001). 2001 Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. 308.

Wightwick, A.M., Bui, A.D., Zhang, P. et al. (2012). Environmental Fate of Fungicides in Surface Waters of a Horticultural-Production Catchment in Southeastern Australia. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 62, 380–390.

Wightwick, A. M., Mollah, M. R., Partington, D. L., & Allinson, G. (2008). Copper fungicide residues in Australian vineyard soils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(7), 2457–2464. https://doi.org/10.1021/jf0727950

William F. Grant. (1994). The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 310(2), 175–185.

Xu, F., Yu, J. yong, Wang, Q. sheng, Fu, Y., Zhang, H., & Wu, Y. liang. (2019). Simultaneous determination of 25 pesticides in Zizania latifolia by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Scientific Reports, 9(1), 1–8. https://doi.org