

Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad *in vitro* Gold nanoparticles: Applications and *in vitro* cytotoxicity

Mateo, Diego; Morales, Paloma; Ávalos, Alicia; Haza, Ana I.*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid (España). Tel.: +34-91-394 3747; Fax: +34-91-394 3743.

*hanais@vet.ucm.es

Recibido: 25 de julio de 2013

Aceptado: 8 de septiembre de 2013

Resumen. En los últimos años, la evolución en el desarrollo de productos elaborados a partir de nanotecnología ha experimentado un espectacular crecimiento. En particular, las nanopartículas de oro han despertado gran interés en los sectores biomédico y alimentario, donde se ha descrito su utilización en el tratamiento frente al cáncer o como parte integrante de envases resistentes a la abrasión, con propiedades antimicrobianas. Por tanto, se cree que la exposición humana a las nanopartículas de oro aumentará considerablemente en los próximos años, pudiendo tener esto repercusiones sobre la salud. En este marco, el estudio de la toxicología de las nanopartículas ha revelado que su toxicidad depende de multitud de factores. Además, en la bibliografía hay cierta controversia en torno a los posibles efectos citotóxicos inducidos por las nanopartículas de oro. Diversos estudios de exposición *in vitro* han destacado su inocuidad en algunas líneas celulares, mientras que otros trabajos demostraron respuesta citotóxica. La siguiente revisión tiene por objeto describir las propiedades más relevantes de las nanopartículas de oro considerando sus potenciales aplicaciones en medicina y en la industria de los alimentos, así como examinar su posible toxicidad, con especial énfasis en los estudios de citotoxicidad *in vitro* disponibles hasta el momento.

Palabras clave: Oro; Nanopartículas; Citotoxicidad; Cáncer

Abstract. In the recent years, the development of nanotechnology-based products has experienced a spectacular growth. Especially, gold nanoparticles have awoken a great interest in the biomedical and food sector, where their applications in cancer treatment as well as their incorporation in abrasion resistant and antimicrobial packaging have been described. Therefore, it is believed that human exposure to gold nanoparticles will increase considerably in the next few years, which may arise possible human health hazards. Hence, toxicology studies on nanoparticles revealed that their toxicity depends on various factors. Furthermore, there is some controversy regarding to gold nanoparticle-induced cytotoxicity. Several *in vitro* studies have reported that gold nanoparticles are innocuous, while some investigations have demonstrated a cytotoxic response after the exposure to these. The aim of this review is to describe the most relevant properties of gold nanoparticles according to their possible applications in medicine and in food industry, as well as to provide information about their possible toxic effects, taking into account the cytotoxic *in vitro* studies published at present.

Keywords: Gold; Nanoparticles; Cytotoxicity; Cancer.

Nanotecnología es un término que engloba el conjunto de ciencias y técnicas que se aplican a escala atómica, molecular y macromolecular. En una recomendación de la Comisión Europea (Recomendación de la Comisión, de 18 de octubre de 2011) se define el término "nanomaterial" como "un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado, y en el que el 5% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm".

Para poner en contexto esta escala de medida, un nanómetro es la millonésima parte de un milímetro, una longitud 80.000 veces más pequeña que el diámetro de un cabello humano y 10 veces el diámetro de un átomo de hidrógeno.

En virtud de su pequeño tamaño, las propiedades exhibidas por los nanomateriales son muy diferentes a la de esos mismos materiales en su escala convencional (Jos y col. 2009), lo que ha motivado que estos materiales despierten un gran interés en multitud de sectores. De hecho, la evolución en el desarrollo de

productos elaborados a partir de nanomateriales ha ido en ascenso en los últimos años. Se han descrito numerosas aplicaciones de nanopartículas metálicas en la elaboración de productos de consumo masivo como filtros UV en cremas solares o telas "anti-olor" para vestimenta, baterías de litio, paneles solares, así como también para uso en medicina, como terapias anti-tumorales (The Project on Emerging Nanotechnologies 2012).

Actualmente, el mercado global de los nanomateriales se estima en 11 millones de toneladas, con un valor de 20.000 millones de euros. Se prevé que en el año 2015 los productos a base de nanotecnología tengan un volumen global de 2 trillones de euros (Comisión Europea (CE) 2011), lo que demuestra que se trata de un sector en pleno desarrollo.

Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de metales nobles y, más específicamente, las nanopartículas de oro (AuNPs), exhiben excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico (Auffan y col. 2009). Además, las AuNPs pueden ser producidas en distintos tamaños y formas y pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc.) (Al-Qadi y Remuñán-López 2009). Todo esto hace que las AuNPs despierten un gran interés en multitud de campos, pero especialmente en los sectores biomédico y alimentario.

Aplicaciones de las nanopartículas de oro en medicina

Aunque pueda parecerlo, la utilización de oro con fines médicos no es nueva, sino que se remonta a la antigüedad, existiendo constatación de la utilización de oro coloidal en China en el año 2500 antes de Cristo. El descubrimiento por Robert Koch del efecto bacteriostático del cianuro de oro frente al bacilo de la tuberculosis, marca el comienzo de su utilización en la medicina moderna siendo introducido en la terapia de la tuberculosis en 1920 (Higby 1982).

Hoy en día, las nanopartículas de oro destacan especialmente por sus propiedades fototerapéuticas. En presencia de luz láser las AuNPs se activan y desprenden calor, siendo muy útiles en el tratamiento selectivo de células tumorales (Jain y col. 2008). Por ello, en los últimos años se han realizado notables esfuer-

zos en la investigación y en la aplicación de las AuNPs para la detección precoz, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

Además de su extraordinario potencial como agentes fototerapéuticos, las AuNPs pueden utilizarse en la elaboración de partículas nanoestructuradas para el transporte y la vectorización selectiva de fármacos y macromoléculas terapéuticas, así como en terapia génica (vehiculización de plásmidos, DNA, RNA, etc.) (Chen y col. 2008). También destaca el empleo de las AuNPs en la elaboración de sistemas transportadores inteligentes que permiten controlar, en el espacio y en el tiempo, la liberación del compuesto terapéutico asociado, ya sea por activación de un estímulo biológico interno o externo (Han y col. 2006; Hong y col. 2006).

Aplicaciones de las nanopartículas de oro en la producción de alimentos

Otro importante campo de aplicación de las AuNPs es la industria de los alimentos, donde se las utiliza como parte integrante de nanocompuestos poliméricos. Éstos (que además de AuNPs pueden incluir otras nanopartículas de plata, de óxido de zinc o de óxido de aluminio) se utilizan en la fabricación de envases con propiedades antimicrobianas o para incrementar la resistencia a la abrasión de los envases (Chaudhry y col. 2008). Asimismo, ya se han elaborado indicadores de tiempo-temperatura a partir de AuNPs (Robinson y Morrison 2010). La empresa Timestrip UK Ltd. ha desarrollado un dispositivo a partir de oro coloidal, que permite establecer si los alimentos procesados y congelados, han sido mantenidos a temperatura adecuada a lo largo de la cadena de producción y distribución. El funcionamiento de este dispositivo adherido al envase, se basa en un fenómeno simple, ya que a temperaturas inferiores a la de congelación, se produce una aglomeración irreversible de las AuNPs dando lugar a una solución transparente. Por otra parte, cuando la temperatura sobrepasa el valor establecido, las AuNPs coloidal se dispersan en la suspensión, dando como resultado un color rojo intenso.

Una de las aplicaciones más interesantes de las AuNPs en el sector alimentario es el desarrollo de etiquetas de identificación por radiofrecuencia (RFID). Estos dispositivos permiten monitorizar determinados ítems a lo largo de toda la cadena de suministro, aumentando la eficacia y la rapidez de la distribución de

los productos. Para la impresión de estas etiquetas se utilizan materiales con propiedades electrónicas muy particulares, como AuNPs, de plata y de cobre (Subramanian y col. 2005).

Aspectos legales

A pesar de sus múltiples aplicaciones, actualmente en Europa no existe legislación específica sobre la nanotecnología y los nanomateriales, aunque éstos entran dentro de la definición de “sustancia” incluida en la Regulación Europea de Sustancias Químicas (REACH) (Reglamento n° 1907/2006 del Parlamento, de 18 de diciembre de 2006).

En mayo de 2011, y en respuesta a una petición de la Comisión Europea, la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó la primera guía práctica para la evaluación del riesgo de la nanotecnología en alimentos y piensos. Esta guía contiene los procedimientos estandarizados necesarios para la caracterización física, química y toxicológica de los nanomateriales sujetos a evaluación en vista a su posible autorización, para su uso en alimentos y piensos. En 2012, la EFSA publicó el informe anual de la red de trabajo sobre la evaluación de riesgos de la nanotecnología en alimentos y piensos, con el fin de profundizar en la armonización de la evaluación del riesgo asociado a la nanotecnología en la Unión Europea (Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) 2012).

No obstante, el proceso de normalización de esta tecnología se encuentra aún en una fase de recopilación de datos y todavía no es posible una evaluación general de riesgo para el uso de las nanotecnologías en el ámbito de la salud pública y la industria. Los resultados del proceso de evaluación determinarán las medidas de gestión necesarias que deberán implementar los organismos competentes (Frejo y col. 2011).

Toxicidad de nanopartículas

En virtud de sus numerosas aplicaciones, debemos asumir que la exposición humana a las AuNPs aumentará de forma sustancial en los próximos años, pudiendo tener repercusiones para la salud y el medio ambiente (Nowack y Bucheli 2007). Por ello, se impone la necesidad de evaluar los riesgos potenciales de las AuNPs y del resto de nuevos nanomateriales a fin de comprobar su potencial de riesgo (Maynard y col. 2006). En este contexto nace la “Nanotoxicología”, un campo de investiga-

ción emergente en el que, hasta el momento, son pocos los estudios publicados (Singh y col. 2009).

Los principales factores que determinan los efectos tóxicos de los nanomateriales en el organismo se pueden dividir en: factores que dependen de la exposición (vía de entrada, concentración y duración de la exposición), factores que dependen del organismo expuesto (susceptibilidad individual) y factores relacionados con la toxicidad intrínseca de la sustancia (factores físicos y químicos) (Rosell y Pujol 2010).

Existen tres vías principales a través de las cuales las personas pueden estar expuestas a los nanomateriales: inhalatoria, dérmica y oral. La vía de entrada más común de las nanopartículas al organismo es la inhalatoria (Uboldi y col. 2009). Las partículas ingresan al organismo por esta vía y, dependiendo de su tamaño, pueden ser exhaladas o bien depositarse en los diferentes compartimentos del aparato respiratorio (Nel 2005). Una vez depositadas en los pulmones, las nanopartículas pueden alcanzar el torrente circulatorio y distribuirse por otros órganos diana (Stone y col. 2007).

Las nanopartículas también pueden ingresar al organismo por vía dérmica, particularmente en el ambiente laboral, al depositarse sobre la piel, aunque esta vía de ingreso también puede ser utilizada por las nanopartículas presentes en cosméticos y cremas solares que las contienen (Tinkle y col. 2003). Desde la dermis es posible que las partículas alcancen la circulación linfática y sanguínea. La ingestión es una de las rutas más probables por la que las nanopartículas pueden ingresar al organismo (Böckman y col. 2000). Esto puede ocurrir de modo accidental, por la manipulación de nanomateriales, pudiendo pasar de las manos a la boca por una falta de higiene o también por la ingestión de alimentos que las contengan (Handy y Shaw 2007).

Una propiedad específica de las nanopartículas es su capacidad para atravesar las barreras biológicas mediante un proceso denominado “translocación” (Gálvez y Tanarro 2010). Este término se refiere a un proceso mediante el cual las nanopartículas atraviesan las barreras biológicas y pueden encontrarse en otras partes del organismo, distintas a las del punto de ingreso, pero manteniendo su integridad como partícula (es decir, sin que se produzca disolución).

Las partículas que ingresan a través del tejido

pulmonar son transportadas por la sangre y la linfa y pueden alcanzar diferentes órganos. Así, aunque el principal órgano diana es el hígado (Sonavane y col. 2008), algunos estudios han demostrado la localización de nanopartículas en el corazón y los riñones (Oberdörster y col. 2005).

La toxicidad intrínseca de los nanomateriales (Figura 1) (Rivera-Gil y col. 2013) no depende solamente de la composición química de la sustancia, sino también del tamaño de partícula, ya que en general, el tamaño de partícula es inversamente proporcional a su actividad biológica (Paul y Lyons 2008).



Figura 1. Factores relacionados con la toxicidad intrínseca de los nanomateriales (Gálvez y Tanarro 2010).

Con la miniaturización de las partículas de una sustancia aumenta la superficie específica, y por tanto su potencial reactivo o catalítico que en algunos casos puede conducir a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Maurer-Jones y col. 2010). De aquí se desprende que cuanto más pequeña es una par-

tícula mayor es su reactividad, de modo que una sustancia que es inerte en la escala micro o macro puede resultar tóxica en la escala nano. Por otra parte, las nanopartículas pueden localizarse dentro de la célula, en orgánulos donde las partículas macroscópicas no llegan, mostrando respuestas celulares espe-

cíficas (Porter y col. 2009).

Además de la variable tamaño, se ha comprobado que la toxicidad también depende de la morfología de la partícula. La toxicidad de nanopartículas con forma tubular es mayor que las que presentan forma irregular, y es menor para nanopartículas esféricas (Albanese y col. 2010).

Las nanopartículas tienen, por lo general, tendencia a formar aglomerados o agregados (Oberdörster y col. 2005). Este fenómeno puede influir en el lugar de depósito de las nanopartículas en el organismo, dependiendo de su grado de agregación. El fenómeno de agregación también modifica la toxicidad, ya que una estructura relativamente compacta presenta una superficie específica menor que una estructura porosa o alineada.

Citotoxicidad de las nanopartículas de oro

Actualmente existe cierta controversia en torno a los posibles efectos citotóxicos inducidos por las AuNPs. Así, diversos estudios *in vitro* han destacado la inocuidad de las AuNPs para células humanas cérvico-uterinas cancerosas (HeLa) y en células dendríticas (Connor y col. 2005; Villiers y col. 2010). Por el contrario, se han comprobado respuestas citotóxicas en líneas celulares alveolares humanas (Uboldi y col. 2009), en macrófagos (Lanone y col. 2009) y en fibroblastos de piel (Pernodet y col. 2006) tras su exposición a las AuNPs.

El efecto citotóxico de las AuNPs parece depender de multitud de parámetros y, por ejemplo, en la bibliografía se encuentran trabajos donde se sugiere que el tamaño de las AuNPs afecta su toxicidad, distribución tisular, capacidad de penetración y su absorción celular (Johnston y col. 2010). Pan y col. (2007) evaluaron la citotoxicidad *in vitro* de AuNPs de diferentes tamaños (1 y 15 nm) en HeLa, fagocitos (J774A1) y fibroblastos (L929) de ratón. Los resultados obtenidos mostraron que el tamaño de las AuNPs influye en su comportamiento, de modo que las más pequeñas presentaron una distribución generalizada en los tejidos y toxicidad más elevada (Pan y col. 2007). Kang y col. (2009) estudiaron la citotoxicidad de AuNPs de distintos tamaños (4, 15, 100 y 200 nm) en células de linfoma murino (L5178Y) y observaron que únicamente las AuNPs de 4 nm reducían significativamente la viabilidad celular.

Asimismo, los resultados de los escasos trabajos sobre toxicidad de las AuNPs *in vivo* publicados hasta el momento, demuestran que

la citotoxicidad está fuertemente determinada por el tamaño de partícula. También se ha investigado la permeabilidad de tejidos aislados de intestino de rata a las AuNPs de diferentes tamaños (15, 102 y 198 nm), observándose que la capacidad de penetración de las AuNPs depende del tamaño y del tiempo de contacto, de modo que las partículas más pequeñas penetran cuali-cuantitativamente de forma más eficiente al aumentar el tiempo del ensayo (Sonavane y col. 2008). De Jong y col. (2008) analizaron la distribución de las AuNPs de diferentes tamaños (10, 50, 100 y 250 nm) en ratas, 24 horas después de su administración intravenosa. Todas las AuNPs se acumularon principalmente en el hígado y en el bazo. No obstante, las AuNPs de menor tamaño (10 nm) se distribuyeron más ampliamente y alcanzaron un mayor número de órganos que las de mayor tamaño, demostrando que el tamaño de la AuNPs afecta su distribución.

Tal como fuera mencionado más arriba, la citotoxicidad de las AuNPs también depende de las líneas celulares expuestas. Choi y col. (2012) demostraron que tras 24 h de tratamiento, las AuNPs de 17 nm de diámetro provocaron diferentes efectos citotóxicos en células humanas de carcinoma pulmonar (A549 y NCI-H1975) y en células epidermoides (A431), obteniendo valores de $IC_{50} = 48,9; 52,3$ y $65,2 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. En otro estudio llevado a cabo por Coulter y col. (2012) en células cancerosas de próstata y de mama tratadas con partículas de AuNPs de 1,9 nm se obtuvieron valores de $IC_{50} = 838$ y $1028 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. En el año 2005, Tsoli y colaboradores evaluaron la citotoxicidad de AuNPs, demostrando sensibilidad específica para cada una de las once líneas celulares empleadas (incluyendo células óseas, epiteliales y de hepatoma). Asimismo, Patra y col. (2007), observaron disminución en la viabilidad de las células A549 (carcinoma pulmonar) tras el tratamiento con AuNPs de 33 nm, mientras que las células HepG2 (hepatoma) no experimentaron un cambio significativo en su viabilidad bajo las mismas condiciones. Todos estos estudios corroboran el hecho de que la línea celular utilizada es un factor determinante en la evaluación de la citotoxicidad inducida por las AuNPs.

A pesar de que las posibles aplicaciones de las AuNPs resultan prometedoras, también resulta evidente que las AuNPs representan un riesgo potencial para la salud humana. Los estudios disponibles sobre la toxicidad de las

AuNPs son muy escasos y en ocasiones contradictorios. Por estos motivos resulta necesario el desarrollo de un mayor número de estudios sobre los efectos tóxicos de las AuNPs, con el fin de establecer condiciones seguras para su utilización en los diferentes campos de aplicación.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se ha realizado gracias al proyecto de investigación AGL2010-16561 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (España).

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Albanese A., Sykes E.A., Chan W.C. Rough around the edges: The inflammatory response of microglial cells to spiky nanoparticles. *ACS Nano*. 2010;4(5):2490-2493.

Al-Qadi S., Remuñán-López C. Nanopartículas metálicas: oro. En: Real Academia Nacional de Farmacia. Nanotecnología farmacéutica. Madrid; 2009. pp. 223-248.

Auffan M., Rose J., Bottero J.Y., Lowry G.V., Jolivet J.P., Wiesner M.R. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol*. 2009;4(10):634-641.

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria; EFSA Scientific Network for Risk Assessment of Nanotechnologies in Food and Feed. [en línea]. Supporting Publications 2012 [consulta : 23 de mayo de 2013] EN-362. [9pp.]. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/publications/>.

Böckman J., Lahl H., Eckert T., Unterhalt B. Titan-Blutspiegelvor und nach Belastungsversuchen mit Titandioxid. *Pharmazie*. 2000;55(1):140-143.

Chaudhry Q., Scotter M., Blackburn J., Ross B., Boxall A., Castle L., Aitken R., Watkins R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2008;25(3):241-258.

Chen P.C., Mwakwari S.C., Oyelere A.K. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnol Sci Applications*. 2008;1(1): 45-66.

Choi S.Y., Jeong S., Jang S.H., Park J., Park J.H., Ock K.S., Lee S.Y., Joo S. In vitro toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro*. 2012;26(2):229-237.

Comisión Europea. Introduction to nanotechnologies. [en línea]. Bruselas; c1995-2013 [actualizado: 23 de abril de 2013; consulta: 23 de abril de 2013]. Disponible en: <http://ec.europa.eu/nanotechnology/>.

Connor E.E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C.J., Wyatt M.D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*. 2005;1(3):325-327.

Coulter J.A., Jain S., Butterworth K.T., Taggart L.E., Dickson G.R., McMahon S.J., Hyland W.B., Muir M.F., Trainor C., Hounsell A.R., O'Sullivan J.M., Schettino G., Currell F.J., Hirst D.G., Prise K.M. Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2012;7(1):2673-2685.

De Jong W.H., Hagens W.I., Krystek P., Burger M.C., Sips A.J., Geertsma R.E. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*. 2008;29(12):1912-1919.

Frejo M.T., Díaz M.J., Lobo M., Capó M. Nanotoxicología ambiental: retos actuales. *Medicina balear*. 2011;26(2):36-46.

Gálvez V., Tanarro C. Toxicología de las nanopartículas. Seguridad y salud en el trabajo. 2010;(56):6-12.

Han G., Martin C.T., Rotello V.M. Stability of gold nanoparticle-bound DNA toward biological, physical, and chemical agents. *Chem Biol Drug Des*. 2006;67(1):78-82.

Handy R.D., Shaw B.J. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: Implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health, Risk & Society*. 2007;9(2):125-144.

Higby G.J. Gold in medicine: A review of its use in the west before 1900. *Gold Bull*. 1982;15(4):130-40.

Hong R., Han G., Fernandez J.M., Kim B.J., Forbes N.S., Rotello V.M. Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J Am Chem Soc.* 2006;128(4):1078-1079.

Jain P.K., Huang X., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc Chem Res.* 2008;41(12):1578-1586.

Johnston H.J., Hutchison G., Christensen F.M., Peters S., Hankin S., Stone V. A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 2010;40(4):328-346.

Jos A., Pichardo S., Puerto M., Sanchez E., Griolo A., Camean A.M. Cytotoxicity of carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line caco-2. *Toxicol In Vitro.* 2009;23(8):1491-1496.

Kang J.S., Yum Y.N., Kim J.H., Song H., Jeong J., Lim Y.T., Chung B.H., Park S.N. Induction of DNA damage in L5178Y cells treated with gold nanoparticle. *Biomolecules & Therapeutics.* 2009;17:92-97.

Lanone S., Rogerieux F., Geys J., Dupont A., Maillot-Marechal E., Boczkowski J., Lacroix G., Hoet P. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol.* 2009;6:14.

Maurer-Jones M.A., Bantz K.C., Love S.A., Marquis B.J., Haynes C.L. Toxicity of therapeutic nanoparticles. *Nanomedicine.* 2009;4(2):219-241.

Maynard A.D., Aitken R.J., Butz T., Colvin V., Donaldson K., Oberdorster G., Philbert M.A., Ryan J., Seaton A., Stone V., Tinkle S.S., Tran L., Walker N.J., Warheit D.B. Safehandling of nanotechnology. *Nature.* 2006;444(7117):267-269.

Nel A. Air pollution-related illness: Effects of particles. *Science.* 2005;308(5723):804-806.

Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.*

2006;311(5761):622-627.

Nowack B., Bucheli T.D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ Pollut.* 2007;150(1):5-22.

Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113(7):823-839.

Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W., Jahn-Dechent W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small.* 2007;3(11):1941-1949.

Patra H.K., Banerjee S., Chaudhuri U., Lahiri P., Dasgupta A.K. Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine.* 2007;3(2):111-119.

Paul J., Lyons K. Nanotechnology: the next challenge for organics. *J. Org. Syst.* 2008;3(1):3-22.

Pernodet N., Fang X., Sun Y., Bakhtina A., Ramakrishnan A., Sokolov J., Ulman A., Raifailovich, M. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small.* 2006;2(6):766-773.

Porter A.E., Gass M., Bendall J.S., Muller K., Goode A., Skepper J.N., Midgley P.A., Welland M. Uptake of noncytotoxic acid-treated single-walled carbon nanotubes into the cytoplasm of human macrophage cells. *ACS Nano.* 2009;3(6):1485-1492.

Rivera-Gil P., Jimenez De Aberasturi D., Wulf V., Pelaz B., Del Pino P., Zhao Y., De La Fuente J.M., Ruiz De Larramendi I., Rojo T., Liang X.J., Parak W.J. The challenge to relate the physicochemical properties of colloidal nanoparticles to their cytotoxicity. *Acc Chem Res.* 2013;46(3):743-749.

Robinson D.K.R., Morrison M.J. Nanotechnologies for food packaging: Reporting the science and technology research trends: Report for the Observatory NANO; 2010 Aug.

Rosell M.G., Pujol L. Riesgos asociados a la nanotecnología. Madrid: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo; 2009. Notas Técnicas de Prevención, serie 23ª;797.

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175(1):184-191.

Sonavane G., Tomoda K., Sano A., Ohshima H., Terada H., Makino K. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008;65(1):1-10.

Stone V., Johnston H., Clift M.J. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: Cellular and molecular interactions. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2007;6(4):331-340.

Subramanian V., Frechet J.M.J., Chang P.C., Huang D.C., Lee J.B., Molesa S.E., Murphy A.R., Redinger D. R. Progress toward development of all-printed RFID tags: Materials, processes, and devices. *Proc. of the IEEE.* 2005;93:1330-1338.

The Project on Emerging Nanotechnologies. Nanotechnology Consumer Products Inventory. [en línea]. Washington; 2005 [actualizado: 10 marzo de 2011; consulta: 20 mayo de 2013]. Disponible en <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>.

Tinkle S.S., Antonini J.M., Rich B.A., Roberts J.R., Salmen R., DePree K., Adkins E.J. Skin as a route of exposure and sensitization in

chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.* 2003;111(9):1202-1208.

Tsoli M., Kuhn H., Brandau W., Esche H., Schmid G. Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters. *Small.* 2005;1(8-9):841-844.

Uboldi C., Bonacchi D., Lorenzi G., Hermanns M.I., Pohl C., Baldi G., Unger R.E., Kirkpatrick C.J. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Part Fibre Toxicol.* 2009;6:18.

Unión Europea. Recomendación de la Comisión, de 18 de octubre de 2011, relativa a la definición de nanomaterial. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 20 de octubre de 2011, núm. 275, pp. 38-40.

Unión Europea. Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 18 de diciembre de 2006, núm. 396, pp.1-852.

Villiers C., Freitas H., Couderc R., Villiers M.B., Marche P. Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: Effect on dendritic cell functions. *J Nanopart Res.* 2010;12(1):55-60.