



## **NANOPARTÍCULAS DE PLATA: APLICACIONES Y RIESGOS TÓXICOS PARA LA SALUD HUMANA Y EL MEDIO AMBIENTE**

### **SILVER NANOPARTICLES: APPLICATIONS AND TOXIC RISKS TO HUMAN HEALTH AND ENVIRONMENT**

**Ávalos, A, Haza, AI, Mateo, D y Morales, P\***

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. UCM.

\*Correspondencia: [pmorales@vet.ucm.es](mailto:pmorales@vet.ucm.es)

#### **RESUMEN**

Se estima que de todos los nanomateriales utilizados en productos para el consumo, las nanopartículas de plata (AgNPs) son las que tienen un mayor grado de comercialización. Se utilizan en electrónica, ropa, pinturas, cosméticos, bactericidas, biofungicidas, aplicaciones biomédicas, en la industria médico-farmacéutica y alimentaria. Por ello, se hace tremendamente necesario que los productos fabricados con nanopartículas así como sus aplicaciones sean seguros tanto para la salud de las personas como del medio ambiente. Algunos estudios han mostrado que la toxicidad intrínseca de las AgNPs depende de una serie de factores como son el tamaño, la forma, el área superficial, la carga superficial, la solubilidad y el estado de aglomeración. Asimismo, numerosas investigaciones *in vitro* indican que las AgNPs son tóxicas para las células de mamífero. Además, consecuencias inflamatorias, oxidativas y genotóxicas están asociadas con la exposición de AgNPs. Este artículo muestra una visión global de las principales aplicaciones de las AgNPs, sus vías de exposición, sus efectos tóxicos y los mecanismos de toxicidad implicados.

**Palabras clave:** Nanopartículas de plata, aplicaciones, riesgos tóxicos.

## ABSTRACT

It is estimated that of all the nanomaterials used in consumer products, silver nanoparticles (AgNPs) currently have the highest degree of commercialization. They are used in electronics, clothing, paints, cosmetic, bactericides, bio-fungicides, biomedical applications, in the medical-pharmaceutical industry and food industry. Therefore, it is extremely necessary that products made with nanoparticles as well as their applications are safe for the health and the environment. Some studies have shown that the intrinsic toxicity of AgNPs depend on a range of factors such as, size, shape, surface area, surface charge, solubility and state of agglomeration. In addition, a number of *in vitro* studies indicate that AgNPs are toxic to mammalian cells. Furthermore, inflammatory, oxidative and genotoxic consequences are associated with AgNPs exposure. This paper shows a global view of the main applications of AgNPs, their routes of exposure, toxic effects and toxicity mechanisms involved.

**Keywords:** Silver nanoparticles, applications, toxic risks.

## INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, la investigación en ciencia y tecnología se ha centrado en la fabricación de estructuras atómicas y materiales a escalas nanométricas ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ), lo que comúnmente se conoce como “Nanotecnología” (Savage et al., 2007). Esta nueva ciencia multidisciplinar proporciona productos con nuevas propiedades fisicoquímicas diferentes a las de las moléculas individuales o sólidos de la misma composición (Medina et al., 2007). La segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales (Comisión Europea, 2012), define nanomaterial como «un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% 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».

Las fuentes de nanopartículas (NPs) pueden ser clasificadas como naturales o como derivadas de actividades antropogénicas intencionales o accidentales (**Figura 1**). En teoría, las NPs pueden ser producidas a partir de casi cualquier producto químico, sin embargo, la mayoría de las NPs que están actualmente en uso hoy en día, han sido fabricadas a partir de metales de transición, silicio, carbono y óxidos de metal. Según Lux Research Inc (Lux report, 2008), los nanotubos de carbón, los fullerenos, los nanomateriales que contienen

metales (incluyendo cerámicas y puntos cuánticos) y los dendrímeros son los nanomateriales más importantes.

Las propiedades exhibidas por los “nanomateriales” son inmensamente diferentes a las que exhiben estos mismos materiales en una macroescala (Jos et al., 2009). Las NPs poseen una mayor relación de superficie-volumen y por tanto una mayor superficie de contacto con el entorno (Maurer-Jones et al., 2010). Esto hace que los nanomateriales sean muy atractivos para su explotación en múltiples sectores (Johnston et al., 2010) y que la nanotecnología se expanda a un gran ritmo. Así, se ha pasado en muy poco tiempo de una situación en la que prácticamente no existían nanomateriales en nuestro entorno, a estar rodeados por una gran variedad de productos que los contienen en su composición.



**Figura 1.** Fuentes comunes de nanopartículas en el medio ambiente. (Smita et al., 2012).

En la actualidad el inventario de productos para el consumo indica que hay 1317 productos que contienen nanomateriales ([www.nanotechproject.org/inventories](http://www.nanotechproject.org/inventories)). Las principales aplicaciones se muestran en la **Figura 2**. Productos para la electrónica, la informática, la industria textil, la industria alimentaria, en medicina, etc... (Cohen et al., 2007; Cheng et al., 2004). En concreto, en la industria alimentaria la nanotecnología tiene su aplicación en áreas como la calidad y seguridad alimentaria, el desarrollo de nuevos alimentos

y en el envasado (Almengor, 2009). Se espera que las aplicaciones de la nanotecnología proporcionen beneficios al sector alimentario, entre ellos, un menor uso de grasas, nuevos sabores y texturas, así como mejoras en la absorción de nutrientes y en el envasado (ObservatoryNano, 2009).



**Figura 2.** Principales aplicaciones de la nanotecnología.

El desarrollo de la nanotecnología, no obstante, tiene que ir acompañado de estudios de toxicidad que permitan conocer los efectos que estas NPs van a tener tanto en la salud humana como en el medio ambiente. Actualmente no existe ninguna legislación específica sobre la nanotecnología y los nanomateriales, aunque éstos están dentro de la definición de “sustancia” incluida en la Regulación Europea de sustancias químicas (REACH). En este sentido, la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria publicó una Guía de Orientación para evaluar los riesgos de las aplicaciones de la nanociencia y de las nanotecnologías en los alimentos y en la cadena alimentaria (EFSA Journal, 2011). Una de sus recomendaciones consistía en la necesidad de desarrollar, mejorar y validar metodologías rutinarias para estudiar en profundidad la toxicidad de las NPs, dado el gran número de nuevos nanomateriales que hay en el mercado. Además, es muy importante considerar el posible paso de las NPs a los alimentos. Por ello, se sugería que la evaluación del riesgo potencial de las NPs debe realizarse caso por caso de forma

individual, teniendo en cuenta el nanomaterial, su tamaño y si van a ingerirse como tal, ya que entonces serían necesarios estudios de toxicidad y genotoxicidad apropiados.

En 2012, la EFSA publicó su 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. No obstante, parece que nos encontramos todavía en una fase de recopilación de datos y aún no se puede llevar a cabo una evaluación del riesgo general del uso de las nanotecnologías en el contexto de la salud pública. Será en función de los resultados de esa evaluación cuando se tendrán que poner en marcha medidas de gestión por parte de los organismos reguladores. Así pues, las medidas necesarias deberían incluir pruebas toxicológicas especialmente adaptadas, reglamentar la introducción de productos en el mercado y adoptar normas de etiquetado en productos de consumo. En este sentido, el Reglamento 1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor incluye la definición de “nanomaterial artificial” y obliga a etiquetar todos los ingredientes presentes en forma de nanomateriales artificiales. Además señala que los nanomateriales artificiales deberán indicarse claramente en la lista de ingredientes, seguidos de la palabra “nano” entre paréntesis. Sin embargo, todavía son necesarias normas claras para proteger a las personas y al medio ambiente, pero también para que las empresas puedan asumir sus responsabilidades y evaluar el potencial de la inversión en nanotecnologías (Frejo et al., 2011).

Debido a la actividad antimicrobiana que presenta la plata, las nanopartículas de plata (AgNPs) son uno de los nanomateriales más comúnmente utilizados (Piao et al., 2011). Por ello, en este artículo se pretende presentar una visión global de las principales aplicaciones de las nanopartículas de plata, de sus principales vías de exposición, de sus efectos tóxicos y de los mecanismos de toxicidad implicados.

## **APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)**

La plata (Ag) ha sido ampliamente utilizada desde hace miles de años en la historia de la humanidad, en aplicaciones como la joyería, utensilios, fotografía, etc. (Chen y Schluesener, 2008). Incluso civilizaciones antiguas como los griegos utilizaban la plata para cocinar y mantener la seguridad del agua. Sus propiedades antimicrobianas ya se explotaban antiguamente con la medicina tradicional (Behera et al., 2011).

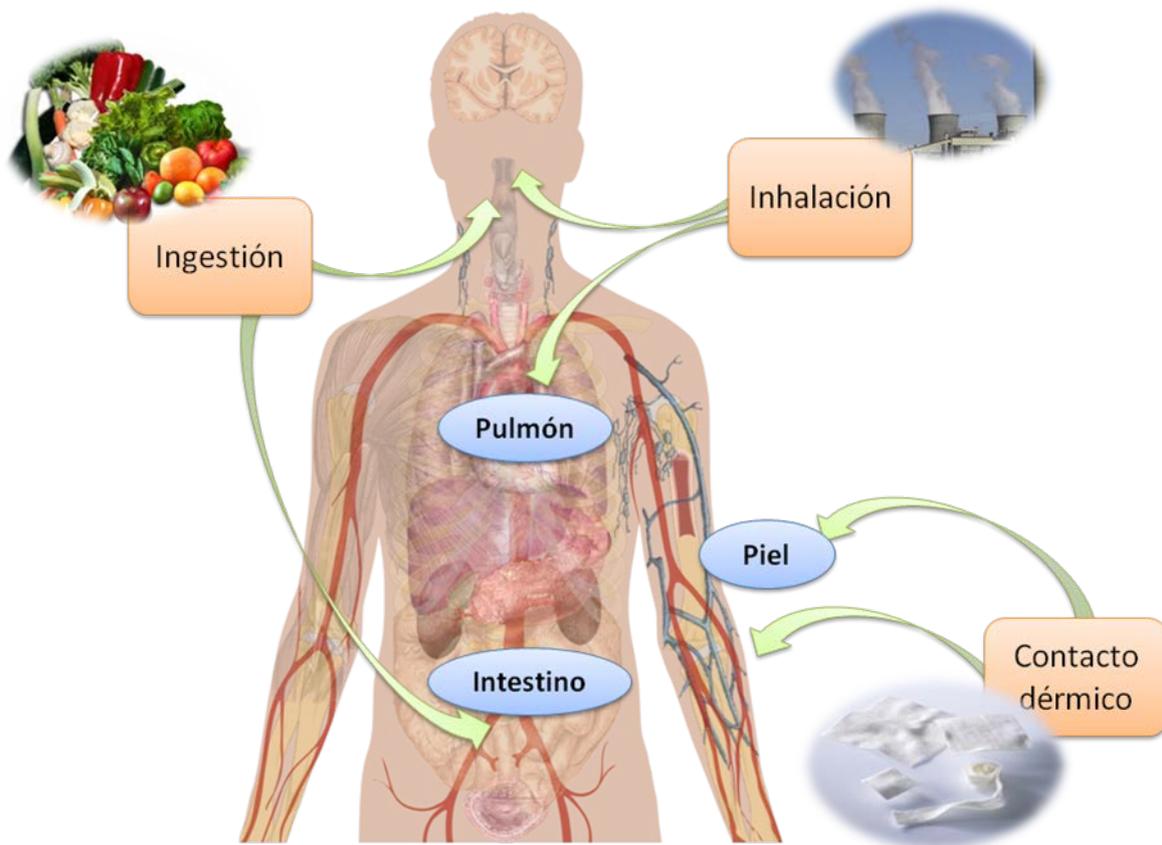
En los últimos años, la plata ha ganado mucho interés debido a su buena conductividad, estabilidad química y su actividad catalítica y antibacteriana. Las AgNPs se están convirtiendo en una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología, según un informe de investigación de mercado realizado por Bourne research (<http://www.bourneresearch.com>). Su fuerte actividad antimicrobiana es la principal característica para el desarrollo de productos con AgNPs, actualmente, una amplia categoría de productos se encuentran disponibles en el mercado. En el ámbito médico, existen apósitos para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos ellos recubiertos o integrados con AgNPs para así evitar el crecimiento bacteriano (Cheng et al., 2004; Cohen et al., 2007). Además, también se está evaluando la utilización de las AgNPs contra el tratamiento de enfermedades que requieren una concentración mantenida de fármaco en sangre o con un direccionamiento específico a células u órganos (Panyman et al., 2003), como ocurre con el virus del VIH-1, ya que ha sido demostrado que el tratamiento *in vitro* con AgNPs interacciona con el virus e inhibe su capacidad para unirse a las células del huésped (Elechiguerra et al., 2005). En la vida diaria los consumidores pueden tener contacto con las AgNPs contenidas en aerosoles, detergentes, frigoríficos, lavadoras, chupetes, sistemas de purificación de aguas, pinturas para paredes y productos cosméticos (Zhang y Sun, 2007). Las AgNPs también están incorporadas en la industria textil para la fabricación de prendas de vestir, ropa interior y calcetines (Lee et al., 2007). Mediante la introducción de AgNPs en fibras sintéticas o naturales consiguen una potenciación de la actividad iónica gracias a la mayor cantidad de iones plata que son liberados. El resultado es la obtención de rápidos efectos antimicrobianos ó antiolor (Chen and Chiang, 2008).

Finalmente, las AgNPs también tienen su aplicación en el sector alimentario, concretamente en agricultura y en el envasado de los alimentos. Dentro del campo de la agricultura, las AgNPs se emplean para prolongar la conservación de frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos. Estas NPs pueden aplicarse junto con un recubrimiento biodegradable en los frutos, mediante la inmersión de los mismos en la solución formadora de recubrimiento (Aguilar, 2009). Además, las AgNPs también son empleadas en la fabricación de materiales en contacto con los alimentos, eliminando hasta en un 90% el crecimiento de microorganismos en los alimentos (ObservatoryNANO, 2009), siendo una alternativa a otros métodos de conservación de alimentos que emplean la radiación, tratamiento térmico,

almacenamiento a baja temperatura, o la introducción de aditivos antimicrobianos (Brody et al., 2008).

### EXPOSICIÓN A LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)

En vista de las diversas aplicaciones de las AgNPs, la exposición humana a las mismas puede tener lugar a través de los alimentos, el aire y por contacto (**Figura 3**), por lo que las vías de exposición oral, respiratoria y dérmica son las más relevantes (Johnston et al., 2010). Otra vía de exposición que está aumentando en importancia es a través del tracto genital femenino, ya que se están incorporando AgNPs en productos de higiene materna (Zhang y Sun, 2007).



**Figura 3.** Principales vías de exposición de las AgNPs.

#### Vía oral

Todos los materiales administrados por vía oral están en estrecho contacto con el tracto gastrointestinal que tiene un área superficial total de hasta 200 m<sup>2</sup> para el intercambio

de nutrientes. Además las AgNPs dispensadas a partir del sistema respiratorio pueden terminar en el tracto gastrointestinal.

La ingestión de partículas de plata en suspensión está asociada con una serie de consecuencias perjudiciales, incluyendo úlceras intestinales y argiria (Wadhwa y Fung, 2005). Luoma, Samuel N (PEN 15, September 2008), sugirió que tras la ingestión de la plata es probable que se convierta en su forma iónica debido al pH ácido del estómago. Debido a la mayor área superficial de las nanopartículas, esto podría ocurrir también con las AgNPs. Los mecanismos cinéticos de translocación de las AgNPs tampoco están claros, pero se ha demostrado que el tejido linfóide del intestino (placas de Peyer) pueden captar las AgNPs intestinales (Smith et al., 1995). Además, la captación también puede tener lugar transcelularmente a través de los enterocitos o a través de vías paracelulares (Jani et al., 1990). Varias investigaciones sugieren que tras la exposición oral de las AgNPs, es probable que las AgNPs ó los iones plata se trasladen desde el intestino al torrente sanguíneo, por tanto pasen a la vía sistémica y a partir de ahí causen síntomas como la argiria y consecuencias perjudiciales como daño en el hígado. Todos los trabajos coinciden en que el órgano diana de las AgNPs es el hígado, dentro del hígado, se sugiere que los macrófagos contenidos dentro del sistema reticuloendotelial, son los principales responsables de eliminar las AgNPs de la circulación. Además también se han observado depósitos de AgNPs en los riñones, cerebro, pulmones y testículos (Kim et al., 2009; Van der Zande et al., 2012). A pesar de estas investigaciones, se requieren más estudios para esclarecer la toxicocinética de estas AgNPs.

### **Vía respiratoria**

El sistema respiratorio es la principal vía de entrada para las partículas ambientales. La inhalación de partículas ultrafinas (equivalentes a las NPs en tamaño), está asociada con efectos pulmonares y cardiovasculares adversos (Pope y Dockery, 2006).

Tras la inhalación de AgNPs se han observado depósitos en la cavidad nasal, en la región alveolar de los pulmones y ganglios linfáticos pulmonares (Takenaka et al., 2001). Estas NPs depositadas provocan una respuesta inflamatoria, ya que la fagocitosis de las AgNPs puede conducir a la activación de macrófagos alveolares y la liberación de quimiocinas, citoquinas, especies reactivas de oxígeno (EROs) y otros mediadores que originan como resultado una continua inflamación (Sung et al., 2009). Las partículas acumuladas en la región alveolar, se pueden eliminar a través de tres rutas importantes. La

primera, a través del sistema mucociliar a lo largo del tracto traqueobronquial, la segunda ruta a través del sistema linfático y por último, la tercera, a partir de la disolución de las NPs que tiene como consecuencia la incorporación de estas NPs al torrente sanguíneo (Takenaka et al., 2000). Esta última puede ser entre otras la causa de la presencia de NPs en sangre después de una exposición por inhalación de AgNPs, sugiriendo que la eliminación de estas pueda ser también a través de otro órgano o vía de excreción (Takenaka et al., 2001). Los órganos secundarios donde se han encontrado depósitos de AgNPs son principalmente el hígado, y en menor medida en riñones, páncreas, corazón, bulbo olfatorio y cerebro (Sung et al., 2009; Takenaka et al., 2001). Es importante la presencia de plata dentro del bulbo olfatorio y el cerebro, ya que esto sugiere que las AgNPs además de distribuirse a través de la sangre, también se pueden distribuir a través del sistema nervioso (Sung et al., 2009).

### **Vía dérmica**

Una de las funciones de la piel es proteger a los órganos subyacentes. El estrato de la capa córnea de la epidermis es una fuerte barrera que permite una penetración muy limitada de partículas. La explotación de las AgNPs dentro de productos textiles y apósitos para heridas permite que las AgNPs entren en contacto directo con la piel, cuya estructura y/o función puede verse comprometida antes de la exposición, como ocurre con los apósitos para heridas y quemaduras.

La penetración transdermal de finas partículas a través de piel intacta ha sido documentada, sin embargo existen muy pocos datos sobre las AgNPs (Tinkle et al., 2003). En estudios con piel dañada se han observado, tras la exposición de AgNPs, depósitos de plata dentro de la piel, lo que se conoce como argiria. Las NPs pueden ser fagocitadas por los queratinocitos epidérmicos desencadenando una respuesta inflamatoria (Monteiro- Riviere et al., 2005). Además también se ha observado un aumento de enzimas hepáticas que sugiere que el hígado ha sido dañado como consecuencia del tratamiento con AgNPs. Este hecho pone en evidencia la disponibilidad de las AgNPs en la vía sistemática después del contacto dermal (Trop et al., 2006). Por tanto, es probable que la exposición de las AgNPs en la piel dañada permita el acceso a las NPs y a través de los capilares dermales a la circulación sanguínea y así ejercer su toxicidad en sitios distales, ya que la estructura y la función del estrato córneo está comprometida. Además también se reconoce que la permeabilidad de las NPs dentro de la piel normal puede ser influida por su habilidad a acceder a capas más

profundas de la piel a través de folículos pilosos o conductos de sudor, donde la función barrera de la piel está alterada y es más débil (Hoet et al., 2004). Aunque todavía no hay nada evidenciado.

### **Otras vías**

La exposición humana también puede ocurrir a través de inyecciones intravenosas de AgNPs, como por ejemplo en la liberación y/o direccionamiento de fármacos. Las células endoteliales localizadas en la superficie luminal de los vasos sanguíneos son esenciales para la generación de nuevos vasos a partir de los ya existentes o por una nueva angiogénesis (Clapp et al., 2006). Rosas-Hernandez et al. (2009) estudiaron los efectos selectivos y específicos de las AgNPs inducidos en las células endoteliales coronarias y el tono vascular regular en los anillos de la aorta. Observaron que las AgNPs interaccionaron con las células endoteliales de dos maneras. A bajas concentraciones, las AgNPs actuaron como factores anti-proliferativos/ vasoconstrictores que perjudicaron la producción de óxido nítrico (NO). Sin embargo, a altas concentraciones, las AgNPs estimularon la proliferación/ vasorrelajación mediada por NO. Este estudio indica que los niveles de exposición de las AgNPs juegan un papel significativo en la toxicidad y puede tener otro impacto fisicoquímico.

Las AgNPs también pueden tener acceso al sistema reproductivo a través de una variedad de productos comerciales como dispositivos anticonceptivos y productos de higiene femenina. Existen muy pocos estudios sobre los efectos de las AgNPs en el tracto reproductivo. Braydich-Stolle et al. (2005) mostraron que las AgNPs causaban toxicidad en las células madre de la línea germinal *in vitro*. Este hecho es importante porque las AgNPs pueden acceder a los espermatozoides humanos y podrían causar problemas en la fertilidad. Sin embargo, se requiere una amplia investigación en la cinética de absorción y distribución así como la progresión de la toxicidad de las AgNPs expuestas a través de la vía reproductiva.

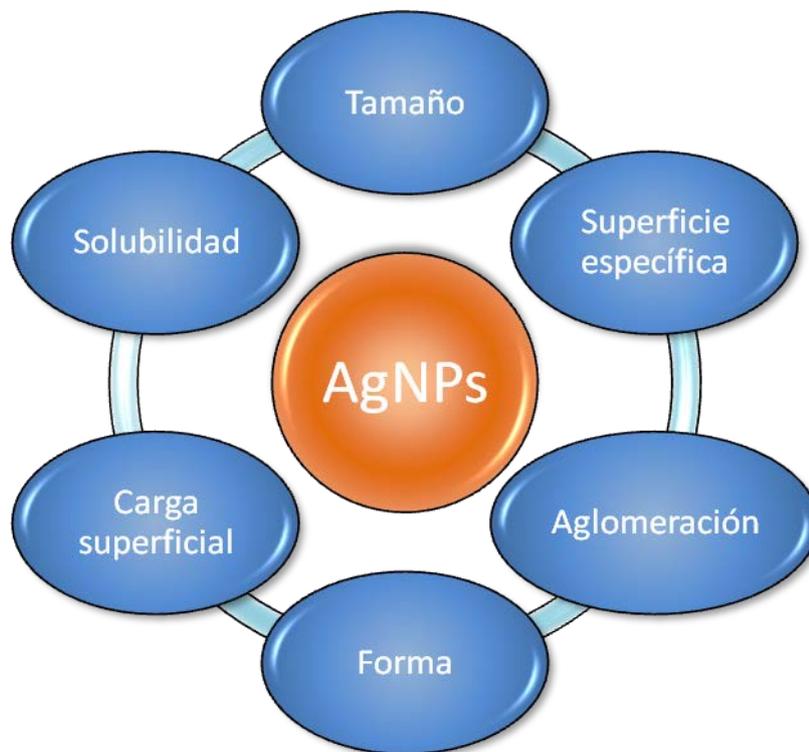
### **FACTORES QUE AFECTAN A LA TOXICIDAD INTRÍNSECA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)**

Investigaciones previas sugieren que existen diversas propiedades físico-químicas de las AgNPs (**Figura 4**) que están involucradas en su toxicidad intrínseca, como son

principalmente el tamaño, la superficie específica, estado de aglomeración, la forma, la solubilidad y la carga superficial (Carlson et al., 2008; Choi y Hu, 2008; Horie et al., 2012).

### Tamaño

El tamaño es una de las propiedades más importantes de las NPs. Muchas publicaciones han mostrado que la toxicidad de las AgNPs depende del tamaño (Carlson et al., 2008; Choi y Hu, 2008). Además, el tamaño de las AgNPs también influye en la distribución tisular (De Jong et al., 2008), en la penetración dermal e intestinal (Sonavane et al., 2008) y en la captación celular (Chithrani et al., 2006). En general, mayores efectos tóxicos han sido observados con las AgNPs más pequeñas.



**Figura 4.** Principales factores físico-químicos que afectan a la toxicidad intrínseca de las AgNPs.

### Superficie específica

El tamaño y la superficie específica de las NPs están en estrecha relación, ya que conforme disminuye el tamaño de las AgNPs la superficie específica aumenta dejando un mayor número de átomos expuestos en la superficie, que estarán disponibles para las

reacciones redox, reacciones fotoquímicas y para interacciones físico-químicas con las células. Además, también puede fomentar la disolución de los materiales, y por tanto dar lugar a liberación de iones plata ( $\text{Ag}^+$ ), que son potencialmente tóxicos (Kittler et al., 2010; Asharani et al., 2009). El área superficial también influye en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). Por ejemplo, con la misma concentración de AgNPs, AgNPs de un tamaño de 15 nm produjeron mayores niveles de EROs en macrófagos que AgNPs de 30 y 50 nm (Carlson et al., 2008).

### **Estado de aglomeración**

La estabilidad de las AgNPs también influye en la toxicidad. Las NPs tienen una tendencia natural a formar aglomerados o agregados (Oberdörster et al., 2005). Los aglomerados son grupos de partículas unidas mediante fuerzas relativamente débiles de tipo van der Waals, electrostáticas o de tensión superficial, que pueden redispersarse por medios mecánicos. Mientras que los agregados son grupos de partículas fuertemente asociadas cuya redispersión por medios mecánicos no resulta fácil. Estos dos fenómenos pueden cambiar el lugar de depósito de las AgNPs en el organismo, ya que un agregado o aglomerado de NPs se deposita en unas zonas u otras debido al distinto diámetro hidrodinámico. Además, también modifica la toxicidad, ya que al ser una estructura relativamente compacta, el área superficial es menor y por tanto la toxicidad también será menor (Galvez y Tanarro, 2010).

### **Forma**

La forma también influye en la toxicidad de las AgNPs. Se ha comprobado que las formas de triángulo truncado son más tóxicas que las formas esféricas y alargadas, ya que contienen más caras y por tanto son más reactivas (Pal et al., 2007). Siendo las esféricas las que presentan menor toxicidad.

### **Solubilidad**

La solubilidad en fluidos biológicos (diferentes pH, o presencia de sales) es otro parámetro importante. Cuando las NPs se disuelven pierden su estructura de NPs y las propiedades toxicológicas específicas de estas, siguiendo entonces consideraciones toxicológicas similares a las de otro contaminante con efectos sistémicos (Galvez y Tanarro,

2010). La liberación de  $\text{Ag}^+$  a partir de las AgNPs requiere más investigaciones, ya que todavía es difícil de interpretar si la toxicidad observada de las AgNPs se debe a las propias NPs o es debido a la liberación de iones  $\text{Ag}^+$ . Luoma (2008) sugirió que tras la ingestión de plata (no específicamente NPs) es probable que se convierta en la forma iónica debido al bajo pH del estómago.

### **Carga superficial**

Existen estudios donde se han observado una correlación directa entre la carga superficial y la toxicidad de las AgNPs. El Badawy et al. (2011) observaron que las AgNPs estabilizadas con citrato con cargas superficiales negativas fueron menos citotóxicas que las AgNPs con cargas superficiales positivas estabilizadas con polietilenimina ramificada.

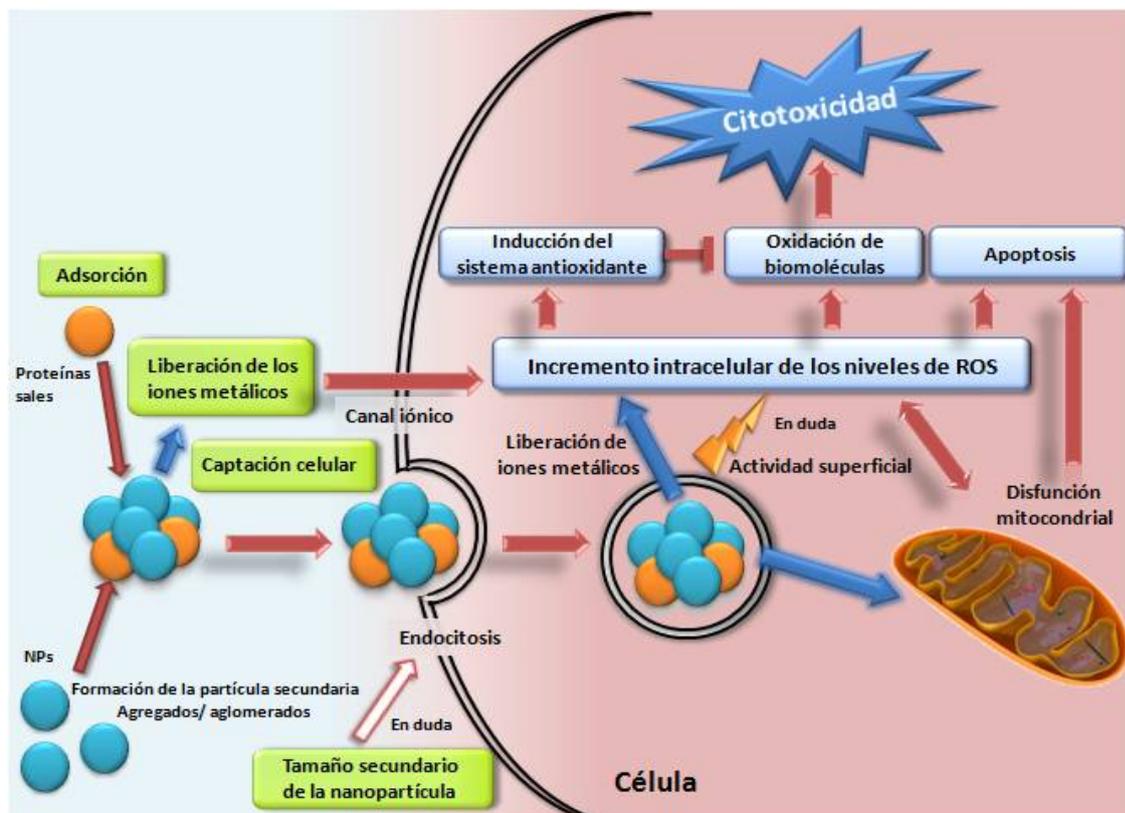
Como podemos observar, incluso con la misma composición química, las NPs presentan diferentes propiedades físico-químicas y estas diferencias son un factor importante para la influencia celular. Por tanto, es importantísimo realizar una caracterización detallada de cada una de las NPs antes de realizar cualquier otro ensayo de toxicidad, con el fin de entender las influencias celulares exactas de cada una de ellas, además de comprender y controlar la síntesis y las aplicaciones de las NPs. La caracterización de las NPs se puede llevar a cabo utilizando una variedad de técnicas como por ejemplo, el microscopio electrónico de transmisión (TEM) (determina el tamaño del núcleo metálico), el microscopio de fuerza atómica (AFM) (mide el tamaño de la NP y su distribución), el microscopio electrónico de barrido (SEM), y por último, a través de la dispersión de luz dinámica (DLS) (determina el radio hidrodinámico, esto es, el tamaño de la NP, núcleo + corona + capa de disolvente) (Choi et al., 2007; Yoosaf et al., 2007). La composición de las NPs se puede determinar utilizando la espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) (mide el estado de oxidación del elemento metálico), por resonancia magnética nuclear (RMN) (determina la corona orgánica de las NPs), por espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y por último, por espectrometría de absorción atómica (FAAS), (ambas determinan la concentración de metal). Otras técnicas que también se podrían emplear para la caracterización de las NPs son la espectrometría de infrarrojo (IR) y la espectrometría de ultra violeta (UV), entre otras (Anghel et al., 2013; Liu et al., 2013).

## EFFECTOS TÓXICOS Y MECANISMOS DE TOXICIDAD DE LAS NANOPARTICULAS DE PLATA (AgNPs)

Como ocurre con otras NPs, la toxicidad de las AgNPs parece estar asociada con su naturaleza oxidativa e inflamatoria (Cho et al., 2009), la cual genera genotoxicidad (Asharani et al., 2009) y citotoxicidad (Hussain et al., 2005). La generación de EROs y el estrés oxidativo parecen ser los dos mecanismos principales de toxicidad (Hsin et al., 2008). En el organismo debe existir un equilibrio entre las EROs y los sistemas de defensa antioxidante. Cuando dicho equilibrio se rompe a favor de las EROs se produce el denominado estrés o daño oxidativo (Kohen y Nyska, 2002). Las AgNPs pueden interactuar con proteínas y enzimas con grupos tioles de las células de mamífero. Estas proteínas y enzimas como glutatión, tioredoxina, superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa de tioredoxina, son componentes claves para el mecanismo de defensa antioxidante de las células, que es el responsable de neutralizar el estrés oxidativo de las EROs generado en gran medida por el metabolismo energético mitocondrial (Ahamed y Siddiqui, 2007). Por tanto, se sugiere que las AgNPs pueden disminuir los mecanismos de defensa antioxidante, a través de la reducción de glutatión, inactivación de la SOD, promoviendo la peroxidación lipídica, etc (Carlson et al., 2008; Piao et al., 2011). En consecuencia, la acumulación de EROs y el estrés oxidativo provocan una gran cantidad de eventos fisiológicos y celulares incluyendo el estrés, perturbación y destrucción de la mitocondria, apoptosis, inflamación y daño al ADN (Ahamed et al., 2010). Un esquema de los mecanismos de citotoxicidad inducidos por las nanopartículas metálicas se muestra en la **Figura 5**.

La mitocondria parece ser la diana sensible de la toxicidad de las AgNPs (Hsin et al., 2008). Las mitocondrias son centros importantes de señalización durante la apoptosis, y la pérdida de la integridad mitocondrial puede ser inducida o inhibida por muchos reguladores apoptóticos (Green y Reed, 1998). Se ha observado que las AgNPs inducen la liberación mitocondrial del citocromo c al citosol y además, provocan la pérdida del potencial de membrana mitocondrial como resultado de la baja regulación de los niveles proteicos de Bcl-2 y un incremento de los niveles intracelulares de la proteína Bax (Piao et al., 2011). El citocromo c liberado al citosol provoca la activación de la caspasa 9 y la caspasa 3 activando el proceso de apoptosis. Estos resultados sugieren que las AgNPs actúan activando la vía intrínseca de apoptosis (Hsin et al., 2008). Este proceso de apoptosis está regulado por muchas vías de señalización intracelulares, incluyendo la vía de las quinasas c-Jun N-terminal

(JNK) (Lin, 2003). La JNK es un miembro de la familia de las quinasas activadas por mitógenos (MAP), estas quinasas tienen una función proapoptótica en respuesta al estrés celular (Shen y Liu, 2006). Otros estudios han publicado que la JNK está implicada en varias enfermedades asociadas con estrés oxidativo (Czaja, 2003) y que la producción de EROs podría ser el resultado de la activación mantenida de JNK (Kamata et al., 2005). Asharani et al. (2009) sugirió que la disrupción de la cadena respiratoria mitocondrial por las AgNPs incrementó la producción de EROs y la interrupción de la síntesis de ATP, lo que provocó daño al ADN. Ahamed et al. (2008) observaron que las AgNPs sobreexpresaron las proteínas p53 (cuya activación está relacionada con el daño al ADN), y Rad51 (responsable de la reparación del ADN), y fosforiló a la H2AX (inducida normalmente por la rotura de las cadenas de ADN), sugiriendo que las AgNPs son capaces de estimular el daño al ADN. Ghosh et al. (2012) confirmaron el poder genotóxico de las AgNPs a partir de ensayos *in vivo* e *in vitro*, observando roturas en el ADN y aberraciones cromosómicas después del tratamiento con AgNPs.



**Figura 5.** Mecanismos de citotoxicidad inducidos por nanopartículas metálicas. (Horie et al., 2012).

Además del daño al ADN, también se ha observado que la exposición de AgNPs induce la liberación de una serie de marcadores proinflamatorios, principalmente el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), macrófagos intravasculares pulmonares (MIPs) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (Nishanth et al., 2011). Sin embargo, debido a que las AgNPs liberan iones Ag<sup>+</sup> en estado acuoso (Kim et al., 2009), sería necesario distinguir entre los efectos tóxicos de las AgNPs y los Ag<sup>+</sup> disueltos. Los resultados de investigaciones recientes parecen ambiguos. Algunos investigadores sugieren que la toxicidad de las AgNPs se debe a la liberación de Ag<sup>+</sup>, ya que según sus estudios ambos presentan una respuesta biológica similar (Miura y Shinohara, 2009). En contraste, Kim et al. (2009) y Asharani et al. (2008) sugirieron que la toxicidad inducida por las AgNPs es independiente de los Ag<sup>+</sup> libres.

Finalmente, es necesario tener en cuenta la internalización de las AgNPs por las células, ya que la captación de las AgNPs influye en la fisiología y el funcionamiento normal de las células. Se sabe que la membrana celular presenta abundantes proteínas con grupos tioles, por lo que las interacciones entre las AgNPs y las proteínas pueden ser un papel importante para la internalización de las AgNPs (Chen y Schluesener, 2008). Los procesos responsables de captación de las AgNPs incluyen mecanismos activos, como la endocitosis, pero, también habría que estudiar si pueden existir otros mecanismos pasivos como la difusión. Además, hay que tener en cuenta que las AgNPs pueden liberar Ag<sup>+</sup>, los cuales pueden ser internalizados por los mismos mecanismos que las AgNPs o a través de los canales iónicos de la membrana celular (Horie et al., 2012; Chen y Schluesener, 2008).

## CONCLUSIÓN

La exposición humana a AgNPs va a aumentar considerablemente en los próximos años debido a la gran cantidad de aplicaciones que tienen en diversos sectores, como la electrónica, la industria textil, alimentación, medicina, etc... Por ello es tremendamente necesario que los productos fabricados con AgNPs sean seguros tanto para la salud humana como para el medio ambiente. Estudios *in vivo* e *in vitro* ponen de manifiesto que las AgNPs producen una toxicidad específica en una variedad de órganos, incluyendo los pulmones, riñones, cerebro, órganos reproductores y el hígado, siendo este último el órgano principal de acumulación de las AgNPs. Sin embargo, se requieren aún estudios integrales para entender mejor la toxicidad asociada con la exposición de las AgNPs.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación (España) la financiación del proyecto AGL2010-16561.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar MA. 2009. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *colletotrichum Gloesporioides*. Tesis doctoral.
- Ahamed, M y Siddiqui MKJ. 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. Clin Chim Acta 383: 57-64.
- Ahamed, M, Karns, M, Goodson, M, Rowe, J, Hussain SM, Schlager, JJ y Hong Y. 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. Toxicol Appl Pharmacol. 233: 404-410. doi: 10.1016/j.taap.2008.09.015.
- Ahamed, M, Posgai, R, Gorey, TJ, Nielsen, M, Hussain, SM y Rowe JJ. 2010. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. Toxicol Appl Pharmacol. 242: 263-269. doi: 10.1016/j.taap.2009.10.016.
- Almengor L. 2009. Nanotecnología en la industria alimentaria. Revista electrónica, Facultad de Ingeniería, Universidad Rafael Lendívar. 13: 35-52.
- Anghel, I, Grumezescu, AM, Holban, AM, Ficai, A, Anghel, AG y Chifiriuc MC. 2013. Biohybrid nanostructured Iron oxide nanoparticles and *Satureja hortensis* to prevent fungal biofilm development. Int J Mol Sci. 14: 18110-18123. doi: 10.3390/ijms140918110.
- Asharani, PV, Wu, YL, Gong, Z y Valiyaveetil S. 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. Nanotechnology. 19: 255102. doi: 10.1088/0957-4484/19/25/255102.
- Asharani, PV, Mun, GLK, Hande, MP y Valiyaveetil S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. ACS Nano. 3: 279-290. doi: 10.1021/nn800596w.
- Behera, S, Debata, A y Nayak PL. 2011. Biomedical applications of silver nanoparticles. J Asian Sci Res. 1: 27-56.
- Braydich-Stolle, L, Hussain, S, Schlager, JJ y Hofmann MC. 2005. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian stem cells. Toxicol Sci. 88: 412-419.
- Brody, AL, Bugusu, B, Han, JH, Sand, CK y McHugh TH. 2008. Scientific status summary. Innovative food packaging solutions. J Food Sci. 73: 107-116. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00933.x.

- Carlson, C, Hussain, SM, Schrand, AM, Braydich-Stolle, LK, Hess, KL, Jones, RL y Schlager JJ. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B*. 112: 13608-13619. doi: 10.1021/jp712087m.
- Chen, X y Schluesener HJ. 2008. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett*. 176: 1-12.
- Chen, C y Chiang C. 2008. Preparation of cotton fibers with antibacterial silver nanoparticles. *Mater Lett*. 62: 3607-3609.
- Cheng, D, Yang, J y Zhao Y. 2004. Antibacterial materials of silver nanoparticles application in medical appliances and appliances for daily use. *Chin. Med. Equip. J*. 4: 26-32.
- Chithrani, BD, Ghazani, AA y Chan WCW. 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake by mammalian cells. *Nano Lett*. 7: 1542-1550.
- Cho, W, Cho, M, Jeong, J, Choi, M, Cho, HY, Han, BS, Kim, SH, Kim, HO, Lim, YT, Chung, BH y Jeong J. 2009. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 236: 16-24. doi: 10.1016/j.taap.2008.12.023.
- Choi, O y Hu Z. 2008. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ Sci Technol*. 42: 4583-4588.
- Choi, Y, No, NH y Tung C. 2007. Sensing phosphatase activity by using gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*. 46: 707-709.
- Clapp, C, Aranda, J, González, C, Jeziorski, MC y Escalera GM. 2006. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metabol*. 17: 301-307.
- Cohen, MS, Stern, JM, Vanni, AJ, Kelley, RS, Baumgart, E, Field, D, Libertino, JA y Summerhayes IC. 2007. In vitro analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh. *Surg. Infect*. 8: 397-403.
- Comunicación de la Comisión Europea. Segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales. COM 2012. 572 Final del 3.10.2012.
- Czaja MJ. 2003. The future of GI and liver research: editorial perspectives III. JNK/AP-1 regulation of hepatocyte death. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 284: 875-879.
- De Jong, WH, Hagens, WI, Krystek, P, Burger, MC, Sips AJAM y Geertsma RE. 2008. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*. 29: 1912-1919. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007. 12.037.

- EFSA Scientific Committee, 2011. Scientific Opinion. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. EFSA Journal, 9(5): 2140.
- El Badawy, A, Silva, R, Morris, B, Scheckel, K, Suidan, M y Tolaymat T. 2011. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. Environ Sci Technol. 45: 283-287. doi: 10.1021/es1034188.
- Elechiguerra, JL, Burt, J, Morones, JR, Camacho-Bragado, A, Gao, X, Lara, HH y Yacaman MJ. 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. J Nanobiotechnol. 3: 6.
- Frejo, MT, Díaz, MJ, Lobo, M y Capó M. 2011. Nanotoxicología ambiental: retos actuales. Medicina balear. 26: 36-46.
- Gálvez, V y Tanarro C. 2010. Toxicología de las nanopartículas. Seguridad y salud en el trabajo. 56: 6-12.
- Ghosh, M, Manivannan, J, Sinha, S, Chakraborty, A, Mallick, SK, Bandyopadhyay, M y Mukherjee. 2012. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity of silver nanoparticles. Mutat. Res. 749: 60-69. doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.08.007.
- Green, DR y Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. Science. 281: 1309-1312.
- Hoet, PHM, Bruske-Hohlfeld, I y Salata OV. 2004. Nanoparticles- Known and unknown health effects. J Nanobiotechnol. 2: 12.
- Horie, M, Kato, H, Fujita, K, Endoh, S y Iwahashi H. 2012. In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. Chem Res Toxicol. 25: 605-619. doi: 10.1021/tx200470e.
- Hsin, YH, Chen, CF, Huang, S, Shih, TS, Lai, PS y Chueh PJ. 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by ROS- and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. Toxicol Lett. 179: 130-139. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.04.015.
- <http://www.bourneresearch.com>
- <http://www.nanotechproject.org/inventories>
- Hussain, SM, Hess, KL, Gearhart, JM, Geiss, KT y Schlager JJ. 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicol In Vitro. 19: 975-983.
- Jani, P, Halbert, GW, Langridge, J y Florence AT. 1990. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. J Pharm Pharmacol. 42: 821-826.
- Johnston, HJ, Hutchison, G, Christensen, FM, Peters, S, Hankin, S y Stone V. 2010. 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.* 40: 328-346. doi: 10.3109/10408440903453074.
- Jos, A, Pichardo, S, Puerto, M, Sánchez, E, Gribo, A y Camean AM. 2009. Cytotoxicity of carboxylic acid functionalized single wall carbón nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicol In Vitro.* 23: 1491-1496. doi: 10.1016/j.tiv.2009.07.001.
- Kamata, H, Honda, S, Maeda, S, Chang, L, Hirata, H y Karin M. 2005. Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell.* 120: 649-661.
- Kim, S, Choi, JE, Choi, J, Chung, K, Park, K, Yi, J y Ryu D. 2009. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro.* 23: 1076-1084. doi: 10.1016/j.tiv.2009.06.001.
- Kittler, S, Greulich, C, Diendorf, J, Köller, M y Epple M. 2010. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chem. Mater.* 22: 4548-4554. doi: 10.1021/cm100023p.
- Kohen, R y Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30: 620-650.
- Lee, H, Park, HK, Lee, YM, Kim, K y Park SB. 2007. A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. *Chem. Commun.* 28: 2959-2961.
- Lin A. 2003. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays.* 25: 17-24.
- Liu, S, Yuzvinsky, TD y Schmidt, H. 2013. Effect of fabrication-dependent shape and composition of solid-state nanopores on single nanoparticles detection. *ACS Nano* 7: 5621-5627. doi: 10.1021/nn4020642.
- Luoma SN. 2008. Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges. The Pew Charitable Trusts and the Woodrow Wilson International Center for Scholars.
- Lux report. 2008. Nanomaterials state of the market: stealth success, broad impact. Disponible en: <http://portal.luxresearchin.com/research/document/3735>.
- Maurer-Jones MA, Lin YS and Haynes CL, 2010. Functional assessment of metal oxide nanoparticle toxicity in immune cells. *ACS Nano* 4: 3363-3373. doi: 10.1021/nn9018834.

- Medina, C, Santos-Martínez, MJ, Radomski, A, Corrigan, OI y Radomski MW. 2007. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol.* 150: 552-558.
- Miura, N y Shinohara Y. 2009. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 390: 733-737. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.039.
- Monteiro-Riviere, NA, Nemanich, RJ, Inman, AO, Wang, YY y Riviere JE. 2005. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett.* 155: 377-384.
- Nishanth, RP, Jyotsna, RG, Schlager, JJ, Hussain, SM y Reddanna P. 2011. Inflammatory response of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: role of ROS-NF $\kappa$ B signaling pathway. *Nanotoxicology.* 5: 502-516. doi: 10.3109/17435390.2010.541604.
- Oberdorster, G, Oberdorster, E y Oberdorster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 113: 823-839.
- ObservatoryNano. 2009. Nanotechnology in Agrifood sector. Market Report. Prepared by the technology centre ASCR. Disponible en: <http://www.observatorynano.eu/project/document/2545/>.
- Pal, S, Tak, YK y Song JM. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 73: 1712-1720.
- Panyman, J y Labhasetwar V. 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Delivery Rev.* 55: 329-347.
- Piao, MJ, Kang, KA, Lee, IK, Kim, HS, Kim, S, Choi, JY, Choi, J y Hyun JW. 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol Lett.* 201: 92-100. doi: 10.1016/j.toxlet.2010.12.010.
- Pope, A y Dockery D. 2006. Health effects of fine particle air pollution: lines that connect. *J Air & Waste Manage Assoc.* 56: 709-742.
- Reglamento (UE) N° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de Octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L304 (22/11/2011).
- Rosas-Hernández, H, Jiménez-Badillo, S, Martínez-Cueva, PP, Gracia-Espino, E, Terrones, H, Terrones, M, Hussain, SM, Ali, SF y González C. 2009. Effect of 45-nm silver

- nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings. *Toxicol Lett.* 191: 305-313. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.09.014.
- Savage, N, Thomas, TA y Duncan JS. 2007. Nanotechnology applications and implications research supported by the US Environmental Protection Agency STAR grants program. *J Environ Monit.* 9: 1046-1054.
- Shen, HM y Liu ZG. 2006. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 40: 928-939.
- Smitha, S, Gupta, S, Bartonova, A, Dusinka, M, Gutleb, A y Rahman Q. 2012. Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach. *Environ Health.* 11: 1-11. doi: 10.1186/1476-069X-11-S1-S13.
- Smith, MW, Thomas, NW, Jenkins, PG, Miller, NG, Cremaschi, D y Porta C. 1995. Selective transport of microparticles across Peyer's patch follicle-associated M cells from mice and rats. *Exp Physiol.* 80: 735-743.
- Sonavane, G, Tomoda, K, Sano, A, Ohshima, H, Terada, H y Makino K. 2008. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size. *Coll. Surf. B. Biointerfaces.* 3: 351-358. doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.02.013.
- Sung, JH, Ji, JH, Park, JD, Yoon, JU, Kim, DS, Jeon, KS, Song, MY, Jeong, J, Han, BS, Han, JH, Chung, YH, Chang, HK, Lee, JH, Cho, MH, Kelman, BJ y Yu IJ. 2009. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci.* 108: 452-461. doi: 10.1093/toxsci/kfn246.
- Takenaka, S, Karg, E, Moller, W, Roth, C, Ziesenis, A, Heinzmann, U, Schramel, P y Heyder J. 2000. A morphologic study on the fate of ultrafine silver particles: distribution pattern of phagocytized metallic silver in vitro and in vivo. *Inhal Toxicol.* 12: 291-299.
- Takenaka, S, Karg, E, Roth, C, Schulz, H, Ziesenis, A, Heinzmann, U, Schramel, P y Heyder J. 2001. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect.* 4: 547-551.
- Tinkle, SS, Antonini, JM, Rich, BA, Roberts, JR, Salmen, R, DePree, K y Adkins EJ. 2003. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.* 111: 1202-1208.
- Trop, M, Novak, M, Rodl, S, Hellbom, B, Kroell, W y Goessler W. 2006. Silver coated ressing Acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J. Trauma.* 60: 648-652.
- Van der Zande, M, Vandebriel, R, Van Doren, E, Kramer, E, Rivera, Z, Serrano-Rojero, C, Gremmer, E, Mast, J, Peters, R, Hollman, P, Hendriksen, P, Marvin, H, Peijnenburg,

- Bouwmeester H. 2012. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano*. 6: 7427-7442. doi: 10.1021/nn302649p.
- Wadhera, A y Fung M. 2005. Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver. *Dermatol Online J* 11:12. Disponible en [http:// dermatology.cdlib.org](http://dermatology.cdlib.org).
- Yoosaf, K, Ipe, B, Suresh, CH y Thomas KG. 2007. In situ synthesis of metal nanoparticles and selective naked-eye detection of lead ions from aqueous media. *J Phys Chem C*. 111: 12839-12847.
- Zhang, Y y Sun J. 2007. A study on the bio-safety for nano-silver as anti-bacterial materials. *Chin J Med Instrumen*. 31: 35-38.