

NANOPARTÍCULAS DE ORO Y SUS EFECTOS SOBRE MICROORGANISMOS ACUÁTICOS, UN ESTUDIO SOBRE “DAPHNIA PULEX”

**Paulina Abrica-González¹, José Abraham Balderas-López^{1*},
Ernesto Zumelzu-Delgado², Jorge Nimptsch-Maass³**

¹Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Departamento de Ciencias Básicas, 07340 Ciudad de México, México.

²Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Instituto de Materiales y Procesos Termomecánicos, 5111187 Valdivia, Chile.

³Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas, 5110566 Valdivia, Chile.

*abrahambalderas@hotmail.com

<https://doi.org/10.3926/oms.404.9>

Abrica-González, P., Balderas-López, J.A., Zumelzu-Delgado, E., & Nimptsch-Maass, J. (2020). Nanopartículas de oro y sus efectos sobre microorganismos acuáticos, un estudio sobre “*Daphnia pulex*”. En E. San Martín-Martínez (Ed.). *Avances de investigación en Nanociencias, Micro y Nanotecnologías. Volumen II*. Barcelona, España: OmniaScience. 171-184.

Resumen

En las últimas décadas, la nanotecnología ha emergido como un área de investigación que está encontrando aplicaciones en múltiples campos. El mercado actual incluye nanomateriales que proporcionan grandes ventajas sobre los materiales en su forma convencional, una de éstas, su mayor área de contacto, lo que los hace ideales como sustancias catalíticas, mejorando este tipo de procesos con la consecuente reducción de insumos. Dentro de los nanomateriales comúnmente utilizados, las nanopartículas de oro se han aplicado principalmente en biomedicina, salud y belleza, sector automotriz y electrónica. Sin embargo, el uso cada vez más generalizado de nanopartículas no va aparejado con estudios sobre el impacto ambiental que conlleva la disposición final de sus residuos, especialmente en medios acuáticos, destino habitual de muchas sustancias utilizadas en procesos industriales, los cuales han sido poco estudiados. La presente investigación aborda el efecto que tienen las nanopartículas de oro con recubrimiento de quitosano sobre *Daphnia pulex*, microorganismos generadores primarios en la cadena trófica. Como resultado fundamental de este trabajo se estableció una dosis letal media (EC50) de 0.5721 mg/L de Au en este tipo de microorganismos, este estudio confirma así la importancia de llevar a cabo más investigación sobre la toxicidad de nanopartículas funcionalizadas, especialmente de oro, en organismos acuáticos microscópicos que son la base de muchas cadenas tróficas en ríos y lagos.

Palabras clave: Toxicología; Nanopartículas de oro; Quitosano; *Daphnia pulex*.

1. Introducción

El impacto ambiental generado por las actividades antropogénicas se debe en gran parte a la deposición de compuestos diversos tales como organoclorados y metales, entre otros xenobióticos, que afectan las formas de vida en distintos ecosistemas. Genera especial preocupación la contaminación acuática derivada de la descarga de contaminantes desde efluentes industriales, agrícolas y urbanos hacia cauces naturales, ya que estos tienen el potencial de alterar los procesos bioquímicos y fisicoquímicos de las especies acuáticas [1,2]. Los estudios de contaminación en agua perfilan, en análisis fisicoquímicos comunes de calidad de agua, la naturaleza y cantidad de contaminantes específicos, sin embargo, no permiten evaluar el comportamiento e impacto de estos contaminantes al ser incorporados en los organismos de un sistema acuático. Por otro lado, los métodos biológicos permiten determinar, entre otros, los efectos bioquímicos, morfológicos y fisiológicos que tienen los contaminantes en el medio sobre los organismos, teniendo en cuenta las reacciones químicas que pudieran ocurrir, modificando su biodisponibilidad, aumentando o disminuyendo su toxicidad, resaltando la importancia de acompañar estudios de contaminación con bioensayos ecotoxicológicos [3]. Los efectos de los residuos contaminantes sobre organismos acuáticos son evidentes a corto y largo plazo, en especial para los organismos productores y consumidores primarios de las cadenas tróficas, los cuales resultan de gran importancia en la cadena alimenticia y aportan energía de nivel inferior a superior; por lo que se busca la evaluación de dichos efectos por medio de estudios que involucran a distintas disciplinas de la ciencia y la tecnología [3].

Los protocolos de bioensayos de toxicidad han sido estandarizados principalmente por la EPA (*Environmental Protection Agency*), la APHA (*American Public Health Association*) y la ASTM (*American Society for Testing of Materials*). La FAO (La organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), por su parte, regula técnicas para protección acuática a través de respuestas agudas y crónicas [4]. Organismos como *Daphnia sp.* (o pulga de agua) han sido ampliamente utilizados como bioindicadores, particularmente para la detección de toxicidad en sistemas acuáticos, en virtud a su sensibilidad a los cambios en su ambiente [5]. *Daphnia pulex* es, a su vez, un artrópodo acuático con extensa distribución geográfica, se caracteriza por ser un consumidor primario, con tiempo de vida corto, alta sensibilidad a contaminantes y rápida reproducción, características por las cuales es ampliamente utilizado como organismo modelo en investigaciones medio-ambientales [5,6].

Los nanomateriales, cuyo desarrollo se ha incrementado recientemente, representan algunos de los nuevos contaminantes ambientales cuyos efectos particulares comienzan apenas a elucidarse. En particular, las nanopartículas (NPs), especialmente aquellas que se encuentran en el rango de 1 a 100 nm, han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas por sus peculiares características respecto a materiales convencionales. En específico, las nanopartículas metálicas han demostrado tener propiedades fisicoquímicas particulares, tales como alta polarizabilidad y el presentar bandas de absorción en el espectro visible, así como mayor conductividad eléctrica/térmica, por lo cual contrastan con sus similares en bulto o en solución y desde el punto de vista biológico, muestran facilidad de entrada en distintos microorganismos, lo cual las hace mecanismos idóneos para entrega de especies moleculares al interior de células. En este tipo de aplicaciones, se encuentran las nanopartículas de oro (AuNPs) como uno de los nanomateriales más utilizados, gracias a su biocompatibilidad, la cual es mejorada mediante funcionalizaciones específicas para distintos objetivos, tales como transporte de fármacos y material genético y contraste en imagenología médica. Sin embargo, algunos autores han reportado cierta toxicidad del oro en su forma nano, los grupos funcionales expuestos en la superficie tras la funcionalización influyen en estas características del nanomaterial por lo que se resalta la importancia de estudiar los efectos particulares de estas nanoestructuras en organismos vivos [7]. Una de las funcionalizaciones de AuNPs más usada para el transporte de fármacos consiste en la incorporación de polímeros biológicos tales como el quitosano [8]. El uso generalizado de estos nanocompuestos hace inevitable que sus residuos lleguen a ser fuente de contaminación, particularmente de ambientes acuáticos, por lo que es fundamental el estudio del impacto que estos materiales puedan tener en los organismos que habitan dichos ambientes, tal como se ha hecho en numerosos trabajos que involucran el impacto ambiental que tienen sobre microorganismos las trazas de medicamentos presentes en distintos efluentes de aguas de origen natural [9].

Además de los cambios en las propiedades de las nanopartículas tras su funcionalización, una vez que son liberadas al ambiente, estas serán transportadas y transformadas, posiblemente con nanopartículas de origen natural u otros componentes, que podrán generar un potencial peligro [10]. La toxicidad de nanopartículas también puede verse afectada por fenómenos como su capacidad de liberación de iones, estado de agregación, dispersión y propiedades fotoquímicas [11]. Influye también el medio en el que éstas sean descargadas, por ejemplo, las fuerzas iónicas presentes en agua marina tienden a inducir agregación en mayor

medida que el agua dulce, esto debido a las fuerzas repulsivas que acelerarán el proceso de floculación y sedimentación, por lo que el tipo de medio acuático influye en la estabilidad y por lo tanto en la toxicidad del material [11]. Derivado de esto se ha descrito la importancia del estudio de la agregación de NPs, la cual ha sido ya reportada como un uno de los fenómenos que, desde el punto de vista espacial y de transporte, forman parte importante de los procesos toxicológicos, dependiendo del medio y de la complejidad de la agregación, pudiendo ser esta homogénea o heterogénea. El parámetro de entrada para este tipo de modelos se ha definido como el factor de agregación (α), que puede ser usado para modelos que van desde una sola partícula, hasta complejos sistemas multivariable [10]. En este sentido, es también importante hacer uso de las variadas técnicas de caracterización para NPs, generalmente físicos y químicos, con los cuales podemos obtener información del comportamiento y adaptación al cambiar de medio de suspensión [12-14].

Además de los estudios físicos y químicos particulares de la NPs, de su funcionalización, y de su interacción con el medio, se ha reportado que la toxicidad de las AuNPs es variable y dependiente también del organismo de estudio, estudios que por la complejidad de factores han resultado discordantes entre sí, por ello es importante evaluar sus efectos ecotoxicológicos a mayor profundidad [7]. Actualmente existen reportes de estudios ecotoxicológicos que involucran nanopartículas de oro, por ejemplo, algunas algas (organismos primarios en la cadena alimenticia en ecosistemas acuáticos) se han utilizado como modelo ecológico, reportando EC50 (dosis letal media) de metales como Ag y Au, óxidos metálicos como CuO y TiO₂, puntos cuánticos de CdSe, entre otros, determinando que la toxicidad de las nanopartículas varía dependiendo de sus características como tamaño, carga, agregación, dispersión, retención, entre otros [11]. Otro análisis de obtención de EC50 fue reportado por Khoshnamvand, quien sugiere que las nanopartículas con mayor tamaño (72 nm) fueron más tóxicas que las de 10 nm con *Daphnia magna* [15]. También han reportado que las AuNPs son capaces de internalizar células intestinales en *Daphnia magna* [16]. Es por ello que se confirma la importancia de seguir investigando con estándares ecotoxicológicos, como es el caso de *Daphnia sp.*, la cual ha sido utilizada para múltiples reportes sobre efectos de distintos tipos de nanopartículas [4]. Sobre esta base se llevó a cabo el presente estudio de incorporación de AuNP's funcionalizadas con quitosano en *Daphnia pulex*, a fin de evaluar los efectos de la acumulación de dichas nanoestructuras en estos microorganismos modelo.

2. Metodología

2.1. Preparación y caracterización de materiales

Las *Daphnia pulex*, recolectadas del lago Panguipulli, Valdivia-Chile, se mantuvieron en cámara de cultivo JSPC-300C, según el protocolo establecido por la OCDE, con ciclos de 14 horas luz, 10 horas oscuridad, $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y pH 6.5-7.5, cultivadas en agua de lago (160-180 mg CaCO_3/L) y alimentadas con *Chlorella sp.*

Las nanopartículas de oro con quitosano como agente estabilizador y borohidruro de sodio como agente reductor se sintetizaron siguiendo el siguiente protocolo. Todo el material utilizado en la síntesis fue previamente lavado con agua regia (Ácido Nítrico: Ácido Clorhídrico, 1:3) durante 24 horas, para eliminar cualquier residuo metálico que pudiera interferir en el proceso. Para la síntesis de las nanopartículas de oro con quitosano (CO-AuNPs), se utilizó un método modificado a partir del de Huang et al. [17], el cual fue reportado con anterioridad [18]. En esta metodología, quitosano (2 mg/ml) de peso molecular bajo (50-190 kDa) con 75 % de grado de desacetilación-Sigma Aldrich®, fue diluido por vórtex en una solución al 1 % de ácido acético y posteriormente agitado magnéticamente durante 24 horas. Después, la solución se hizo pasar por filtro con tamaño de poro de $0.22 \mu\text{m}$ y se mantuvo en agitación con solución de tetracloroaurato (III)

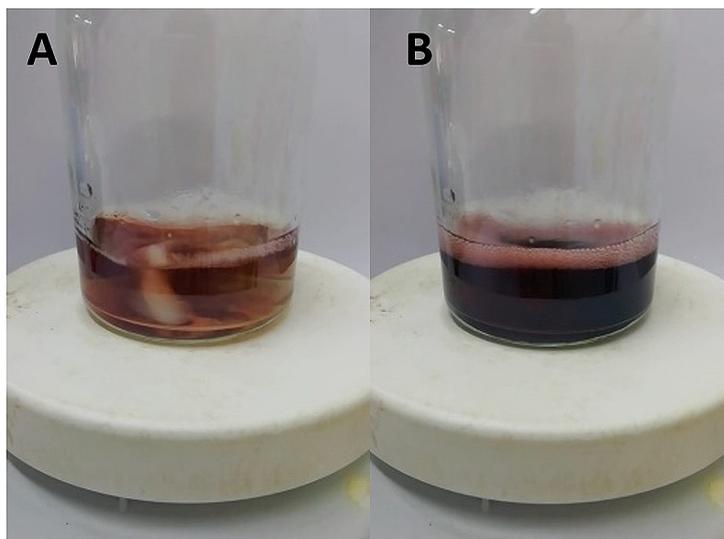


Figura 1. Síntesis de nanopartículas de oro-quitosano.
A. Inicio de la reacción, B. CO-AuNPs formadas.

de hidrógeno trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)-Sigma Aldrich® 10 mM, la relación de las soluciones se mantuvo en volumen 2:1, quitosano: oro. Después de 30 minutos de agitación, se agregó por goteo la solución reductora (0.4 ml, Borohidruro de Sodio (NaBH_4)-Sigma Aldrich® 100 mM), manteniendo la solución en agitación durante 2 horas más. La formación de nanopartículas se evidencia con el vire de amarillo paja a rojo vino, como se observa en la figura 1, donde en A se muestra la solución de inicio y en B el resultado final.

Para la caracterización óptica de las CO-AuNPs por espectroscopía UV-Visible se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer, Lambda 25, Waltham, con cubetas estándar de 1 mm. El potencial Z se midió con un equipo Zetasizer (*Nano Z, Malvern Panalytical Ltd*), con celdas capilares DTS1060 de Malvern Panalytical Ltd. Se midió el cambio en los valores de potencial Z obtenidos al variar el pH (*WTM potentiometer*) con 0.1 M de NaOH, midiendo inmediatamente el valor. El diámetro hidrodinámico se obtuvo por medio de la dispersión dinámica de luz (DDL), medida con el Zetasizer con las mismas condiciones que para potencial Z. El diámetro de las nanoestructuras se obtuvo por medio del análisis de micrografías obtenidas por TEM (JEM 1010, JEOL), procesadas por medio de un software elaborado en Matlab®.

Se prepararon suspensiones de CO-AuNPs para la exposición de los organismos, las concentraciones de Au fueron: 0.001, 0.01, 0,1, 1 y 10 mg/L. El pH final de la solución fue ajustado a 6.5. Se expusieron neonatos de *Daphnia pulex* (con edades inferiores a 24 h) a las soluciones preparadas, durante 48 horas sin alimento, en ciclos 14/10 luz/oscuridad. Para el bioensayo, se utilizaron como controles, *Daphnia pulex* sin exposición de nanopartículas y expuestas a las soluciones de quitosano correspondiente al por ciento peso en la concentración de las CO-AuNPs. Los controles constaron de 5 repeticiones cada uno, y las concentraciones tuvieron tres réplicas. El conteo de organismos fue realizado por medio de un microscopio óptico Olympus CX41, a las 0 y 48 horas de exposición. La acumulación de nanomateriales en el tracto digestivo de los organismos, para muestras de 10 mg/L de Au, se observó al microscopio con la adaptación de una cámara digital DIXI 3000 mega pixels, NEK Corp.

2.2. Análisis estadístico

Se analizó la normalidad de los datos por medio de la prueba de Shapiro-Wilk. La diferencia significativa entre tratamientos se determinó por la prueba de Kruskal-Wallis, tomando $p < 0.05$ como estadísticamente significativa mediante la

aproximación de H a distribución Chi^2 . Se determinó la concentración letal media (EC50) mediante ajuste a curva sigmoideal dosis-respuesta.

3. Resultados y Discusión

Se obtuvieron CO-AuNPs monodispersas y con distribución de dimensiones homogénea, lo cual se observa en las micrografías TEM (Figura 2A). En el inserto de la figura se observa la distribución de tamaños, obteniéndose un tamaño promedio de 4.16 ± 1.89 nm. La banda correspondiente a la resonancia de plasmon en el espectro UV-Vis, puede ser observada para las nanopartículas de oro con quitosano (Figura 2B) alrededor de 524 nm, confirmando la síntesis coloidal. El diámetro hidrodinámico obtenido por DDL, se reporta mayor al diámetro TEM, debido principalmente al recubrimiento con quitosano, centrándose en 43.26 nm con índice de polidispersión de 0.283. El valor obtenido de potencial Z fue de 31.12 mV. Las nanopartículas de oro con quitosano son positivas debido a los grupos amino superficiales. Los valores de potencial Z disminuyeron conforme aumentó el pH, sugiriendo menor disponibilidad de protones superficiales disponibles, por lo que la carga se vuelve más negativa. Se obtuvieron los siguientes valores: potencial Z de 38.31 mV para pH 3.1, potencial Z de -2.12 mV para pH 6.5 y potencial Z de 13.11 mV para pH 8.

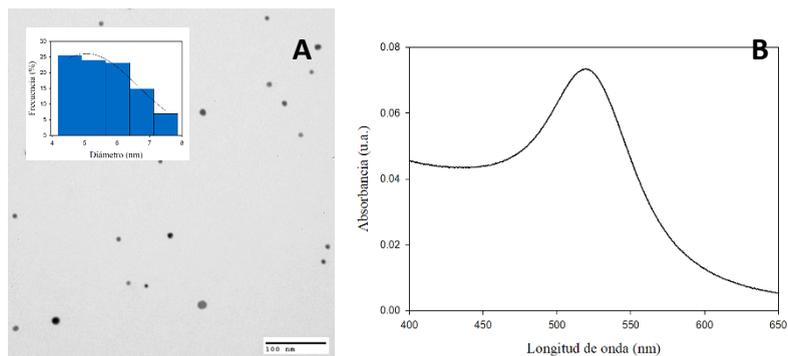


Figura 2. Caracterización de CO-AuNPs. A. Micrografía TEM, inserto muestra la distribución del diámetro de nanopartícula. B. Espectro de absorción UV-Vis.

La prueba de Shapiro-Wilk para la distribución de datos de mortalidad de *Daphnia pulex* en distintas concentraciones de Au determinó la no normalidad de los datos ($P < 0.05$), por lo que se realizó el análisis de varianza por rangos con la prueba de Kruskal-Wallis, obteniéndose una $H = 17.244$ con 5 grados de libertad, con lo que se encuentra una $P = 0.004$ en la aproximación a la distribución

χ^2 , determinando que se encuentra diferencia significativa entre concentraciones. A partir de la regresión no lineal a la curva de dosis-respuesta sigmoideal, se determinó una dosis letal media $EC_{50} = 0.5721$ mg/L de Au, como se muestra en la Figura. 3.

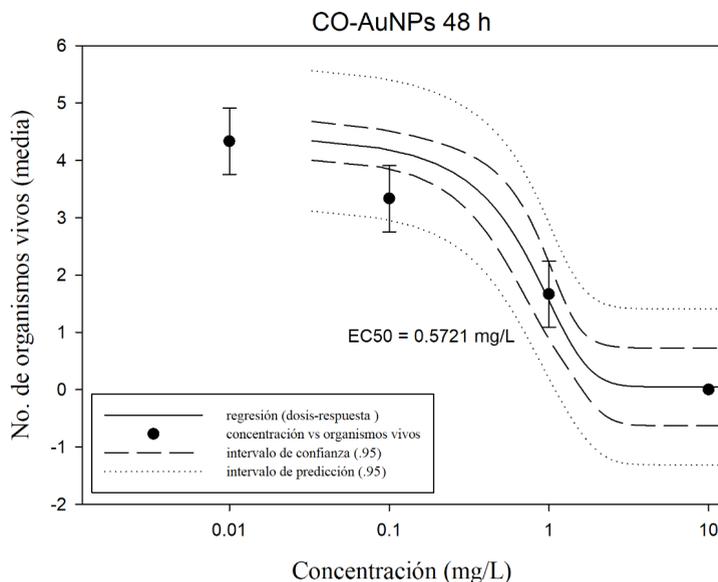


Figura 3. Función dosis-respuesta sigmoideal para concentraciones de Au vs mortalidad de *Daphnia pulex*. $EC_{50} = 0.5721$ mg/L de Au.

Reportes previos sugieren que NPs con tamaños de 30 a 50 nm se internalizan mejor que las correspondientes de tamaños menores (15 a 30 nm) o mayores (70 a 240 nm), probablemente debido a las interacciones de las NPs con receptores de membrana celular [11]. Las CO-AuNPs reportadas en esta investigación, se encuentran con tamaño promedio de 43.26 nm, en concordancia con las NPs reportadas con mayor internalización. También, Jensen et al. [16], reportan que es posible que la membrana peritrófica sea la barrera inicial para los distintos tamaños de nanopartículas, sugiriendo que las nanopartículas mayores de 100 nm se absorben por endocitosis y las de 10 nm se acumulan en la membrana celular y posteriormente se agreguen y absorban. Los autores también sugirieron que las AuNPs de 10 nm logran internalizar a células intestinales de *Daphnia magna*, demostrado con un tiempo de exposición de 48 horas. Es decir, las nanopartículas probadas en esta investigación, de acuerdo con distintos reportes, estarían internalizando las células intestinales, por lo cual se puede sugerir que la toxicidad que

se observa puede deberse a que las AuNPs lograron entrar a las distintas células, y afectaron su crecimiento.

Otro factor que podría influir en la toxicidad observada, podría ser la liberación de iones de las nanopartículas que podría estar influenciada por las fuerzas iónicas y pH dentro de las *Daphnia pulex* [11], así como por las interacciones de la superficie del quitosano sobre las AuNPs [11]. Otros estudios confirman también cambios en la toxicidad de nanopartículas con y sin recubrimiento [7].

En la Figura 4 se observan las *Daphnia pulex* expuestas a 10 mg/L de Au durante 48 horas. En la Figura 4A se muestra un organismo de control mientras que en la Figura 4B se observa uno después de 48 h de exposición. Es posible observar la acumulación de CO-AuNPs dentro del tracto digestivo de la *Daphnia pulex*, en este último caso, se observó también menor movilidad conforme aumentó la concentración. Para muchos tipos de NPs, la vía principal de absorción y acumulación en los microorganismos es el tracto digestivo [19], como es evidente en la Figura 4B.



Figura 4. A. Control, *Daphnia pulex* sin NPs. B. *Daphnia pulex* 48 horas después de exposición a CO-AuNPs (10 mg/L de Au).

Previos reportes de toxicidad de AuNPs en *Daphnia sp.* apuntan dosis letales medias EC50 tales como 1.57 mg/L para AuNPs de 10 nm recubiertas con extracto de algas *Saccharina japonica* [15], o pruebas de citotoxicidad con IC50 de 5.9

mg/L para AuNPs de 1.4 nm estabilizadas en TPPMS [20]. El EC50 de 0.5721 mg/L reportado en este trabajo, demuestra alta toxicidad de las nanoestructuras, a pesar de la funcionalización con biopolímeros, lo cual refuerza la importancia de estudiar más a fondo los efectos toxicológicos de las AuNPs, tomando en cuenta las interacciones de los recubrimientos con el medio de dispersión y los biomarcadores utilizados.

4. Conclusiones

Se obtuvo información de los efectos tóxicos sobre *Daphnia pulex* por la acumulación de nanopartículas de oro funcionalizadas con quitosano, con un diámetro hidrodinámico de 43.26 nm. El valor EC50 a las 48 horas fue de 0.57 mg/L de Au, presentando mortalidad de los organismos a partir de la concentración de 0.001 mg/L de Au. Los resultados obtenidos en comparación con reportes previos demuestran que el recubrimiento o funcionalización de NPs modifica de manera importante los fenómenos de interacción toxicológica con biomarcadores en medios acuáticos. De aquí la importancia de estudiar la interacción de nanoestructuras de diversos materiales y/o funcionalizaciones en microorganismos acuáticos, tomando en cuenta tamaños, formas y naturaleza de los microorganismos.

Agradecimientos

Este trabajo fue parte de la investigación de doctorado de la Dra. Paulina Abrica-González, quien agradece al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo en la investigación e infraestructura, asimismo al CONACYT-México por el apoyo económico que le permitió realizar la parte experimental de este trabajo en la Universidad Austral de Chile, Valdivia-Chile, a través de una beca mixta (595254). Se agradece también al Dr. Ernesto Zumelzu Delgado y al M.C. Rolando Ríos Rodríguez, por permitir el uso de la infraestructura del Instituto de Materiales y Procesos Termomecánicos de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería. Al Dr. Ignacio Moreno Villoslada y al Dr. Mario Flores Flores, por su apoyo con el Laboratorio de Polímeros del Instituto de Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias. Al Dr. Jorge Nimptsch M. y al Dr. Stefan Woelfl por su apoyo con el Laboratorio de Bioensayos y Limnología Aplicada y el Laboratorio Limnológico de Panguipulli del Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas de la Facultad de Ciencias.

Bibliografía

1. Havelková, M., Randák, T., Žlábek, V., Krijt, J., Kroupová, H., Pulkrabová, J. et al. (2007). Biochemical markers for assessing aquatic contamination. *Sensors* 7, 2599-2611. <https://doi.org/10.3390/s7112599>
2. Pereira, P., Raimundo, J., Canário, J., Almeida, A., & Pacheco, M. (2013). Looking at the aquatic contamination through fish eyes - A faithful picture based on metals burden. *Mar. Pollut. Bull.* 77, 375-379. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.009>
3. Bowmer, K.H. (1986). Rapid biological assay and limitations in macrophyte ecotoxicology: A review. *Mar. Freshw. Res.*, 37, 297-308. <https://doi.org/10.1071/MF9860297>
4. Danabas, D., Ates, M., Ertit Tastan, B., Cicek Cimen, I.C., Unal, I., Aksu, O. et al. (2020). Effects of Zn and ZnO Nanoparticles on *Artemia salina* and *Daphnia magna* Organisms: Toxicity, Accumulation and Elimination. *Sci. Total Environ.*, 711, 134869. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134869>
5. Murray, I.M.T., Rowan, N.J., McNamee, S., Campbell, K., & Fogarty, A.M. (2018). Pulsed light reduces the toxicity of the algal toxin okadaic acid to freshwater crustacean *Daphnia pulex*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25, 607-614. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0472-6>
6. Hou, J., Zhou, Y., Wang, C., Li, S., & Wang, X. (2017). Toxic Effects and Molecular Mechanism of Different Types of Silver Nanoparticles to the Aquatic Crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 51, 12868-12878. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03918>
7. Libralato, G., Galdiero, E., Falanga, A., Carotenuto, R., De Alteriis, E., Guida, M. (2017). Toxicity Effects of Functionalized Quantum Dots, Gold and Polystyrene Nanoparticles on Target Aquatic Biological Models: A Review. *Molecules*, 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22091439>
8. Wei, S., Ching, Y.C., & Chuah, C.H. (2020). Synthesis of chitosan aerogels as promising carriers for drug delivery: A review. *Carbohydr. Polym.*, 231, 115744. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115744>
9. Bound, J.P., & Voulvoulis, N. (2005). Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environ. Health Perspect.*, 113, 1705-1711. <https://doi.org/10.1289/ehp.8315>

10. Praetorius, A., Badetti, E., Brunelli, A., Clavier, A., Gallego-Urrea, J.A., Gondikas, A. et al. (2020). Strategies for determining heteroaggregation attachment efficiencies of engineered nanoparticles in aquatic environments. *Environ. Sci. Nano*, 7, 351-367. <https://doi.org/10.1039/c9en01016e>
11. Nguyen, M.K., Moon, J.Y., & Lee, Y.C. (2020). Microalgal ecotoxicity of nanoparticles: An updated review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110781>
12. Abedini, A., Daud, A.R., Hamid, M.A.A., Othman, N.K., & Saion, E. (2013). A review on radiation-induced nucleation and growth of colloidal metallic nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.*, 8, 1-10. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-474>
13. Lue, J.T. (2001). A review of characterization and physical property studies of metallic nanoparticles. *J. Phys. Chem. Solids*, 62, 1599-1612. [https://doi.org/10.1016/S0022-3697\(01\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3697(01)00099-3)
14. Zhang, Y., & Erkey, C. (2006). Preparation of supported metallic nanoparticles using supercritical fluids: A review. *J. Supercrit. Fluids*, 38, 252-267. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.021>
15. Khoshnamvand, M., Ashtiani, S., & Liu, J. (2020). Acute toxicity of gold nanoparticles synthesized from macroalga *Saccharina japonica* towards *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27, 22120-22126. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08770-9>
16. Jensen, L.H.S., Skjolding, L.M., Thit, A., Sørensen, S.N., Købler, C., Mølhav, K. et al. (2017). Not all that glitters is gold—Electron microscopy study on uptake of gold nanoparticles in *Daphnia magna* and related artifacts. *Environ. Toxicol. Chem.*, 36, 1503-1509. <https://doi.org/10.1002/etc.3697>
17. Huang, H., Yuan, Q., & Yang, X. (2005). Morphology study of gold-chitosan nanocomposites. *J. Colloid Interface Sci.*, 282, 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.08.063>
18. Abrica-González, P., Zamora-Justo, J.A., Sotelo-López, A., Vázquez-Martínez, G.R., Balderas-López, J.A., Muñoz-Diosdado, A. et al. (2019). Gold nanoparticles with chitosan, N-acetylated chitosan, and chitosan oligosaccharide as DNA carriers. *Nanoscale Res. Lett.*, 14, 258. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3083-y>

19. Baumann, J., Köser, J., Arndt, D., & Filser, J. (2014). The coating makes the difference: Acute effects of iron oxide nanoparticles on *Daphnia magna*. *Sci. Total Environ.*, 484, 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.023>
20. Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U. et al. (2007). Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small*, 3, 1941-1949. doi:10.1002/sml.200700378.