

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y
DISEÑO



“Síntesis de nanopartículas de plata utilizando extractos de *Dunaliella salina* SQ y el ensamble por referencia del gen codificante para la enzima fitoeno sintasa (PSY) involucrado en la ruta metabólica del β -caroteno.”

T E S I S

Que presenta para obtener el grado de INGENIERO EN
NANOTECNOLOGÍA

ABRIL ADRIANA CASTRO LEÓN

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. HAYDEE LÓPEZ RODRÍGUEZ

CODIRECTOR DE TESIS:

DR. DANTE ALBERTO MAGDALENO MONCAYO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

OCTUBRE DE 2023

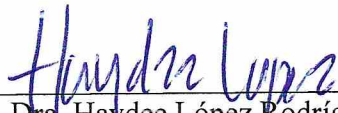
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

“Síntesis de nanopartículas de plata utilizando extractos de *Dunaliella salina* SQ y el ensamble por referencia del gen codificante para la enzima fitoeno sintasa (PSY) involucrado en la ruta metabólica del β -caroteno.”

TESIS

Que presenta para obtener el grado de INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA
ABRIL ADRIANA CASTRO LEÓN

Aprobada por el siguiente comité:



Dra. Haydee López Rodríguez

Directora



Codirector




Dr. Jorge Octavio Mata Ramírez

Sinodal



Sinodal



Sinodal

Resumen

En este trabajo se realizó la síntesis verde y caracterización de AgNPs y Ag₂O Nps utilizando el extracto de *Dunaliella salina* SQ como agente reductor, se demostró que para este método la luz funciona como un catalizador y que el tiempo de formación de las NPs es dependiente de la intensidad de la luz inducida. Además, se llevó a cabo la identificación *in silico* del gen codificante para la enzima PSY que se considera la primer reguladora en la ruta metabólica del β -caroteno, sustancia que participa en la síntesis de las AgNPs, se encontró que *D. salina* SQ no comparte el gen PSY con la única secuencia de este gen reportado para la misma especie, sin embargo presenta una cobertura de 100% para el gen PSY de *Dunaliella bardawil* 847 pero presenta cinco variaciones en la secuencia de nucleótidos: cuatro SNV y una INDEL. Por último, en este estudio se propone una dirección de trabajo hacia el aprovechamiento del estudio de la biología molecular y de la genética para el progreso y perfeccionamiento de los métodos verdes para la síntesis de materiales.

Palabras clave: *Nanopartículas de plata, síntesis verde, Dunaliella salina, bioinformática.*

Agradecimientos

A mi directora, la Dra. Haydee López Rodríguez por su mentoría e invaluable apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A mi codirector, el Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo por confiarme este proyecto e introducirme a la bioinformática.

A los miembros del comité de evaluación, el Dr. Oscar González Davis, al Dr. Guillermo Amaya Para y al Dr. Jorge Octavio Mata Ramírez por su disposición y tiempo.

A la Dra. Eunice Vargas Viveros y el Dr. Oscar González Davis por su apoyo durante el proceso de caracterización de materiales.

A la Universidad Autónoma de Baja California, la academia de nanotecnología y a todos los docentes involucrados en mi desarrollo académico y formación como profesionista.

A la Ing. Renee Fernanda Espinoza Gutiérrez por su invaluable colaboración y acompañamiento en el desarrollo de este proyecto.

A mi familia por siempre confiar en mí, apoyarme en cada momento y demostrarme el significado del amor incondicional.

A mis amigos, por escucharme, acompañarme, apoyarme y brindarme su presencia hasta en los momentos más difíciles.

Y, por último, al Psic. Alejandro Luján Contrares por guiarme en este proceso, sin su ayuda no estaría aquí.

Índice

Introducción	1
Nanociencia y Nanotecnología	1
Nanopartículas	2
Nanopartículas de plata.....	3
Química verde	4
Dunaliella salina.....	9
Biosíntesis del β-caroteno	11
Identificación in silico de genes	14
Justificación	16
Hipótesis.....	19
Objetivos	19
Objetivos generales	19
Objetivos específicos	19
Metodología	21
I. Preparación del extracto de Dunaliella salina SQ	23
III. Caracterización de las nanopartículas de plata.....	26
IV. Identificación de genes involucrados en la ruta metabólica del β-caroteno en Dunaliella salina SQ.....	26
Resultados y Discusiones	28
Síntesis y caracterización	28
Identificación del gen codificante para la fitoeno sintasa (PSY) en la ruta metabólica del β-caroteno de la cepa Dunaliella salina SQ.....	40
Conclusiones	45

Índice de Figuras

Figura 1. Rutas metabólicas para la biosíntesis de <i>Dunaliella salina</i> . Tomado de Polle et al., (2020a).	13
Figura 2. Cultivo por lotes de <i>Dunaliella salina</i> SQ en medio de cultivo Johnson modificado 1.5 M NaCl.	22
Figura 3. Microalga <i>Dunaliella salina</i> SQ en medio de cultivo Johnson modificado observada con objetivo x100.	22
Figura 4. Protocolo de preparación del extracto de <i>Dunaliella salina</i> SQ	24
Figura 5. Diagrama del protocolo de síntesis biológica de nanopartículas de plata utilizando extracto de <i>Dunaliella salina</i> SQ como agente reductor.	25
Figura 6. Producto de la reducción de AgNO ₃ mediante <i>Dunaliella salina</i> SQ bajo tres condiciones de exposición a la luz.	29
Figura 7. Síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando el extracto de <i>D. salina</i> SQ a diferentes tiempos de reacción. a) Caso I. Luz solar. b) Caso II. Luz artificial.	29
Figura 8. Espectro UV-Vis de AgNPs registradas en función del tiempo de reacción expuestas a la luz solar de 1 a 30 min.	32
Figura 9. Espectro UV-Vis de AgNPs registradas en función del tiempo de reacción expuestas a la luz artificial de 5 a 40 min.	33
Figura 10. Espectro UV-Vis de AgNPs registradas en función del tiempo de reacción sin exposición a la luz solar de 5 a 40 mi	34
Figura 11. Difractograma de rayos X de las AgNPs sintetizadas mediante luz solar.	37
Figura 12. Difractograma de rayos X de las AgNPs sintetizadas mediante luz artificial. ...	38
Figura 13. Estructura del gen PSY en <i>Dunaliella bardawil</i> 847.	42
Figura 14. Captura de pantalla del alineamiento visualizado en Tablet parte 1.	44
Figura 15. Captura de pantalla del alineamiento visualizado en Tablet parte 2.	44

Índice de Tablas

Tabla I. Organismos utilizados en síntesis verde.	7
Tabla II. Concentración de soluciones para medio de cultivo Johnson modificado.	21
Tabla III. Absorbancia máxima de AgNPs expuestas a luz solar con relación al tiempo. ...	31
Tabla IV. Tamaños de partículas por dispersión de luz dinámica.	35
Tabla V. Genes de referencia.	41
Tabla VI. Estadísticas de calidad de los alineamientos.	43
Tabla VII. Estadísticas de calidad de las variables encontradas.	43

Introducción

Nanociencia y Nanotecnología

En 1959 los términos Nanociencia y Nanotecnología (NyN) fueron presentados a la Sociedad Americana de Física durante la conferencia “There’s Plenty of Room at the Bottom: An invitation to Enter a New Field of Physics” de Richard Feynman, quien propuso el estudio de la materia a nano-escala como un camino para revolucionar la ciencia moderna. En su visión, la nanotecnología nos permitiría desarrollar tecnologías tales como la fabricación de nanoestructuras, la producción de materiales y dispositivos mediante mecanismos de evaporación, el “nano copiado” y la manipulación de los átomos (Bayda et al., 2019; Hulla et al., 2015; Lindsay, 2010).

En la actualidad la nanotecnología se define como el diseño, la síntesis, caracterización y aplicación de materiales, dispositivos y sistemas controlando su forma y tamaño con precisión atómica. De acuerdo a la Fundación Nacional de los Estados Unidos, la NyN es el estudio basado en varios parámetros clave para controlar el procedimiento de síntesis en la fabricación de materiales con dimensiones en el rango de 1 a 100 nm. A la vez, estos materiales pueden ser combinados de diferentes maneras para aprovechar sus diversas propiedades y formar novedosas estructuras (Bayda et al., 2019). La nanotecnología es requerida por los diferentes campos de la ciencia y la industria para suplir diferentes demandas de acuerdo a los retos que cada una de estas representa. Las nanoherramientas, nanomateriales y nanodispositivos pueden ser utilizados en un rango grande de sectores, abarcando desde tecnología de la información, la industria aeroespacial y de transportación, electrónica, seguridad nacional y defensa, textiles y confección, biotecnología y agricultura, alimentos y nutrición hasta medicina y salud, entre muchos otros (Kumar et al., 2023).

La importancia de los nanomateriales radica en sus propiedades únicas y mejoradas en comparación a su contraparte en la macroescala, siendo la mayor diferencia el aumento del área superficial y del radio superficie-volumen que permite llevar a cabo procesos de manera más eficiente. Además, dichas propiedades pueden ser manipuladas si se controlan ciertas variables como el método de fabricación, la forma, tamaño y composición química, lo que hace muy conveniente la aplicación y el aprovechamiento de estos (Cao, 2004; Hobson, 2011).

Nanopartículas

De acuerdo a la agencia de la Unión Europea se define a los nanomateriales (NM) como un material natural o sintético que contiene partículas en un *unbound state* o como un agregado o aglomerado donde el 50% o más de las partículas tienen una dimensión dentro del rango de 1-100 nm. Además de la escala, presentan propiedades únicas como su forma, área específica y reactividad, haciéndolos muy distintos de los materiales en bulto (Satish Arvind Ahire et al., 2022).

Los NM cero dimensionales (0D) son materiales que tienen sus tres dimensiones (x,y,z) en la nanoescala, usualmente representados como nanopartículas (NPs) esféricas. Las NPs han sido consideradas como las precursoras de la nanotecnología ya que tienen propiedades estructurales únicas tales como tallas ultra-pequeñas, una gran relación superficie-volumen y una mayor cantidad de sitios activos por unidad de masa (Khan et al., 2019; Sulaiman et al., 2013; Wang et al., 2020). Con el tiempo, el estudio de las NPs se ha vuelto cada vez más grande creando cada vez más variaciones de este tipo de material, tenemos nanopartículas basadas en carbono, nanopartículas orgánicas, nanopartículas inorgánicas, nanopartículas óxido-metálicas, nanopartículas magnéticas y nanopartículas metálicas (Satish Arvind Ahire et al., 2022).

Como su nombre lo indica, las nanopartículas metálicas (MNPs) son entidades con núcleos compuestos de metales inorgánicos puros, por ejemplo, de oro, platino, titanio, zinc, cerio, hierro y talio o de óxidos metálicos, que suelen tener un recubrimiento ya sea de moléculas orgánicas, inorgánicas o de otro óxido metálico (Khan, 2020; Piñón-Segundo et

al., 2013). Debido a los intentos exitosos de producir MNPs a escalas piloto, estas han alcanzado un buen mercado en productos que son consumidos en el día a día, como productos dermatológicos, cosméticos, fármacos, aditivos, baterías, catalizadores, recubrimientos antibacteriales, sistemas electrónicos, etc. (Schrand et al., 2010).

Nanopartículas de plata

El uso de formas coloidales de plata con actividad antimicrobiana data desde los tiempos de los antiguos egipcios y Romanos, que además las utilizaban para teñir vitrales con intenciones decorativas (Chumakov et al., 2018; Mody et al., 2010). En la modernidad, las nanopartículas de plata (AgNPs) han atraído el interés de investigadores debido a sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas, anti-inflamatorias y anti-cancerígenas (Ong and Nyam, 2022), además de su alta conductividad eléctrica, óptica y térmica (Wang et al., 2020). Dichas características las hacen útiles para un vasto número de aplicaciones, como en catálisis, electrónica, optoelectrónica, así como invaluable en el área médica, alimenticia, cosmética y de farmacia (Chumakov et al., 2018; Vishwanath & Negi, 2021).

Varios métodos se han desarrollado para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs), de manera general, se pueden subdividir en tres grandes categorías: métodos físicos, métodos químicos y métodos biológicos (Zhang et al., 2016).

Los métodos físicos tal como su nombre lo indica, son aquellos que utilizan agentes físicos como la aplicación de calor, descargas eléctricas, plasma o radiación electromagnética, siendo los más convencionales la ablación láser y espray pirolisis, estos suelen ser rápidos y requieren un mínimo consumo de reactivos químicos, sin embargo, presentan desventajas importantes como un alto requerimiento de energía, bajos rendimientos y costos elevados (Islam, 2021; Pryshchepa et al., 2020). Por otro lado, la aproximación química implica la transformación química de los reactivos iniciales, que consisten en cuatro componentes principales: el precursor metálico, el agente reductor, los agentes estabilizadores/de recubrimiento y el solvente. Para la síntesis de AgNps suele tratarse de cuatro reacciones químicas, el método de Turkevich, reducción de borohidruro,

reacción de Tollens y el proceso de poliol (Pryshchepa et al., 2020). Los métodos químicos suelen ser superiores a los físicos en cuanto a rendimiento y facilidad de producción además de su bajo costo, sin embargo, el problema surge al intentar obtener partículas de alta pureza y un tamaño definido, requiriendo un paso extra para conseguir la estabilidad de las mismas, además que para este tipo de síntesis se suelen utilizar agentes como el citrato, borohidruro, tioglicerol y el 2-mercaptoetanol, que son conocidos por su toxicidad y ser perjudiciales para los organismos vivos (Ijaz et al., 2022; Zhang et al., 2016). Por este último motivo, los investigadores han enfocado sus esfuerzos en producir AgNPs mediante métodos verdes que buscan reemplazar los agentes tóxicos por moléculas menos tóxicas obtenidas de fuentes biológicas.

Química verde

La química verde, también conocida como química sustentable tiene como objetivo el diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan el uso o generación de sustancias peligrosas en el diseño, manufactura y aplicación de estos (US EPA, 2013). La química verde se rige de acuerdo a 12 principios (Anastas and Eghbali, 2010):

- a) **Prevención de residuos:** Diseñar síntesis químicas que evitan los residuos. No dejar residuos que tratar o limpiar.
- b) **Maximizar la economía atómica:** Diseñar síntesis en las que el producto final contiene la proporción máxima de los materiales iniciales. Desechar pocos o ningún átomo.
- c) **Diseñar síntesis químicas menos peligrosas:** Diseñar síntesis que usan o generan sustancias con menor o no toxicidad para los humanos o el medio ambiente.
- d) **Diseñar productos químicos más seguros:** Diseñar productos químicos que son completamente efectivos, aunque tienen poca o no toxicidad.
- e) **Usar solventes y condiciones de reacción más seguros:** Evitar usar solventes, agentes de separación u otros auxiliares químicos. Si debes usar estos químicos, usar una alternativa más segura.

f) Aumentar la eficiencia energética: Realizar reacciones químicas a temperatura y presión ambiente siempre que sea posible.

g) Usar materia prima renovable: Utilizar materia prima que es renovable en vez de agotable. La fuente de las materias primas renovables suelen ser productos agrícolas o desperdicios de otros procesos; la fuente de las materias primas agotables suelen ser combustibles fósiles (petróleo, gas natural, carbón) o la minería.

h) Evitar derivados químicos: Evitas usar grupos protectores o de bloqueo o cualquier modificación temporal si es posible. Los derivados usan reactivos adicionales y generan residuos.

i) Usar catalizadores, no reactivos estequiométricos: Minimizar residuos utilizando reacciones catalíticas. Los catalizadores son efectivos en pequeñas cantidades y pueden llevar a cabo una sola reacción muchas veces. Son superiores a los reactivos estequiométricos, los cuales son usados en exceso y llevan a cabo una reacción sólo una vez.

j) Diseñar productos químicos que se degradan después de su uso: Diseñar productos químicos que se descomponen en sustancias inocuas después de sus uso para evitar que estos se acumulen en el medioambiente.

k) Analizar en tiempo real para prevenir contaminación: Incluir in-process, monitoreo en tiempo real y control durante la síntesis para minimizar o eliminar la formación de subproductos.

l) Minimizar el potencial de acciones: Diseñar químicos y sus estados físicos (sólido, líquido o gaseoso) para minimizar el potencial de accidentes químicos incluyendo explosiones, incendios y emisiones en el medioambiente.

En la nanotecnología, la química verde ha sido estudiada y empleada como un proceso limpio, seguro, rentable y amigable con el medio ambiente que nos permite fabricar nanomateriales utilizando fuentes biológicas como materia prima (Ong and Nyam, 2022; Vishwanath and Negi, 2021). La síntesis biológica sigue los mismos fundamentos teóricos que las aproximaciones químicas, la diferencia es que los agentes reductores y de

recubrimiento que intervienen en las reacciones deben ser de origen biológico. Comúnmente se considera a estos métodos como respetuosos con el medio ambiente, ya que evitan el uso de sustancias tóxicas o nocivas, además que generalmente las nanopartículas obtenidas mediante métodos biológicos presentan una menor toxicidad para células eucariotas debido a que el agente de recubrimiento suele estar compuesto de proteínas, terpenos y flavonoides que se encuentran de manera natural en un ser vivo (Islam, 2021; Vishwanath and Negi, 2021).

La síntesis verde de nanopartículas pretende minimizar los residuos generados durante la reacción de síntesis, procurando que ésta se lleve a cabo sin la formación de subproductos tóxicos significativos. Además, no requiere de condiciones de reacción drásticas, manteniendo la energía total de reacción al mínimo. No se utilizan productos químicos tóxicos y se busca que todos los agentes reductores utilizados sean biomoléculas, es decir reductores biológicos que pueden reciclarse y regenerarse, sin aumentar los residuos netos en el medio ambiente. El producto final de las nanopartículas de plata también tiende a ser más puro y menos tóxico, en consecuencia, el riesgo de contaminación en el caso de biosíntesis es relativamente bajo, implicando que las nanopartículas de plata sintetizadas por este método son intrínsecamente más seguras y puras que las sintetizadas por métodos físicos o químicos (Guevara et al., 2016).

Se han utilizado numerosos organismos para sintetizar AgNPs mediante síntesis biológica (Tabla I), por ejemplo, algunas bacterias, incluyendo *Pseudomonas stutzeri* AG25, varias cepas de *Lactobacillus*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Brevibacterium casei*, también numerosos hongos tales como *Fusarium oxysporum* y *Ganoderma neo-japonicum*, de igual manera se han utilizado extractos de plantas, por ejemplo, *Allophylus cobbe*, *Artemisia princeps*, y *Typha angustifolia*. Por otro lado, se ha documentado la síntesis utilizando una variedad de biomoléculas como biopolímeros, almidón, enzimas, aminoácidos (Zhang et al., 2016) y metabolitos animales (Cepoi et al., 2022).

Tabla I. Organismos utilizados en síntesis verde.

Fuente del reductor	Tamaño de partícula (nm)	Propiedades de interés	Autor
Kinneretia THG-SQ14	15-20	Actividad antibacterial ante patógenos humanos y efecto sinérgico con antibióticos estándar contra bacterias Gram-negativas.	(H. Singh et al., 2017)
<i>Dunaliella salina</i>	15.26	Potencial anticancerígeno contra la línea celular MCF-7.	(A. K. Singh et al., 2017)
<i>Eucalyptus chapmaniana</i>	-	Actividad antimicrobiana contra bacterias y levaduras, actividad antitumoral contra la línea celular HL-60.	(Sulaiman et al., 2013)
<i>Cannabis sativa</i>	26.52	Potencial antibacterial, anti-levaduras y actividad inhibitoria para la Alpha-amilasa.	(Chouhan and Guleria, 2020)
<i>Oscillatoria limnetica</i>	3.30 -17.97	Actividad antibacterial contra bacterias resistentes a antibióticos, efecto citotóxico contra las líneas celulares MCF-7 y HCT-116	(Hamouda et al., 2019)
<i>Terminalia arjuna</i>	-	Potencial como catalizador en la degradación de tintes peligrosos	(Raj et al., 2020)
<i>Aspergillus sydowii</i>	1-24	Actividad antifúngica y actividad anti proliferativa en células HeLa y MCF-7	(Wang et al., 2021)
<i>Eugenia roxburghii</i> DC	25-50	Actividad contra biopelículas bacterianas	(Giri et al., 2022)
<i>Ulva rigida</i>	12	Actividad anticancerígena contra línea celular MCF-7, actividad antifúngica	(Algotiml et al., 2022)
<i>Cystoseira myrica</i>	17	Actividad antimicrobiana	(Algotiml et al., 2022)
<i>Gracilaria foliifera</i>	24	Actividad citotóxica contra línea celular MCF-7	(Algotiml et al., 2022)
Extracto de granos de café	8.64 -38.99	Detección de peróxido de hidrógeno	(Srikhao et al., 2022)
Metabolito de <i>Streptomyces malachiticus</i>	23.7	Actividad contra la fibrosis hepática	(Elzoheiry et al., 2022)
<i>Allium sativum</i>	10-30	Actividad antidiabética	(Jini et al., 2022)
Extracto de ajo	50-350	Tratamiento de esperma	(Ali et al., 2023)
<i>Pseudomonas canadensis</i>	21-52 nm	Efecto antiviral contra <i>Pseudomonas tolaasii</i> Pt18	(Ghasemi et al., 2023)
<i>Aloe vera</i>	30.5	Inhibición de productos finales de glicación avanzada	(Ashraf et al., 2016)

Además de los organismos antes mencionados, las macroalgas y microalgas también han sido estudiadas como una alternativa para la síntesis verde de AgNPs. Se han utilizado algas verdes, cafés y cianobacterias. Generalmente las AgNPs fabricadas mediante algas presentan propiedades antibacterianas, antifúngicas o con actividad antitumoral, haciéndolas una gran opción para aplicaciones médicas (Guevara et al., 2016).

El proceso de síntesis biológica de nanopartículas mediante cultivos de bacterias, cianobacterias, algas u hongos se basa en aprovechar los mecanismos de protección de los organismos vivos, es decir la capacidad de estos para lograr bioacumulación de diferentes metales en una forma menos tóxica y de sobrevivir bajo condiciones medioambientales desfavorables. De acuerdo con la literatura, estos mecanismos de protección están desarrollados de mejor manera en especies extremófilas de bacterias, arqueas y microalgas. Cuando hablamos de organismos extremófilos nos referimos a aquellos que pueden sobrevivir a condiciones ambientales extremas, por ejemplo, las especies termófilas, psicrófilas, acidófilas, alcalófilas, halófilas, barófilas y radioresistentes (Cepoi et al., 2022).

Un buen ejemplo de este tipo de organismos es la microalga halófila *Dunaliella salina*, la cual además de ser conocida por ser una fuente importante de β -caroteno para la industria farmacéutica (A. K. Singh et al., 2017), también puede ser utilizada como un biorreactor para obtener nanopartículas. Sus principales ventajas residen en su sencillez de cultivar y el amplio rango temperatura y salinidad que pueden tolerar, además se ha demostrado que utilizando sus extractos se pueden obtener nanopartículas biocompatibles que son estables en soluciones hipersalinas, además que el extracto de *Dunaliella* por sí mismo presenta actividad antitumoral in vitro e in vivo (Chumakov et al., 2018).

Dunaliella salina

Las especies del género *Dunaliella* son algas unicelulares, biflageladas, mononucleares con un sólo cloroplasto y sin pared celular con una cubierta celular tipo glicocálix. Algunas especies de *Dunaliella* son conocidas por ser organismos halófitos, por tanto, suelen habitar en aguas hipersalina o salobres, distribuyéndose desde los trópicos hasta la antártica (Borowitzka, 2018; Polle et al., 2020b). La naturaleza extremófila de *Dunaliella* sp. ha sido estudiada desde hace varios años, se concluyó que esta capacidad de soportar variaciones y concentraciones muy altas de salinidad se debe a múltiples adaptaciones. La primera de ellas es que, en vez de estar provista de una pared celular rígida, tiene una matriz pericelular elástica que se ajusta al volumen de la célula cuando hay cambios en la salinidad extracelular (Polle et al., 2020a). El segundo mecanismo de adaptación es la acumulación de glicerol, un soluto compatible e infinitamente soluble, por lo tanto, nunca cristaliza y actúa como un osmótico intracelular que protege la integridad de las proteínas en la célula (Borowitzka, 2018). Por último, *Dunaliella* sp. cuenta con transportadores que le permiten adquirir hierro y anhidrasas carbónicas únicas implicadas en la concentración de carbono, esto para sobrevivir en ambientes con baja solubilidad donde el hierro está menos disponible (Polle et al., 2020a).

Otra característica importante de las especies halófitas de *Dunaliella*, es su respuesta metabólica al estrés. Especies como *D. salina* y *D. bardawil* responden al estrés abiótico del ambiente mediante la acumulación de β -caroteno en glóbulos plastídicos logrando acumular hasta el 10-14% de su peso seco (Gómez and González, 2005; Polle et al., 2020a). Dicha particularidad ha hecho a ambas tanto un objeto de estudio para describir modelos de acumulación de carotenos inducidos por estrés y además las ha posicionado como especies de importancia industrial para la producción de β -caroteno que por su actividad antioxidante se comercializa como suplemento, colorante, aditivo cosmético, entre otros (Gómez and González, 2005). En el caso de *D. salina*, además de ser una fuente importante de β -caroteno, también se ha propuesto su aplicación en otras áreas como indicador de toxicidad, producción de biodiésel, biometano, lípidos y anticancerígenos, al mismo tiempo se ha demostrado su

potencial uso en biorremediación y el tratamiento de aguas residuales (Ahmed et al., 2017; Celente et al., 2022).

La ciencia de materiales no se ha quedado atrás en el estudio y aprovechamiento de las singularidades de esta microalga para la producción de nanomateriales. En el año 2011, investigadores experimentaron con la síntesis de AgNPs utilizando diferentes algas directamente en su medio, entre ellas *D. salina*, en dicha publicación se reportó que *D. salina* no tuvo actividad de síntesis (Mohseniazar et al., 2011). Más tarde, en 2016, desarrollaron un método foto-inducido para llevar a cabo la fabricación de AgNPs usando el extracto de *D. salina* como agente reductor, mediante el cual consiguieron AgNPs esféricas de aproximadamente 15 nm con actividad anticancerígena (A. K. Singh et al., 2017). Dos años después reportaron la síntesis de nanopartículas de oro de 8 nm utilizando la biomasa de *D. salina*, demostrando que estas son capaces de reducir otros metales además de la plata (Chumakov et al., 2018). A pesar de que este método ha sido ampliamente estudiado, el mecanismo de formación de las nanopartículas aún no es completamente claro (Mahdiah et al., 2012). Recientemente, se estudió el cambio en la composición de la biomasa de *D. salina* durante el proceso de síntesis de AgNPs utilizando el extracto de esta microalga, se encontró que en las primeras 24 h de formarse las AgNPs hay una disminución en el contenido de proteínas, β -caroteno y lípidos en la biomasa en un 65%, 70% y 56%, respectivamente, sugiriendo que la formación de las AgNPs se da principalmente por los grupos amina y alquilo alifático presentes en el sistema de reacción (Cepoi et al., 2022).

Una de las principales fuentes de grupos alquilo alifático en el sistema de reacción es el β -caroteno, que se acumula de manera masiva dentro de glóbulos en los espacios intertilacoidales del cloroplasto en la microalga *D. salina* (Paniagua-Michel et al., 2009), se trata de un carotenoide compuesto de 8 unidades de isopreno que están cicladas en los extremos. A diferencia del β -caroteno sintético, en *D. salina* la configuración de los dobles enlaces puede darse de diferentes formas, ya sea que todos sean trans o con el isómero 9-cis (Gómez & González, 2005; Paniagua-Michel et al., 2009).

Biosíntesis del β -caroteno

Debido a la importancia comercial que representa este compuesto en la industria cosmética y farmacéutica, y el interés en los modelos de acumulación de moléculas inducidos por estrés (Capa-Robles et al., 2009; Polle et al., 2020a), la biosíntesis de β -caroteno (Figura 1) ha sido ampliamente estudiada con el objetivo de entender mejor el proceso y mejorar su producción, incluso se han identificado las rutas metabólicas que llevan a la acumulación de carotenos y otros isoprenoides en algunas cepas de *D. salina* (Siqueiros-Vargas, 2017).

De manera universal se considera al isopentenil difosfato (IPP) y a su isómero dimetilalil fosfato como los precursores de la biosíntesis de todos los carotenoides en plantas y algas. A su vez el IPP es producido por dos rutas metabólicas: la ruta del mevalonato (MVA) que parte del acetyl Co-A y la ruta independiente del mevalonato (MEP) que utiliza ácido pirúvico y D-gliceraldehído como precursores (Paniagua-Michel et al., 2009; Polle et al., 2020a; Yang and Guo, 2014).

Independientemente de la ruta por la cual se obtenga el IPP, la primera reacción de la carotenogénesis es regulada por la fitoeno sintasa (PSY), que condensa dos moléculas de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) para obtener fitoeno, (Polle et al., 2020a). Siguiendo un metabolismo parecido al de plantas superiores y otras algas verdes, la fitoeno desaturasa (PDS) cataliza la primera desaturación del fitoeno en fitoflueno, el cual sufre una segunda desaturación que resulta en ζ -caroteno. Una segunda serie de desaturaciones es provocada por la enzima ζ -caroteno desaturasa (ZDS), generando la producción de neurosporeno y posteriormente, licopeno. Por último, la enzima licopeno- β -ciclase (LCY- β) se encarga de ciclar los extremos del licopeno, y así es como se obtiene la molécula de β -caroteno (Sandmann, 2002; Siqueiros Vargas Fabián, 2017).

A pesar de que al día de hoy la fisiología, bioquímica y tecnología de cultivo de *Dunaliella salina* está bien estudiada todavía hay una carencia de trabajos enfocados en el proceso molecular de la biosíntesis de β -caroteno y sólo se han aislado pocas secuencias de nucleótidos codificantes para las enzimas carotenogénicas en ciertas cepas de esta especie

(Yan et al., 2005; Zhu et al., 2008). Sumado a eso, muchas cepas aisladas de *Dunaliella* existentes en colecciones de cultivos siguen estando identificadas incorrectamente, dando lugar a confusiones en la literatura (Ben-Amotz et al., 2009). Además, se ha demostrado que el genoma mitocondrial y de cloroplasto de esta microalga presenta muchas diferencias en tamaño y contenido de GC dependiendo de la cepa de origen (Lopez et al., 2017; Magdaleno et al., 2017) y que de manera general *D. salina* presenta una vasta variabilidad intra-específica que podría conducir a suposiciones erróneas cuando la información procedente de una cepa (o clon) se extrapola a toda la especie (Ben-Amotz et al., 2009).

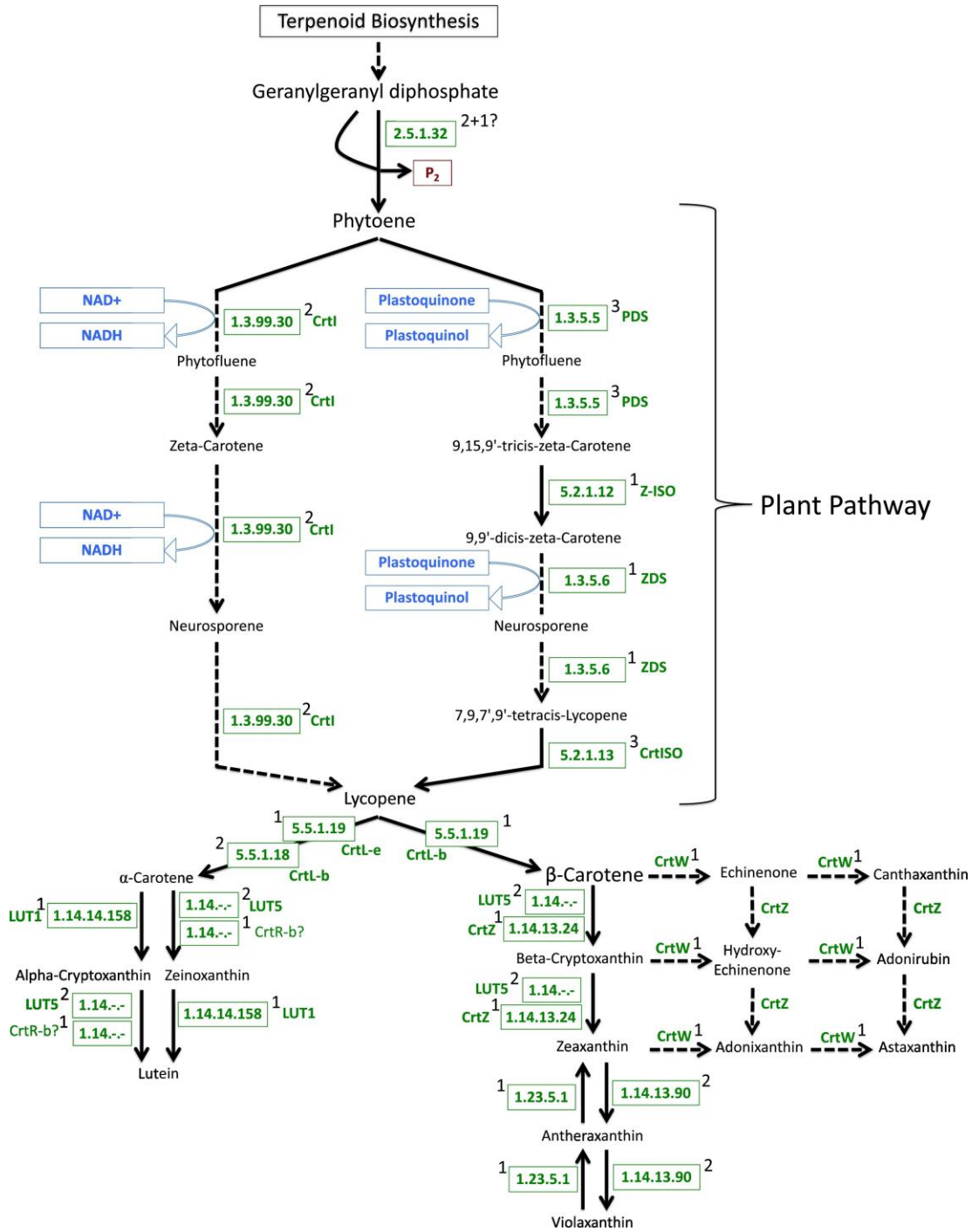


Figura 1. *Rutas metabólicas para la biosíntesis de Dunaliella salina. Tomado de Polle et al., (2020a).*

Fitoeno sintasa (PSY)

La fitoeno sintasa (PSY) es la enzima encargada de catalizar la reacción de formación de fitoeno y por tanto se considera como la primera enzima clave en la regulación de la velocidad de producción de carotenoides en organismos fotosintéticos ya que desempeña un papel importante en el flujo de recursos de carbono hacia la síntesis de carotenoides (Tran et al., 2009; Yan et al., 2005; Ye et al., 2008).

A día de hoy, mediante NCBI es factible acceder a secuencias para PSY de *D. salina* y *D. bardawil* que han sido detectadas y analizadas en esta ruta metabólica, no obstante, hasta ahora sólo se ha reportado un gen de PSY para *D. salina* (Yan et al., 2005) desafortunadamente, no se dispone de información suficiente para determinar si la cepa empleada por Yan et al. (2005) puede ser clasificada como una cepa de *D. salina* (Ben-Amotz et al., 2009). En vista de, todavía es preciso identificar y caracterizar el gen de la PSY para las diferentes cepas de *D. salina*.

Identificación *in silico* de genes

En 2017, se caracterizó el genoma completo de una cepa originaria de San Quintín, Baja California, México, la cual se nombró como *Dunaliella salina* SQ (Lopez et al., 2017; Magdaleno et al., 2017). Cabe mencionar, que aún no se conocen los genes que codifican a las enzimas reguladoras de la ruta del β -caroteno para esta cepa. No obstante, es posible identificarlos con la aplicación de herramientas computacionales y de análisis para obtener e interpretar datos biológicos. A este campo interdisciplinario que involucra a las ciencias computacionales, matemáticas, física y biología se le conoce como bioinformática y se le considera una parte esencial de la biología moderna (Bayat, 2002). Una de las múltiples aplicaciones de la bioinformática consiste en el ensamble de genomas e identificación de genes o clústeres de genes (Chavali & Rhee, 2018, 2018). El descubrimiento de genes mediante enfoques *in silico* es una estrategia complementaria que incrementa de manera significativa la probabilidad de identificar genes, aunque por sí sola no resulta suficiente.

Este proceso consta de tres pasos fundamentales: (1) el mapeo de loci, (2) la búsqueda de genes y (3) la identificación de variantes de ADN. La identificación o predicción *in silico* de genes es el primer paso para la anotación genómica después de la secuenciación, de ahí radica su importancia en la búsqueda del entendimiento de la organización y funcionamiento del genoma (Yu, 2008).

Finalmente, la obtención de las secuencias genómicas completas es importante para los análisis genómicos funcionales, los escaneos de todo el genoma para las selecciones, la evaluación del impacto de las variaciones genéticas y los reordenamientos en la evolución, el estudio de las respuestas a los cambios ambientales o la expresión génica (Lischer & Shimizu, 2017). A su vez, la ingeniería genética aprovecha estos conocimientos para manipular de manera intencional el material genético alterando, reparando o mejorando su forma o función (Robert & Baylis, 2008).

Justificación

Por simple que parezca, el estudio de la materia a escala nanométrica y sus aplicaciones ha significado un completo cambio en nuestro estilo de vida durante los últimos años, contribuyendo continuamente a casi cualquier área de la ciencia y la ingeniería desde la fabricación de novedosos materiales y dispositivos, hasta el profundo entendimiento de la maquinaria biológica y los procesos celulares (Bayda et al., 2019).

A los materiales con dimensiones dentro del rango de 1 a 100 nm se les conoce como nanomateriales, estos presentan características únicas de gran importancia comercial, motivo por el cual la búsqueda constante de la mejora y optimización de sus procesos de fabricación es primordial. Un ejemplo serían las nanopartículas de plata, las cuales han generado mucha expectativa entre los investigadores, incluso podrían considerarse como uno de los materiales más estudiados en la actualidad, principalmente porque sus propiedades físicas y químicas son deseables en múltiples campos, siendo aplicadas tanto en electrónica hasta en el posible tratamiento de cáncer (Khan et al., 2019; National Institute for Occupational Safety and Health, 2020; Ong and Nyam, 2022; Sajid, 2022; Saleh, 2020; Sohail et al., 2019; Sulaiman et al., 2013; Wang et al., 2020).

Las AgNPs pueden ser sintetizadas mediante aproximaciones físicas, químicas o biológicas. Las aproximaciones físicas suelen ser rápidas y sencillas, sin embargo los rendimientos son bajos al compararlos con los de métodos químicos, los cuales podrían parecer ideales pero representan un costo ambiental alto debido al uso de solventes sumamente tóxicos, motivando así a la aplicación de los principios de la química verde para el desarrollo de procesos donde se sustituyan estas sustancias por unas menos tóxicas extraídas de fuentes biológicas como plantas, hongos, bacterias y animales (Ijaz et al., 2022; Islam, 2021; Pryshchepa et al., 2020; Zhang et al., 2016). Algo importante a mencionar es que el uso de reductores biológicos en la síntesis de AgNPs no solo interviene en la generación de la partícula en sí, sino también le confiere un recubrimiento que varía dependiendo de la fuente que se esté utilizando, modificando las propiedades físicas, químicas y funcionales de la partícula. Por ejemplo, aquellas AgNPs fabricadas por extractos

de algas suelen presentar actividad antibacteriana, antifúngica y antitumoral (Guevara et al., 2016).

Se ha reportado que los organismos extremófilos suelen ser ideales para la síntesis biológica de nanopartículas ya que tienen mecanismos de protección que les permiten una mayor bioacumulación de ciertas sustancias, como los metales pesados, de una manera menos tóxica (Cepoi et al., 2022). Un ejemplo de este tipo de organismos es la microalga halófila *Dunaliella salina* comercialmente conocida por su alto contenido de β -caroteno (10-14% de su peso seco) y recientemente utilizada para la síntesis de AgNPs con propiedades antibacterianas (Mohseniazar et al., 2011; A. K. Singh et al., 2017). Si bien la síntesis mediante el uso de extractos de *D. salina* ya ha sido reportada, también se ha encontrado mediante estudios genómicos de diferentes cepas que hay mucha variabilidad genética entre la misma especie dependiendo de su lugar de origen (Lopez et al., 2017; Magdaleno et al., 2017).

A pesar de que el mecanismo de reacción para la síntesis biológica de AgNPs se mantiene un tanto desconocido. Anteriormente se ha demostrado que durante la formación de AgNPs utilizando el extracto de *D. salina* hay una disminución del 65% de contenido de proteínas, 70% de β -carotenos y 56% de los lípidos presentes en el sistema de reacción, haciendo a los grupos alquilo alifáticos y amina responsables de la formación de las partículas, suponiendo al β -caroteno como el principal reductor en la reacción y a las demás biomoléculas como agentes estabilizantes y de recubrimiento (Cepoi et al., 2022).

Como se mencionó al principio de esta sección, la nanotecnología no solo nos ha permitido fabricar materiales y dispositivos novedosos, sino también nos ha dado un mayor entendimiento de la célula y su funcionamiento provocando el desarrollo de la ingeniería genética, facilitando la manipulación del genoma de diferentes organismos hasta el punto donde es posible controlar la producción de sustancias específicas dentro de las células, siendo la biosíntesis de insulina en células de *E. coli* uno de los principales ejemplos de éxito para este tipo de tecnologías.

Ahora, al abordar la síntesis de AgNPs desde una aproximación biológica se nos revela la posibilidad de unir dos mundos que en un inicio parecían muy lejanos, la ingeniería de materiales y la ingeniería genética. Sin embargo, antes de comenzar a intentar modificar la capacidad de producción de β -caroteno en *D. salina*, es necesario conocer el genoma de este organismo y los genes involucrados en la ruta metabólica de la biosíntesis del β -caroteno. En el caso de la cepa *D. salina* SQ se encuentra reportado su genoma más no se han identificado los genes específicos para la producción de dicha sustancia. Es posible llevar a cabo esta tarea mediante el análisis de datos utilizando herramientas computacionales y matemáticas, es decir aplicando métodos bioinformáticos, incluyendo el ensamble de Novo y por referencia de secuencias del genoma. Una vez completado esto, habremos establecido el punto de partida para llevar la síntesis biológica de AgNPs utilizando extracto de *Dunaliella salina* SQ a otro nivel de control y entendimiento, así como también se habrán identificado diferencias genómicas entre esta cepa y las reportadas anteriormente (Basantani et al., 2017; Bayat, 2002; Chavali and Rhee, 2018; Lischer and Shimizu, 2017).

Hipótesis

El extracto de *Dunaliella salina* SQ actúa como reductor y agente de recubrimiento en la síntesis verde de nanopartículas de plata.

Objetivos

Objetivos generales

Sintetizar nanopartículas de plata utilizando el extracto de *Dunaliella salina* SQ y realizar el ensamble por referencia para identificar los genes involucrados en la síntesis del β -caroteno.

Objetivos específicos

1. Obtener el extracto de la microalga *Dunaliella salina* SQ en un medio de cultivo Johnson modificado mediante un protocolo publicado por Singh, et. al. para la síntesis verde de nanopartículas de plata.
2. Llevar a cabo la reacción del nitrato de plata con el extracto de *Dunaliella salina* SQ utilizando tres diferentes condiciones de luz (luz solar, luz artificial, sin luz) para confirmar la naturaleza foto-dependiente de la misma.
3. Medir la curva de absorbancia de las partículas obtenidas utilizando espectroscopía UV-Vis para identificar el plasmón superficial característico de las nanopartículas de plata.

4. Calcular la distribución de tamaños de las partículas con el equipo de dispersión de luz dinámica para comprobar la naturaleza nano del producto.
5. Realizar el ensamble por referencia para el genoma de *Dunaliella salina* SQ empleando diferentes herramientas bioinformáticas para identificar el gen codificante para la enzima fitoeno sintasa involucrado en la ruta metabólica del β -caroteno.

Metodología

Para la síntesis biológica de nanopartículas de plata se utilizó como materia prima el extracto del alga *Dunaliella salina*, específicamente la cepa *D. salina* SQ (Fig. 3) aislada de San Quintín, Baja California. Se hicieron cultivos por lotes en matraces Erlenmeyer (Fig. 2) utilizando un medio de cultivo Johnson modificado (Tabla 2) con una concentración 1.5 M de cloruro de sodio y 50 mM de bicarbonato de sodio. Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente con exposición a luz artificial 24h a una luminosidad promedio de 16,000 lux. Los cultivos se cosecharon al término de su fase de crecimiento exponencial, al rededor del noveno o décimo día después de su siembra.

Tabla II. Concentración de soluciones para medio de cultivo Johnson modificado.

Compuesto	Concentración
Cloruro de sodio	1.5 M
Bicarbonato de sodio	50 mM
Sulfato de magnesio pentahidratado	5 mM
Nitrato potasio	10 mM
Cloruro de calcio	0.2 mM
Fosfato de potasio monobásico	7 uM
Ácido bórico	5uM
Cloruro de manganeso tetrahidratado	2 uM
Cloruro de Zinc	1 uM
Cloruro de cobalto dihidratado	1 uM
Molibdato de amonio tetrahidratado	1 uM



Figura 2. Cultivo por lotes de *Dunaliella salina* SQ en medio de cultivo Johnson modificado 1.5 M NaCl.

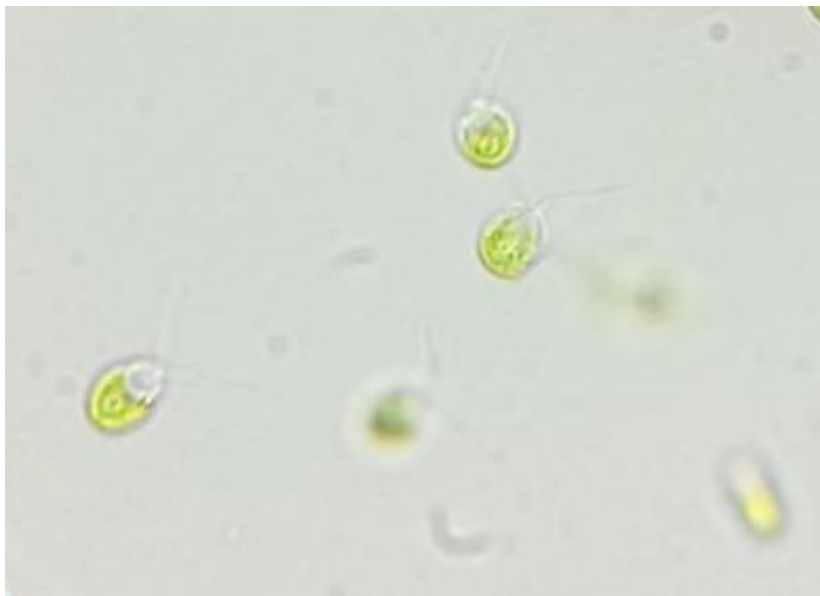


Figura 3. Microalga *Dunaliella salina* SQ en medio de cultivo Johnson modificado observada con objetivo x100.

I. Preparación del extracto de *Dunaliella salina* SQ

Para la obtención de la biomasa húmeda primero se separaron las células del medio mediante centrifugación a 6500 rpm por 4 min, la biomasa recuperada se lavó con agua desionizada y el pellet formado se resuspendió en agua desionizada mantenido una proporción de 6 mL de H₂O por cada gramo de biomasa. Posteriormente la suspensión se calentó a baño maría durante 15 min a 80°C y por último el extracto se filtró al vacío, se dejó enfriar por 30 min y se utilizó ese mismo día para la síntesis de AgNPs (Fig. 4).

II. Síntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto de *Dunaliella salina*

Una vez obtenido el extracto, se procedió a la síntesis de AgNPs (Fig. 5). A una solución 4 mM de nitrato de plata (AgNO₃) se añadió el extracto de *D. salina* en una proporción 5% v/v con agitación constante a 40° C finalizando la reacción a los 30 min. Se utilizaron tres condiciones de exposición a la luz:

Caso I. Exposición bajo luz solar directa. El sistema de reacción se instaló al aire libre en un día soleado entre las 12 y 16 horas, se midió la luminosidad de la luz solar con un luxómetro Steren HER-408, el cual marcó una lectura de luminosidad promedio de 97,300 lux.

Caso II. Exposición bajo luz artificial. En un laboratorio cerrado se colocó el sistema de reacción a una distancia de 15 cm de un foco de luz cálida con una luminosidad promedio medida de 16,000 lux.

Caso III. Sin exposición a la luz. Para evitar la exposición a la luz la reacción se llevó a cabo en un laboratorio cerrado y se cubrió completamente con papel aluminio el vaso de precipitado en el que se realizó el experimento.

Posterior a la síntesis, las nanopartículas se separaron y purificaron del medio de reacción mediante centrifugación a 4500 rpm durante 15 min, y se lavaron en agua desionizada 3 veces, por último, se secaron al vacío a 60 ° C por 24 h y se almacenaron para su caracterización.

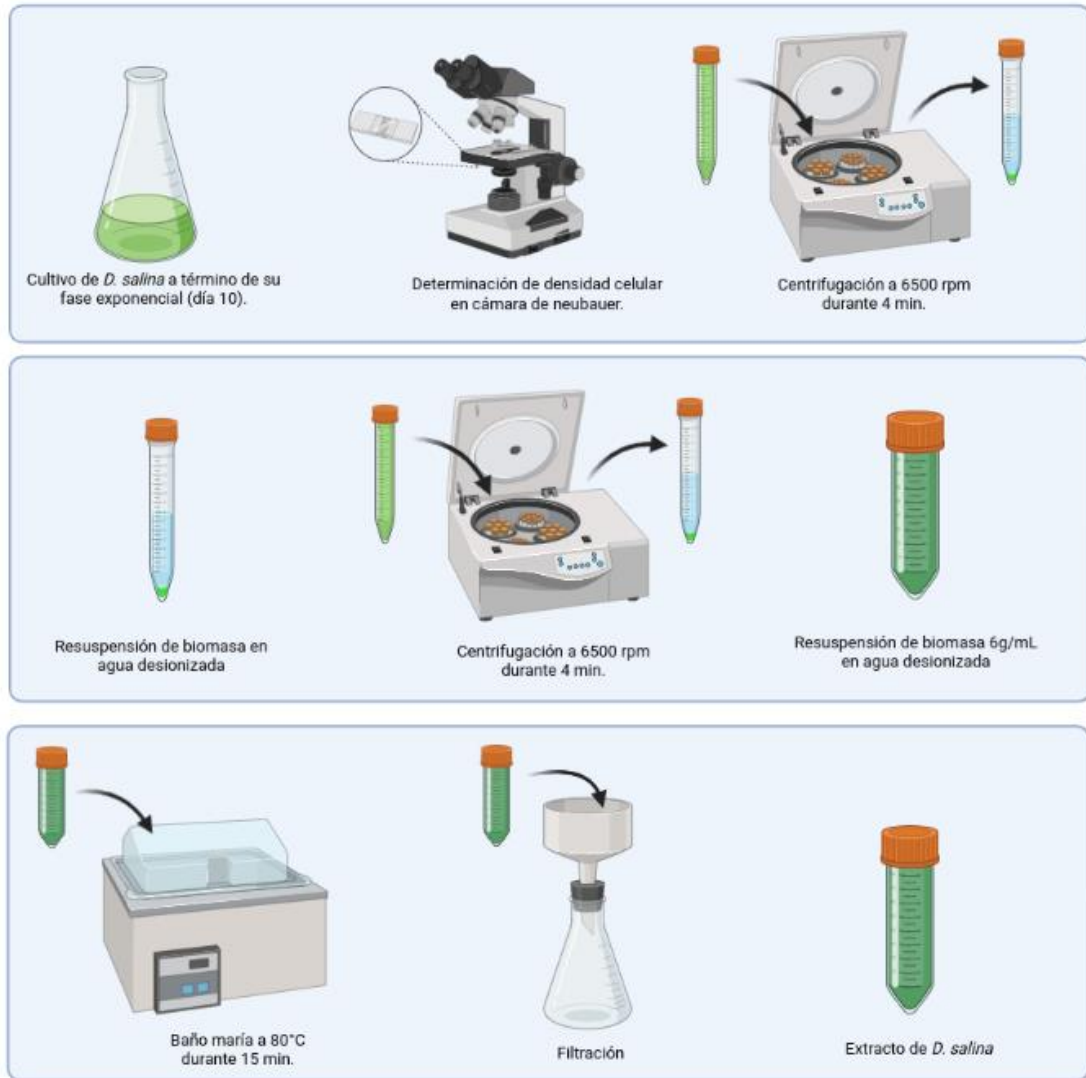


Figura 4. Protocolo de preparación del extracto de *Dunaliella salina* SQ

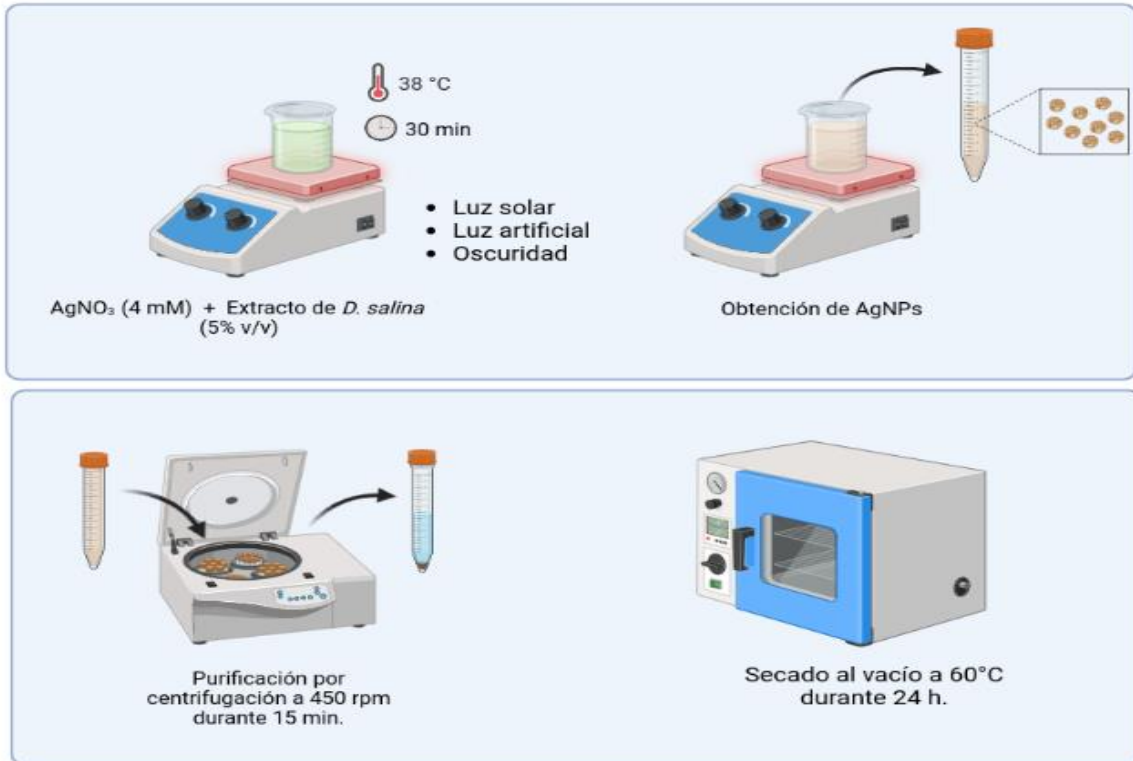


Figura 5. Diagrama del protocolo de síntesis biológica de nanopartículas de plata utilizando extracto de *Dunaliella salina* SQ como agente reductor.

III. Caracterización de las nanopartículas de plata

Se evaluó la formación de las AgNPs mediante espectroscopía UV-Visible utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10s (ThermoFisher), para ello se tomó una alícuota de 1 mL del medio de reacción cada 5 minutos y se midió el espectro de absorbancia en un rango de 300-700 nm, en el caso I además se realizaron mediciones en el primer y tercer minuto después de haber empezado la reacción. Posterior a la purificación de las AgNPs se determinó el tamaño y distribución de partícula utilizando la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) en agua desionizada mediante un equipo Zetasizer NanoZS (Malvern). Por último, las AgNPs purificadas se secaron y pulverizaron para caracterizar su estructura cristalina por medio de Difracción de rayos X utilizando un Difractómetro de rayos X D2 Phaser (Bruker) con una radiación Cu-K α $\lambda=1.54184 \text{ \AA}$.

IV. Identificación de genes involucrados en la ruta metabólica del β -caroteno en *Dunaliella salina* SQ

Para la selección de los genes de referencia se buscó el gen de la PSY para *D. salina* en NCBI y también se utilizaron scaffolds ensamblados mediante SPAdes (Bankevich et al., 2012) con una longitud entre 50k-100k pb para hacer alineamientos contra la base de datos de NCBI mediante BLASTn y se seleccionaron aquellos genes de la fitoeno sintasa que se alinearon con los scaffolds.

Se llevó a cabo el ensamblaje utilizando datos de secuenciación obtenidos mediante Illumina HiSeq y como referencia se usaron los genes codificantes para las PSY recuperados de NCBI con número de referencia: AY547325.1, DQ057342, FJ262989.1, FJ262988.1, EU328288.1.

Para hacer el ensamblaje de los genes se desarrolló una herramienta que automatiza el proceso, se utilizó fastQC para evaluar calidad de las lecturas (Andrew S., 2010), Trimmomatic para la limpieza de estas (Bolger et al., 2014), bowtie2 (Langmead and

Salzberg, 2012) para hacer los alineamientos y SAMtools (Li et al., 2009) para la manipulación de estos. Posteriormente se empleó SAMtools para filtrar las lecturas no alineadas o “unmapped” y también evaluar la calidad y cobertura de los alineamientos obtenidos

Resultados y Discusiones

Síntesis y caracterización

Se hizo reaccionar una sal de plata (AgNO_3) con el extracto de *Dunaliella salina* bajo tres condiciones de exposición a la luz: luz solar, luz artificial y oscuridad (Fig. 6). Para el caso I (Fig. 7A), el sistema de reacción se colocó bajo luz solar directa durante 30 minutos, desde el primer minuto de reacción se observó un cambio colorimétrico en la solución pasando del tono verde claro, consecuencia de la adición del extracto de *D. salina*, a un tono amarillo que fue cambiando a naranja cobrizo en los minutos siguientes, a la par se empezaron a formar pequeñas agregaciones en la solución, las cuales pasadas los 5 minutos fueron creciendo cada vez más cambiando el color de la solución a un gris con tonalidades violetas, transcurridos 10 minutos ya no era observable a simple vista ningún cambio significativo en la solución. En el caso II (Fig. 7B) el cambio en la coloración ocurrió de una manera más lenta, durante los primeros 5 minutos apenas y era perceptible un cambio colorimétrico en la solución, sin embargo, después de 15 minutos el sistema de reacción adquirió un tono naranja cobrizo y empezaron a ser notorias pequeñas partículas suspendidas del mismo color, las cuales con el tiempo fueron agregándose y formando un precipitado, pero sin llegar al tono gris-violeta que se observó en el caso I. Por último, para el caso III no se observó ningún cambio colorimétrico durante la reacción. Considerando estas observaciones es posible advertir en una primera instancia que tanto la velocidad de formación de nanopartículas y el producto que se obtiene de la misma depende de la intensidad y del tipo de luz que se emplea durante la síntesis.

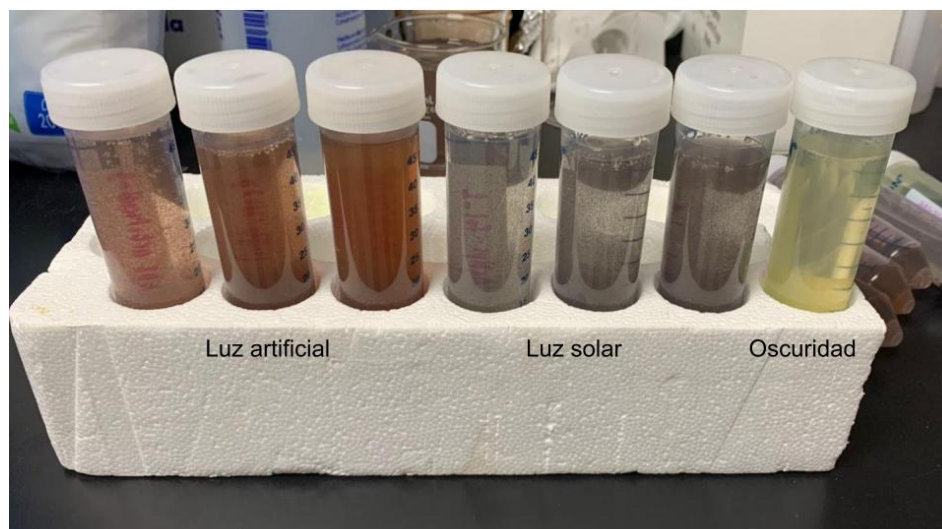


Figura 6. Producto de la reducción de AgNO_3 mediante *Dunaliella salina* SQ bajo tres condiciones de exposición a la luz.

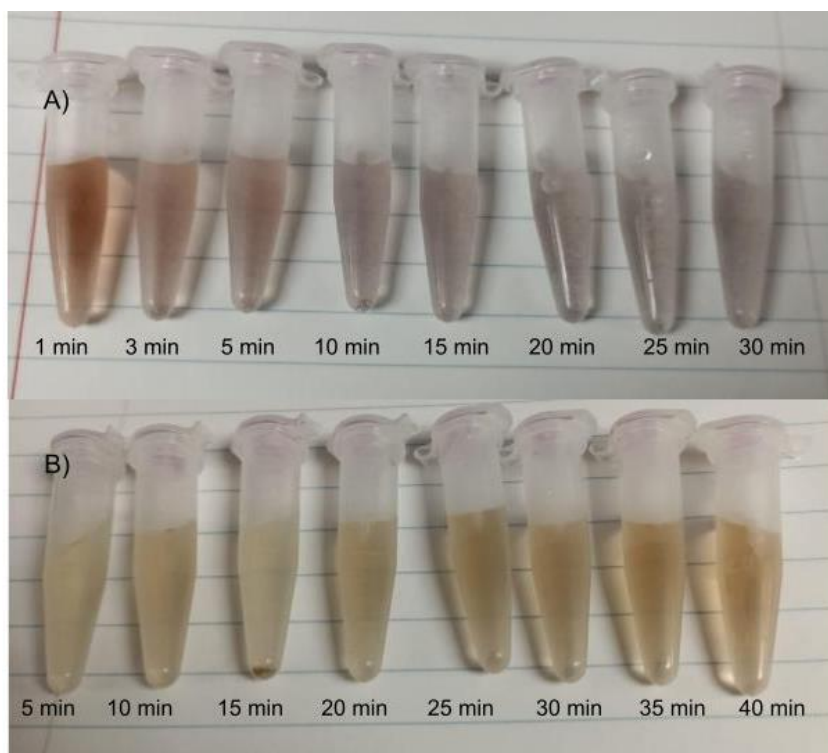


Figura 7. Síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando el extracto de *D. salina* SQ a diferentes tiempos de reacción. a) Caso I. Luz solar. b) Caso II. Luz artificial.

La resonancia de plasmón de superficie (SPR) es un fenómeno óptico que ocurre cuando se hace incidir luz sobre un metal noble excitando a los electrones libres de la banda de conducción y generando una onda colectiva a lo largo de la superficie del metal que tal como su nombre lo indica se encuentra en resonancia con la onda de luz incidente (Zhang et al., 2016), se ha encontrado la banda de SPR es específica para cada metal y dependiente de la morfología y tamaño del material, por ello se utiliza como medida en la caracterización de nanopartículas metálicas.

Para comprobar la reducción del nitrato de plata y la formación de nanopartículas de plata se identificó la banda de absorción de resonancia de plasmón de superficie (SPR) característica de la plata mediante escaneos de absorbancia en el rango de la luz visible utilizando la técnica de espectroscopía UV-Vis. En la reacción con luz solar (Fig. 8) desde el primer minuto se identificó un pico de máxima absorbancia a los 431 nm confirmando la formación de AgNPs, lo que coincide con lo reportado en la literatura para la síntesis de AgNPs utilizando el extracto de *D. salina* (Cepoi et al., 2022; A. K. Singh et al., 2017). Transcurridos 3 minutos la absorbancia se redujo notoriamente y el pico de absorbancia se desplazó hacia la derecha a los 454 nm, posteriormente para las siguientes mediciones el pico de absorbancia siguió desplazándose a longitudes de menor energía (Tabla III) y al mismo tiempo la intensidad del pico se redujo aplanando la curva con cada medición, este tipo de comportamiento en la síntesis de AgNPs se asocia a la formación de agregados que se hizo visible desde los primeros tres minutos de reacción (Bélteky et al., 2019). En el caso II (Fig. 9) el cambio colorimétrico ocurrió de manera menos abrupta por lo que la primera medición se realizó a los 5 minutos obteniendo un pico de máxima absorbancia a los 428 nm que indica a la formación de nanopartículas de plata y otros dos picos más pequeños a los 490 y 670 nm que corresponden al extracto de *D. salina* que aún no ha reaccionado con la sal de plata, en las siguientes mediciones se observa como el pico se desplaza hasta 431 nm y va aumentando en absorbancia indicando un aumento en la concentración de AgNPs y haciéndose cada vez más ancho lo que se asocia al crecimiento de las AgNPs mientras que los picos en 490 y 670 nm se fueron reduciendo hasta desaparecer después de 35 minutos de reacción implicando que el extracto de *D. salina* se consumió casi en su totalidad para este momento. Por último, en el caso III (Fig. 10) se obtuvieron picos de absorbancia en los 420 nm, 490nm y 670 nm

desde los primeros 5 minutos registrando la presencia de iones de plata (Ag^+) y del extracto de *D. salina*, aun así, en las mediciones siguientes vemos que los picos mantienen su absorbancia durante 40 minutos sin llegar a formar AgNPs que puedan ser recuperadas o utilizadas para las siguientes caracterizaciones. Como vimos anteriormente, la nucleación de las nanopartículas es dependiente del tiempo y la velocidad de formación de AgNPs, así como el producto que se obtiene de la síntesis varía de acuerdo a la intensidad y el tipo de luz que se hace incidir, además se ha demostrado en otros trabajos que la longitud de onda empleada también tiene un impacto en el tamaño y forma de las nanopartículas obtenidas (Chugh et al., 2021). Ya se ha demostrado en varias ocasiones que la luz tiene un efecto importante durante la síntesis de nanopartículas especialmente cuando se utilizan algas como agente reductor. Se teoriza que si bien el extracto de *Dunaliella salina* es capaz de reducir el nitrato de plata esta requiere de una fuente de iluminación que actúa como un catalizador y que asiste en la reducción de los cationes de plata (Ag^+) a átomos de plata (Ag^0) los cuales posteriormente forman clústeres y se aglomeran hasta ser AgNPs (Chugh et al., 2021).

Tabla III. Absorbancia máxima de AgNPs expuestas a luz solar con relación al tiempo.

Tiempo (min)	Pico de absorbancia (nm)
1	431
3	456
5	490
10	501
15	555
20	644
25	544
30	668

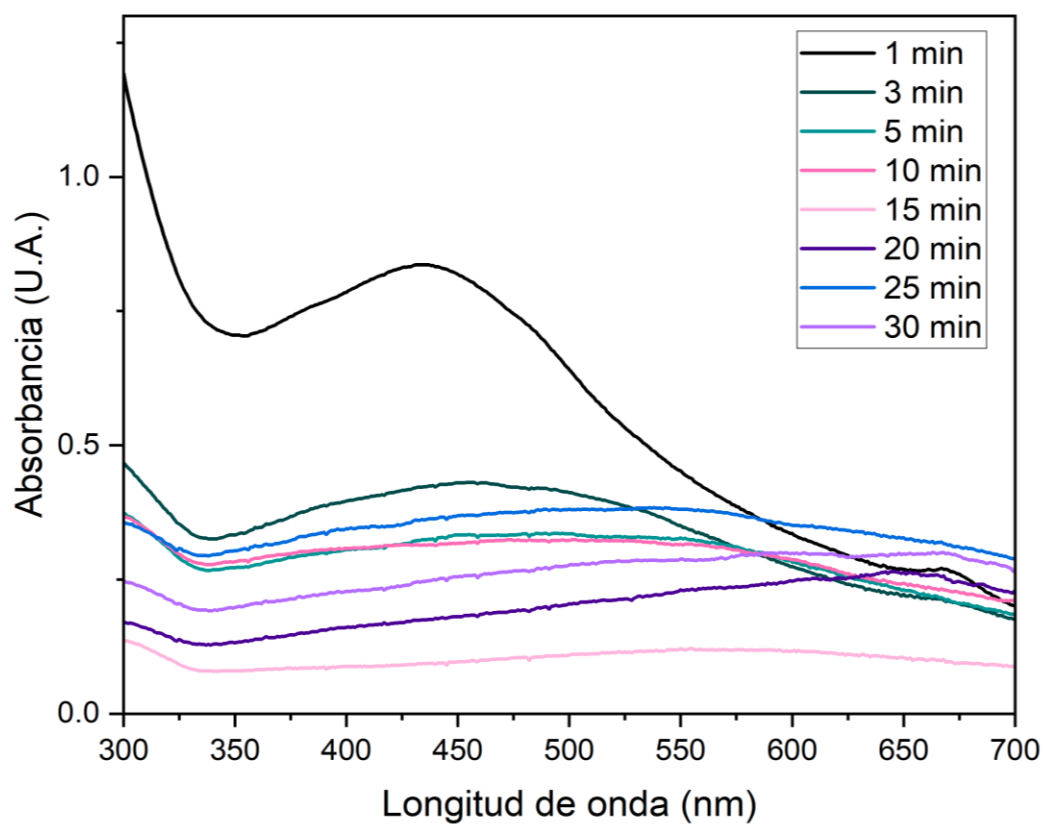


Figura 8. Espectro UV-Vis de AgNPs registradas en función del tiempo de reacción expuestas a la luz solar de 1 a 30 min.

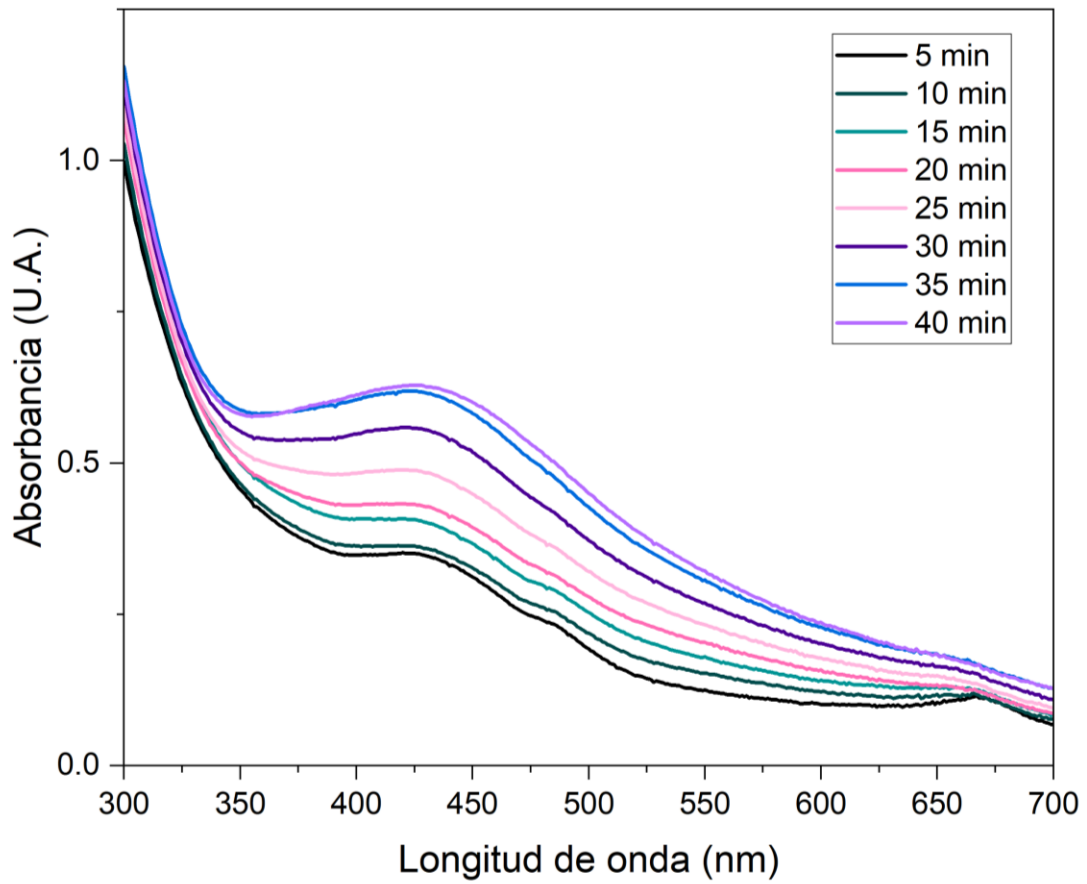


Figura 9. Espectro UV-Vis de AgNPs registradas en función del tiempo de reacción expuestas a la luz artificial de 5 a 40 min.

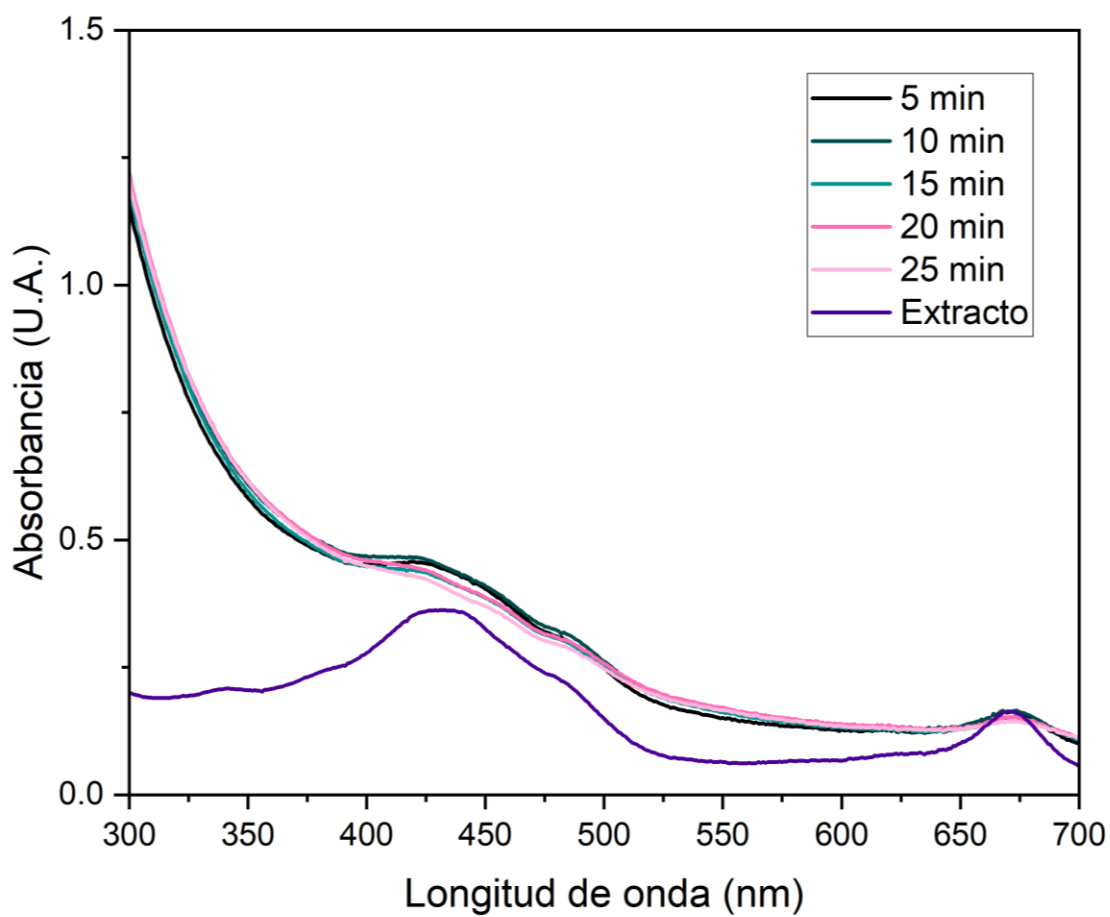


Figura 10. Espectro UV-Vis de AgNPs registradas en función del tiempo de reacción sin exposición a la luz solar de 5 a 40 min.

Posteriormente se purificaron las AgNPs obtenidas en el caso I y II con el objetivo de retirar los residuos que pudieron haber quedado de la reacción y se resuspendieron en agua desionizada. Una vez purificadas, se obtuvo el tamaño hidrodinámico promedio de las AgNPs (Tabla IV) mediante la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS). Para la muestra correspondiente a la síntesis con luz solar resultaron tres tamaños hidrodinámicos promedio, es decir que tenemos tres grupos o subpoblaciones de partículas en nuestra muestra: 186.8 ± 47.15 nm, 1137 ± 308.4 nm y 5560 ± 0 nm. Por otro lado, las AgNPs sintetizadas con luz artificial presentan un solo tamaño hidrodinámico promedio de 59.17 ± 9.407 nm. Sin embargo, en ambos casos se obtuvo un índice de polidispersión mayor de 0.8 es decir que la distribución de tamaños es demasiado amplia y el promedio puede no ser representativo de la muestra, aunque este resultado era esperado debido a la evidente formación de aglomerados en la solución es posible decir que se obtuvieron partículas que entran en la definición de nanomaterial (1-100 nm) para la síntesis mediada por luz artificial.

Tabla IV. Tamaños de partículas por dispersión de luz dinámica.

Caso	Tamaño promedio (d.nm)	Intensidad	Índice de polidispersión
Luz solar	186.8 ± 47.15	32.8 %	0.801
	1137 ± 308.4	66 %	
	5560 ± 0	1.2%	
Luz artificial	59.17 ± 9.407	100%	0.899

Las AgNPs purificadas fueron posteriormente secadas al vacío y pulverizadas, el polvo resultante se caracterizó mediante la técnica de Difracción de rayos X (XRD). Tanto para el caso I (Fig. 11) como el caso II (Fig. 2) se encontraron picos de difracción de los planos cristalinos (111), (200), (220), (311), (222) en los ángulos 38.05° , 44.12° , 64.19° , 76.82° y 85.48° para el caso I y 38.05° , 45.96° , 64.25° , 76.62° y 85.4° para el caso II respectivamente, que corresponden a los planos cristalinos característicos de una estructura cúbica centrada en las caras (FCC) de la plata metálica de acuerdo con lo establecido en los

datos estándar accesibles del Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS card no. 04-0783), del mismo modo, pero en una mayor intensidad se encontraron picos de difracción correspondientes al óxido de plata (Ag_2O) con una estructura cristalina FCC de los planos cristalinos (110), (111), (211) y (222) en los ángulos 27.85° , 32.07° , 46.09° , 54.52° y 67.16° en el caso I y 27.94° , 32.27° , 46.34° , 54.92° y 67.48° en el caso II (JCPDS card No.76-1393). La presencia de la estructura cristalina de óxido de plata, aunque no se había reportado textualmente por los autores, ya se había observado con anterioridad en los difractogramas presentados para la síntesis biológica de AgNPs utilizando la biomasa y el extracto de *D. salina* (Cepoi et al., 2022; A. K. Singh et al., 2017). El motivo exacto de la formación del Ag_2O se desconoce, y debido a que la caracterización por XRD es del tipo estructural y no de composición, los datos obtenidos en este trabajo no son suficientes para determinar si lo que se tiene son nanopartículas de Ag_2O o nanopartículas de plata que se están oxidando en la superficie, sin embargo, se piensa que algún agente oxidante del extracto de *D. salina* podría estar causando la oxidación en una de las fases de formación de las NPs. Aún es necesario profundizar en el estudio del mecanismo de formación de nanopartículas para este método (Dhoondia and Chakraborty, 2012; Ravichandran et al., 2016).

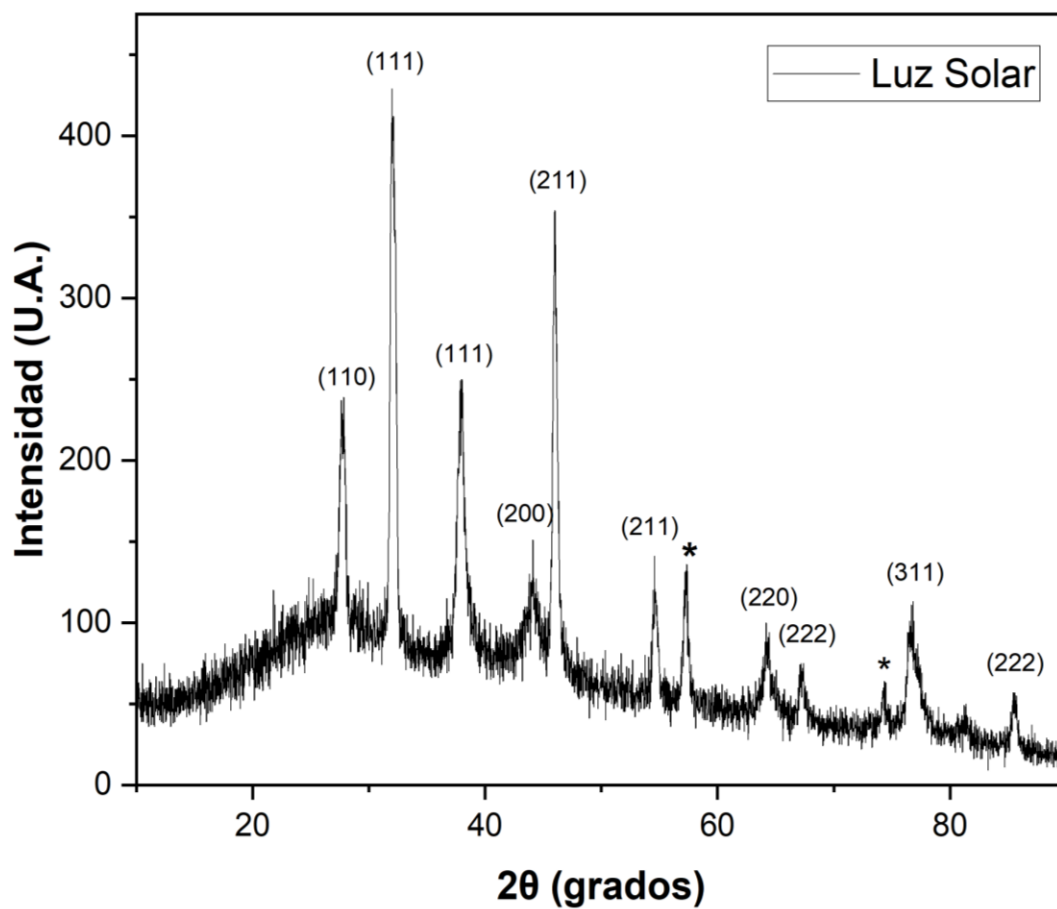


Figura 11. Difractograma de rayos X de las AgNPs sintetizadas mediante luz solar.

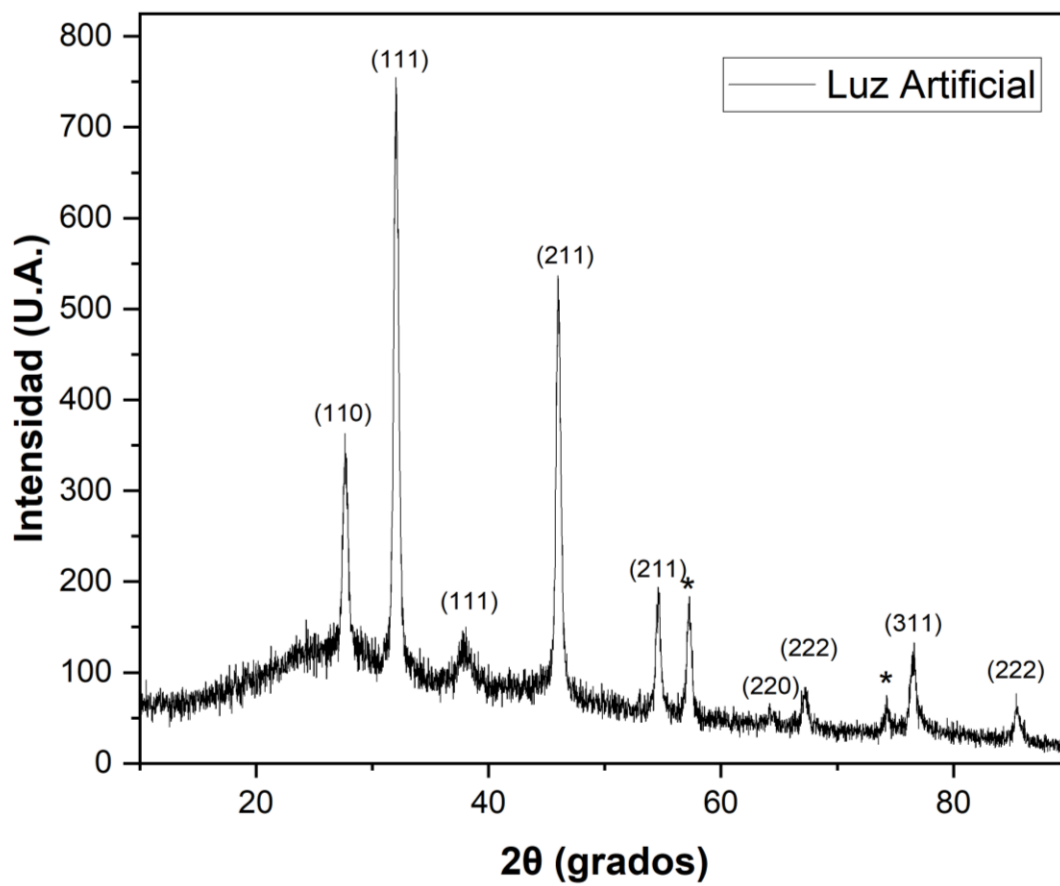


Figura 12. Difractograma de rayos X de las AgNPs sintetizadas mediante luz artificial.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de profundizar en el estudio de la síntesis verde de nanopartículas utilizando el extracto de *D. salina* como reductor, demostrando que aún hay variables que no sólo pueden ser exploradas sino que también tienen el potencial de ser explotadas incluso a nivel industrial, tal es el caso del efecto de la iluminación durante la síntesis, que ahora sabemos funciona como catalizador en la nucleación de partículas y que el producto resultante varía dependiendo de la intensidad de la luz, la longitud de onda inducida y del tiempo de exposición, estos factores pueden ser estandarizados y aprovechados para hacer este método más eficiente y controlable, incluso para desarrollar un dispositivo que permita ajustar la intensidad y longitud de la onda de la luz de acuerdo al tipo de nanopartícula que se desea obtener.

Otro aspecto importante a considerar es la formación de nanopartículas de óxido de plata mediante el método de síntesis empleado, que a pesar de no ser el resultado esperado en comparación con lo reportado en la literatura para esta misma metodología, este puede ser considerado como un área de oportunidad dado que las nanopartículas de óxido de plata son conocidas y estudiadas por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas (Fayyadh and Alzubaidy, 2021), antivirales (Iqbal et al., 2019), anticancerígenas (Sultan, 2023) , fotocatalíticas (Shume et al., 2020), ópticas y eléctricas (Suresh, 2016). Para esta discrepancia en resultados se teoriza la presencia de una sustancia oxidante en el medio de reacción, lo más probable proveniente del extracto de *D. salina*, que de hecho es una variable importante para considerar ya que para este trabajo se utilizó una cepa de *D. salina* aislada de San Quintín, que por lo que sabemos podría presentar diferencias genéticas importantes con cualquier otra cepa de esta misma microalga (López et al., 2017; Magdaleno et al., 2017). Desde nuestra perspectiva es una oportunidad para profundizar en el estudio genómico de *D. salina* e ir identificando qué genes son importantes para la reducción de metales y así en un futuro aprovechar este conocimiento para optimizar el método de síntesis por ejemplo mediante ingeniería genética. En este trabajo se propuso la identificación de genes de la ruta metabólica del β -caroteno en *Dunaliella salina SQ* ya que en trabajos anteriores se ha reportado este compuesto participa en la formación de AgNPs utilizando el extracto de *D. salina* (Cepoi et al., 2022).

Identificación del gen codificante para la fitoeno sintasa (PSY) en la ruta metabólica del β -caroteno de la cepa *Dunaliella salina SQ*

La identificación de genes se refiere al proceso de descubrir y localizar segmentos de ADN que codifican información genética específica, como la secuencia de aminoácidos para una proteína en particular. En este trabajo se presenta la identificación del gen codificante para la enzima fitoeno sintasa involucrada en la biosíntesis del β -caroteno en *D. salina SQ* utilizando como referencia genes de esta misma alga para otra cepa y también de *Dunaliella bardawil* todos obtenidos de la base de datos de NCBI mediante el alineamiento por referencia con lecturas secuenciadas por Illumina Hiseq del genoma completo de la cepa *Dunaliella salina SQ*.

Para la selección de los genes utilizados como referencia (Tabla V) se hizo la búsqueda del gen de la PSY (EC 2.5.1.32) en la base de datos GenBank y se seleccionó el único gen de la fitoeno sintasa completo reportado para *Dunaliella salina* (AY547325.1) (Yan et al., 2005). No obstante, el género *Dunaliella* es controversial por su clasificación taxonómica y la enorme variabilidad fisiológica y molecular intraespecífica de las especies hipersalinas, por ello se averiguó si existía similitud entre el genoma de *Dunaliella salina SQ* con el gen de la PSY de otra especie nombrada bajo el género *Dunaliella*, por tanto se utilizaron ensamblados obtenidos mediante SPAdes, de estos se consideraron 16 scaffolds con una longitud entre 50-100 kpb, dichos scaffolds fueron utilizados para hacer alineamientos mediante BLAST. Estos alineamientos arrojaron similitudes con dos genes de fitoeno sintasa pertenecientes a *Dunaliella bardawil* de las cepas 847 (EU328288.1) y UTEX LB2538 (FJ262989.1), sin embargo estos alineamientos tuvieron una cobertura de apenas 209 pb y 276 pb con un porcentaje de identidad de 79.20% y 82.89% respectivamente, y un query cover de 0% para ambos genes con un E value $2e-50$ para la cepa 847 y de $3e-09$ para UTEXLB 2538 que nos indica que la probabilidad de que estos alineamientos se hicieran aleatoriamente es baja, por ende se decidió utilizar los genes de ambas especies para realizar

alineamientos con el genoma completo de *Dunaliella salina* SQ. La cepa UTEXLB 2538 además presenta otros 2 genes identificados parcialmente (DQ057342 y FJ262988.1) para otras isoformas de esta misma enzima, los cuales también se tomaron a consideración para hacer los alineamientos.

Tabla V. Genes de referencia.

Especie	Gen	Número de referencia
<i>Dunaliella salina</i>	PSY	AY547325.1
<i>Dunaliella bardawil</i> UTEX2538	PSY1A	DQ057342
<i>Dunaliella bardawil</i> UTEX LB2538	PSY2	FJ262989.1
<i>Dunaliella bardawil</i> UTEX LB2538	PSY1B	FJ262988.1
<i>Dunaliella bardawil</i> 847	PSY	EU328288.1

Una vez ubicados los genes, se procedió a hacer el alineamiento utilizando un flujo de trabajo automatizado que nos permitió realizar múltiples corridas con un sólo comando, sin embargo debido al tamaño del genoma y a nuestra capacidad de cómputo y almacenamiento fue necesario llevar a cabo el alineamiento con las secuencias divididas en dos archivos, posteriormente se evaluó la calidad de los alineamientos (Tabla VI) el alineamiento realizado contra el gen de PSY de *Dunaliella salina* resultó en tan sólo dos lecturas, una de 100 pb y otro de apenas 76 pb, ninguna de las dos son consideradas significativas para la identificación del gen debido a que la cobertura es muy baja así como también su profundidad.

Por otro lado, los alineamientos realizados contra los genes PSY1A, PSY1B de *Dunaliella bardawil* cepa UTEX2538 presentaron una buena profundidad promedio de lecturas, pero una cobertura muy baja y un promedio de MAPQ pequeño indicando una baja calidad de mapeo, por lo tanto, se descartaron. De la misma manera el alineamiento del gen

PSY2 de esta misma cepa presentó una cobertura demasiado baja al igual que una profundidad promedio >1 . Por último, el gen PSY de *Dunaliella bardawil* 847 alineó con una cobertura del 100%, una profundidad promedio y un promedio de MAPQ alto, indicando una alta confianza en la calidad del alineamiento.

Conforme a lo reportado, el gen PSY de la cepa *D. bardawil* 847 cuenta con 5 exones y 4 intrones (Fig. 13) franqueados por el sitio canónico donante GT y el sitio aceptor AG codificando a un péptido de 424 aminoácidos con un peso molecular calculado de 48,30 kDa y un punto isoeléctrico teórico (pI) de 9,16, que de acuerdo con BlastP comparte homología con *D. salina* a nivel proteico con un 79% de identidad y 87% de similitud) (Lao et al., 2011).



Figura 13. Estructura del gen PSY en *Dunaliella bardawil* 847.

Subsecuentemente, se hizo el llamado y filtrado de variantes para el alineamiento con el gen PSY de *Dunaliella bardawil* 847 (Tabla VI) y se visualizó el alineamiento mediante Tablet (Fig. 14 y 15). De esta manera se encontraron cuatro variantes de un sólo nucleótido (SNVs) y una inserción-delección (INDEL) con un índice de calidad (QUAL) alto, así mismo una buena profundidad y una calidad de mapeado promedio de 42 para todos los casos, apuntando hacia una detección de variables altamente confiable. De acuerdo a la estructura del gen PSY de *D. bardawil* 847, sólo dos de las variantes se encuentran en regiones codificantes, mientras que las otras tres variantes se ubican dentro de regiones intrónicas lo que para los casos de SNVs no supondría un cambio en la expresión del gen, sin embargo una de estas variantes es del tipo inserción-delección lo que podría cambiar el marco de lectura del gen y por lo tanto modificar la secuencia de aminoácido afectando a la estructura y función de la proteína. Para poder determinar el efecto de las variantes en este gen es necesario profundizar en el análisis y caracterización de este, así como llevar a cabo una verificación experimental para validar la presencia y la estructura del gen en el laboratorio.

Tabla VI. Estadísticas de calidad de los alineamientos.

Gen	Tamaño (pb)	Número de lecturas	Bases cubiertas (pb)	Cobertura (%)	Profundidad promedio	Baseq promedio	MAPQ promedio
Ds PSY	2983	1	100	2.35233	0.0335233	37.6	0
		1	76	2.54777	0.0254777	30.9	0
Db PSY1A	3028	76919	302	9.97358	1088.41	34.5	3.35
		35450	510	16.8428	503.763	34.6	3.36
Db PSY1B	762	215202	195	25.5906	17089.4	34.5	2.93
		106794	430	56.4304	8699.54	34.6	2.84
Db PSY2	2636	79	47	1.783	0.88809	30.7	33.4
		31	44	1.6692	0.355083	31	33.6
Db 847 PSY	3300	2558	3300	100	57.3779	35.7	24.4
		1188	3300	100	26.3691	35.8	23.5

Tabla VII. Estadísticas de calidad de las variables encontradas.

Posición	Base de referencia (REF)	Base alternativa (ALT)	Índice de calidad (QUAL)	Profundidad (DP)	Calidad de mapeo promedio (MQ)
492	C	T	225	53	42
1222	CA	CAA (INDEL)	228	57	42
1888	A	G	225	64	42
2636	T	C	225	45	42
2948	A	T	225	61	42

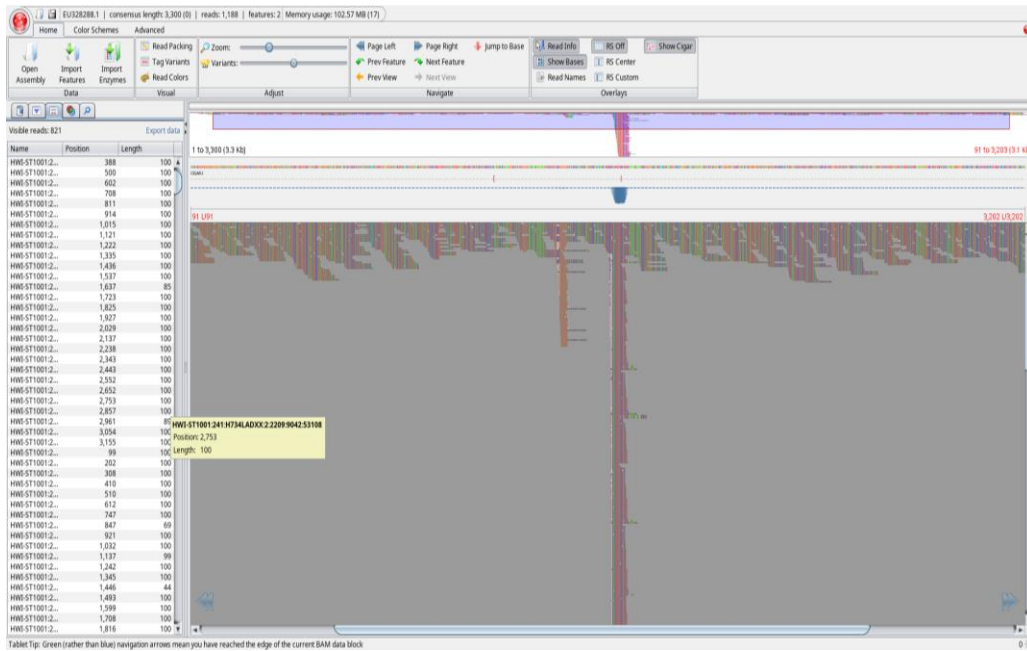


Figura 14. Captura de pantalla del alineamiento visualizado en Tablet parte 1.

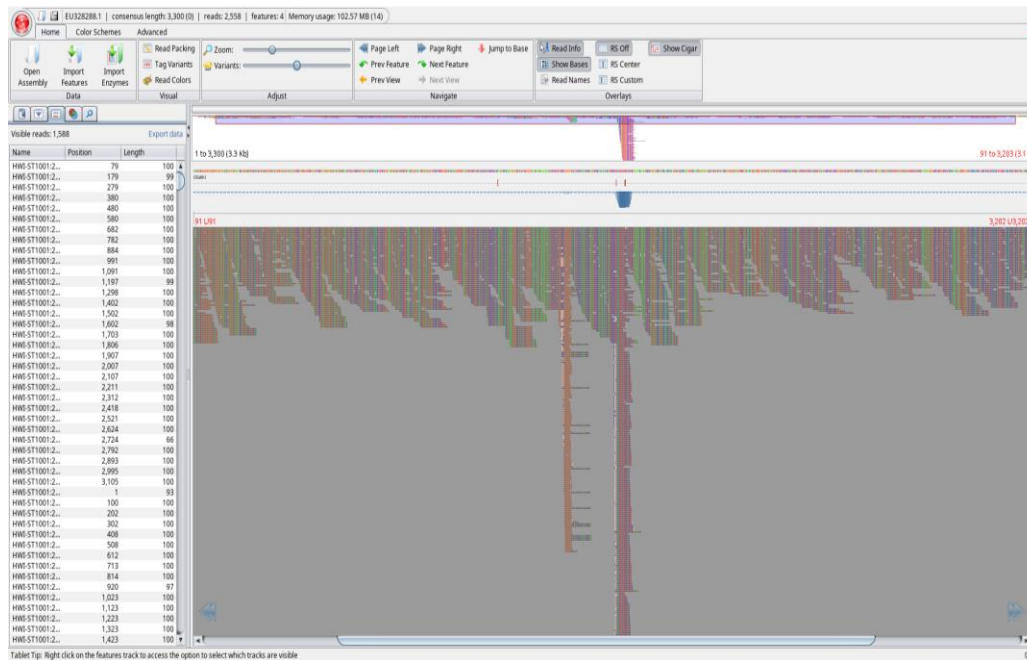


Figura 15. Captura de pantalla del alineamiento visualizado en Tablet parte 2.

Conclusiones

En esta investigación se efectuó con éxito la síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando el extracto del alga verde *Dunaliella salina* SQ como agente reductor. Los resultados de este estudio revelan que la incidencia de la luz en el medio de reacción juega un papel fundamental en el proceso de síntesis funcionando como un catalizador que controla el tiempo de formación de las AgNPs y que además tiene un efecto en las propiedades del producto obtenido. La caracterización estructural de las NPs confirmó la presencia de la estructura cristalina de la plata y también reveló la obtención de óxido de plata, que, si bien no era el producto esperado, este de igual manera puede ser aprovechado en múltiples industrias. Estos resultados abren puerta a futuras investigaciones que podrían explorar la función de la luz en la síntesis verde de AgNPs a diferentes longitudes de onda y además buscar el aprovechamiento de dicho fenómeno para conseguir un método de síntesis más eficiente y controlable.

Asimismo, se desarrolló una herramienta para automatizar el algoritmo de alineamiento por referencia en el proceso de búsqueda de genes mediante la cual se concretó la identificación *in silico* del gen codificante para la PSY, enzima importante en la regulación de la ruta metabólica del β -caroteno. Se encontró que el gen PSY en la cepa *D. salina* SQ no presenta similitud con el reportado en NCBI para *D. salina*, sin embargo, posee una cobertura del 100% con el reportado para *Dunaliella bardawil* 847 con la presencia de SNVs en regiones exónicas e intrónicas, además de un INDEL intrónico que podría representar un cambio en la secuencia de aminoácidos codificante para este gen. Esta investigación contribuye a la literatura existente al proporcionar un punto de partida para la secuenciación y caracterización del gen PSY en *D. salina* SQ y agrega datos para el proyecto de la anotación genómica de dicha microalga, al mismo tiempo participa en el camino hacia el entendimiento de la ruta metabólica del β -caroteno a nivel genético. Por último, esta tesis propone una dirección de trabajo hacia el aprovechamiento del estudio de la biología molecular y de la genética para el progreso y perfeccionamiento de los métodos verdes para la síntesis de materiales.

Referencias

- Ahmed, R.A., He, M., Aftab, R.A., Zheng, S., Nagi, M., Bakri, R., Wang, C., 2017. Bioenergy application of *Dunaliella salina* SA 134 grown at various salinity levels for lipid production. *Sci. Rep.* 7, 8118. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07540-x>
- Algotiml, R., Gab-Alla, A., Seoudi, R., Abulreesh, H.H., El-Readi, M.Z., Elbanna, K., 2022. Anticancer and antimicrobial activity of biosynthesized Red Sea marine algal silver nanoparticles. *Sci. Rep.* 12, 2421. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06412-3>
- Ali, I.A.M., Ahmed, A.B., Al-Ahmed, H.I., 2023. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles for reducing the damage to sperm parameters in diabetic compared to metformin. *Sci. Rep.* 13, 2256. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29412-3>
- Anastas, P., Eghbali, N., 2010. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem Soc Rev* 39, 301–312. <https://doi.org/10.1039/B918763B>
- Andrew S., 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data.
- Ashraf, J.M., Ansari, M.A., Khan, H.M., Alzohairy, M.A., Choi, I., 2016. Green synthesis of silver nanoparticles and characterization of their inhibitory effects on AGEs formation using biophysical techniques. *Sci. Rep.* 6, 20414. <https://doi.org/10.1038/srep20414>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Pribelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Basantani, M.K., Gupta, D., Mehrotra, R., Mehrotra, S., Vaish, S., Singh, A., 2017. An update on bioinformatics resources for plant genomics research. *Curr. Plant Biol.* 11–12, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2017.12.002>
- Bayat, A., 2002. Bioinformatics. *BMJ* 324, 1018–1022.
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., Rizzolio, F., 2019. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* 25, 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Bélteky, P., Rónavári, A., Igaz, N., Szerencsés, B., Tóth, I.Y., Pfeiffer, I., Kiricsi, M., Kónya, Z., 2019. Silver nanoparticles: aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity. *Int. J. Nanomedicine* 14, 667–687. <https://doi.org/10.2147/IJN.S185965>
- Ben-Amotz, A., Polle, J.E.W., Subba Rao, D.V. (Eds.), 2009. The alga *Dunaliella*: biodiversity, physiology, genomics and biotechnology. Science Publishers, Enfield, NH.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Borowitzka, M.A., 2018. Biology of Microalgae, in: *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Elsevier, pp. 23–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7>
- Cao, G., 2004. *Nanostructures & Nanomaterials: Synthesis, Properties & Applications*. Imperial College Press.
- Capa-Robles, W., Paniagua-Michel, J., Soto, J.O., 2009. The biosynthesis and accumulation of β -carotene in *Dunaliella salina* proceed via the glyceraldehyde 3-

- phosphate/pyruvate pathway. *Nat. Prod. Res.* 23, 1021–1028. <https://doi.org/10.1080/14786410802689689>
- Celente, G. de S., Rizzetti, T.M., Sui, Y., Schneider, R. de C. de S., 2022. Potential use of microalga *Dunaliella salina* for bioproducts with industrial relevance. *Biomass Bioenergy* 167, 106647. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106647>
- Cepoi, L., Zinicovscaia, I., Rudi, L., Chiriac, T., Turchenko, V., 2022. Changes in the *Dunaliella salina* biomass composition during silver nanoparticles formation. *Nanotechnol. Environ. Eng.* 7, 235–243. <https://doi.org/10.1007/s41204-022-00218-4>
- Chavali, A.K., Rhee, S.Y., 2018. Bioinformatics tools for the identification of gene clusters that biosynthesize specialized metabolites. *Brief. Bioinform.* 19, 1022–1034. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx020>
- Chouhan, S., Guleria, S., 2020. Green synthesis of AgNPs using Cannabis sativa leaf extract: Characterization, antibacterial, anti-yeast and α -amylase inhibitory activity. *Mater. Sci. Energy Technol.* 3, 536–544. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.05.004>
- Chugh, D., Viswamalya, V.S., Das, B., 2021. Green synthesis of silver nanoparticles with algae and the importance of capping agents in the process. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 19, 126. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00228-w>
- Chumakov, D.S., Sokolov, A.O., Bogatyrev, V.A., Sokolov, O.I., Selivanov, N.Yu., Dykman, L.A., 2018. Green Synthesis of Gold Nanoparticles using Arabidopsis thaliana and *Dunaliella salina* Cell Cultures. *Nanotechnologies Russ.* 13, 539–545. <https://doi.org/10.1134/S1995078018050038>
- Dhoondia, Z.H., Chakraborty, H., 2012. Lactobacillus Mediated Synthesis of Silver Oxide Nanoparticles. *Nanomater. Nanotechnol.* 2, 15. <https://doi.org/10.5772/55741>
- Elzoheiry, A., Ayad, E., Omar, N., Elbakry, K., Hyder, A., 2022. Anti-liver fibrosis activity of curcumin/chitosan-coated green silver nanoparticles. *Sci. Rep.* 12, 18403. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23276-9>
- Fayyadh, A.A., Alzubaidy, M.H.J., 2021. Green-synthesis of Ag₂O nanoparticles for antimicrobial assays. *J. Mech. Behav. Mater.* 30, 228–236. <https://doi.org/10.1515/jmbm-2021-0024>
- Ghasemi, S., Harighi, B., Ashengroph, M., 2023. Biosynthesis of silver nanoparticles using Pseudomonas canadensis, and its antivirulence effects against Pseudomonas tolaasii, mushroom brown blotch agent. *Sci. Rep.* 13, 3668. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30863-x>
- Giri, A.K., Jena, B., Biswal, B., Pradhan, A.K., Arakha, M., Acharya, S., Acharya, L., 2022. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Eugenia roxburghii DC. extract and activity against biofilm-producing bacteria. *Sci. Rep.* 12, 8383. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12484-y>
- Gómez, P.I., González, M.A., 2005. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biol. Res.* 38. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602005000200005>
- Guevara, M., Pinto, R., Villarroel, J., Hernández, E., Díaz, R., Gotera, B., Cortez, R., 2016. INFLUENCE OF SALINITY AND IRRADIANCE ON GROWTH AND BIOCHEMICAL 28, 8.
- Hamouda, R.A., Hussein, M.H., Abo-elmagd, R.A., Bawazir, S.S., 2019. Synthesis and biological characterization of silver nanoparticles derived from the cyanobacterium

- Oscillatoria limnetica. Sci. Rep. 9, 13071. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49444-y>
- Hobson, D.W., 2011. Nanotechnology, in: Comprehensive Biotechnology. Elsevier, pp. 683–697. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00228-2>
- Hulla, J., Sahu, S., Hayes, A., 2015. Nanotechnology: History and future. Hum. Exp. Toxicol. 34, 1318–1321. <https://doi.org/10.1177/0960327115603588>
- Ijaz, I., Bukhari, A., Gilani, E., Nazir, A., Zain, H., Saeed, R., hussain, S., hussain, T., bukhari, A., naseer, yasra, aftab, R., 2022. Green synthesis of silver nanoparticles using different plants parts and biological organisms, characterization and antibacterial activity. Environ. Nanotechnol. Monit. Manag. 18, 100704. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100704>
- Iqbal, S., Fakhar-e-Alam, M., Akbar, F., Shafiq, M., Atif, M., Amin, N., Ismail, M., Hanif, A., Farooq, W.A., 2019. Application of silver oxide nanoparticles for the treatment of cancer. J. Mol. Struct. 1189, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.04.041>
- Islam, A., 2021. A critical review on silver nanoparticles: From synthesis and applications to its mitigation through low-cost adsorption by biochar. J. Environ. Manage. 17.
- Jini, D., Sharmila, S., Anitha, A., Pandian, M., Rajapaksha, R.M.H., 2022. In vitro and in silico studies of silver nanoparticles (AgNPs) from Allium sativum against diabetes. Sci. Rep. 12, 22109. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24818-x>
- Khan, Ibrahim, Saeed, K., Khan, Idrees, 2019. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arab. J. Chem. 12, 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Khan, S.A., 2020. Metal nanoparticles toxicity: role of physicochemical aspects, in: Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications. Elsevier, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816960-5.00001-X>
- Kumar, R., Kumar, M., Luthra, G., 2023. Fundamental approaches and applications of nanotechnology: A mini review. Mater. Today Proc. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.12.172>
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat. Methods 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lao, Y.-M., Xiao, L., Ye, Z., Jiang, J.-G., Zhou, S.-S., 2011. In silico analysis of phytoene synthase and its promoter reveals hints for regulation mechanisms of carotenogenesis in *Dunaliella bardawil*. Bioinformatics 27, 2201–2208. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr371>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinforma. Oxf. Engl. 25, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Lindsay, S., 2010. Introduction to Nanoscience. OUP Oxford.
- Lischer, H.E.L., Shimizu, K.K., 2017. Reference-guided de novo assembly approach improves genome reconstruction for related species. BMC Bioinformatics 18, 474. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1911-6>
- Lopez, H., Magdaleno, D., Stephano, J., 2017. The complete chloroplast genome of the green microalgae *Dunaliella salina* strain SQ. Mitochondrial DNA Part B 2, 225–226. <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1310610>

- Magdaleno, D., Lopez, H., Stephano Hornedo, J.L., 2017. The complete mitochondrial genome of the green microalgae *Dunaliella salina* strain SQ. Mitochondrial DNA Part B 2, 311–312. <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1331331>
- Mahdieh, M., Zolanvari, A., Azimee, A.S., Mahdieh, M., 2012. Green biosynthesis of silver nanoparticles by *Spirulina platensis*. Sci. Iran. 19, 926–929. <https://doi.org/10.1016/j.scient.2012.01.010>
- Mody, V.V., Siwale, R., Singh, A., Mody, H.R., 2010. Introduction to metallic nanoparticles. J. Pharm. Bioallied Sci. 2, 282–289. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.72127>
- Mohseniazar, M., Barin, M., Zarredar, H., Alizadeh, S., Shanehbandi, D., 2011. Potential of microalgae and lactobacilli in biosynthesis of silver nanoparticles. BioImpacts BI 1, 149–152. <https://doi.org/10.5681/bi.2011.020>
- National Institute for Occupational Safety and Health, 2020. Nanotechnology [WWW Document]. Cent. Dis. Control Prev. URL <https://www.cdc.gov/niosh/topics/nanotech/default.html> (accessed 9.26.22).
- Ong, W.T.J., Nyam, K.L., 2022. Evaluation of silver nanoparticles in cosmeceutical and potential biosafety complications. Saudi J. Biol. Sci. 29, 2085–2094. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.035>
- Paniagua-Michel, J., Capa-Robles, W., Olmos-Soto, J., Gutierrez-Millan, L.E., 2009. The Carotenogenesis Pathway via the Isoprenoid- β -carotene Interference Approach in a New Strain of *Dunaliella salina* Isolated from Baja California Mexico. Mar. Drugs 7, 45–56. <https://doi.org/10.3390/md7010045>
- Piñón-Segundo, E., Mendoza-Muñoz, N., Quintanar-Guerrero, D., 2013. Nanoparticles as Dental Drug-Delivery Systems, in: Nanobiomaterials in Clinical Dentistry. Elsevier, pp. 475–495. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3127-5.00023-4>
- Polle, J.E.W., Calhoun, S., McKie-Krisberg, Z., Prochnik, S., Neofotis, P., Yim, W.C., Hathwaik, L.T., Jenkins, J., Molina, H., Bunkenborg, J., Grigoriev, I.V., Barry, K., Schmutz, J., Jin, E., Cushman, J.C., Magnusson, J.K., 2020a. Genomic adaptations of the green alga *Dunaliella salina* to life under high salinity. Algal Res. 50, 101990. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101990>
- Polle, J.E.W., Jin, E., Ben-Amotz, A., 2020b. The alga *Dunaliella* revisited: Looking back and moving forward with model and production organisms. Algal Res. 49, 101948. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101948>
- Pryshchepa, O., Pomastowski, P., Buszewski, B., 2020. Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. Adv. Colloid Interface Sci. 284, 102246. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102246>
- Raj, S., Singh, H., Trivedi, R., Soni, V., 2020. Biogenic synthesis of AgNPs employing Terminalia arjuna leaf extract and its efficacy towards catalytic degradation of organic dyes. Sci. Rep. 10, 9616. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66851-8>
- Ravichandran, S., Paluri, V., Kumar, G., Loganathan, K., Kokati Venkata, B.R., 2016. A novel approach for the biosynthesis of silver oxide nanoparticles using aqueous leaf extract of *Callistemon lanceolatus* (Myrtaceae) and their therapeutic potential. J. Exp. Nanosci. 11, 445–458. <https://doi.org/10.1080/17458080.2015.1077534>
- Sajid, M., 2022. Nanomaterials: types, properties, recent advances, and toxicity concerns. Curr. Opin. Environ. Sci. Health 25, 100319. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2021.100319>

- Saleh, T.A., 2020. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environ. Technol. Innov.* 20, 101067. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101067>
- Sandmann, G., 2002. Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. *Physiol. Plant.* 116, 431–440. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1160401.x>
- Satish Arvind Ahire, Ashwini Ashok Bachhav, Thansing Bhavsing Pawar, Bapu Sonu Jagdale, Arun Vitthal Patil, Prashant Bhimaro Koli, 2022. The Augmentation of nanotechnology era: A concise review on fundamental concepts of nanotechnology and applications in material science and technology | Elsevier Enhanced Reader. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100633>
- Schrand, A.M., Rahman, M.F., Hussain, S.M., Schlager, J.J., Smith, D.A., Syed, A.F., 2010. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2, 544–568. <https://doi.org/10.1002/wnan.103>
- Shume, W.M., Murthy, H.C.A., Zereffa, E.A., 2020. A Review on Synthesis and Characterization of Ag₂O Nanoparticles for Photocatalytic Applications. *J. Chem.* 2020, e5039479. <https://doi.org/10.1155/2020/5039479>
- Singh, A.K., Tiwari, R., Kumar, V., Singh, P., Riyazat Khadim, S.K., Tiwari, A., Srivastava, V., Hasan, S.H., Asthana, R.K., 2017. Photo-induced biosynthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of *Dunaliella salina* and their anticancer potential. *J. Photochem. Photobiol. B* 166, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.11.020>
- Singh, H., Du, J., Yi, T.-H., 2017. *Kinneretia* THG-SQI4 mediated biosynthesis of silver nanoparticles and its antimicrobial efficacy. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 45, 602–608. <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1163718>
- Siqueiros Vargas Fabián, 2017. Caracterización de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la bioacumulación de β – caroteno en *Dunaliella salina* y *Dunaliella bardawil*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California, México.
- Sohail, M.I., Waris, A.A., Ayub, M.A., Usman, M., Zia ur Rehman, M., Sabir, M., Faiz, T., 2019. Environmental application of nanomaterials: A promise to sustainable future, in: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, pp. 1–54. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.10.002>
- Srikhao, N., Ounkaew, A., Kasemsiri, P., Theerakulpisut, S., Okhawilai, M., Hiziroglu, S., 2022. Green synthesis of silver nanoparticles using the extract of spent coffee used for paper-based hydrogen peroxide sensing device. *Sci. Rep.* 12, 20099. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22067-6>
- Sulaiman, G.M., Mohammed, W.H., Marzoog, T.R., Al-Amiery, A.A.A., Kadhum, A.A.H., Mohamad, A.B., 2013. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3, 58–63. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60024-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60024-6)
- Sultan, A.E., 2023. Synthesis of Silver Oxide Nanoparticles using Different Precursor and Study Cytotoxicity Against MCF-7 Breast Cancer Cell line.
- Suresh, S., 2016. Synthesis, structural, surface morphology, optical and electrical properties of silver oxide nanoparticles 9, 37–49.
- Tran, D., Haven, J., Qiu, W.-G., Polle, J.E.W., 2009. An update on carotenoid biosynthesis in algae: phylogenetic evidence for the existence of two classes of phytoene synthase. *Planta* 229, 723–729. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0866-2>

- US EPA, O., 2013. Basics of Green Chemistry [WWW Document]. URL <https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry> (accessed 3.5.23).
- Vishwanath, R., Negi, B., 2021. Conventional and green methods of synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties. *Curr. Res. Green Sustain. Chem.* 4, 100205. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100205>
- Wang, D., Xue, B., Wang, L., Zhang, Y., Liu, L., Zhou, Y., 2021. Fungus-mediated green synthesis of nano-silver using *Aspergillus sydowii* and its antifungal/antiproliferative activities. *Sci. Rep.* 11, 10356. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89854-5>
- Wang, Z., Hu, T., Liang, R., Wei, M., 2020. Application of Zero-Dimensional Nanomaterials in Biosensing. *Front. Chem.* 8, 320. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00320>
- Yan, Y., Zhu, Y.-H., Jiang, J.-G., Song, D.-L., 2005. Cloning and Sequence Analysis of the Phytoene Synthase Gene from a Unicellular Chlorophyte, *Dunaliella salina*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1466–1469. <https://doi.org/10.1021/jf048358s>
- Yang, J., Guo, L., 2014. Biosynthesis of β -carotene in engineered *E. coli* using the MEP and MVA pathways. *Microb. Cell Factories* 13, 160. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0160-x>
- Ye, Z.-W., Jiang, J.-G., Wu, G.-H., 2008. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnol. Adv.* 26, 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.004>
- Yu, B., 2008. In silico gene discovery. *Methods Mol. Med.* 141, 1–22. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-148-6_1
- Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., Gurunathan, S., 2016. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>
- Zhu, Y.-H., Jiang, J.-G., Chen, Q., 2008. Characterization of cDNA of lycopene β -cyclase responsible for a high level of β -carotene accumulation in *Dunaliella salina*. *Biochem. Cell Biol.* 86, 285–292. <https://doi.org/10.1139/O08-012>