

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA ARQUITECTURA Y DISEÑO
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



Síntesis y caracterización de nanopartículas de Pd por química verde
utilizando el extracto de la microalga *Dunaliella salina* SQ

T E S I S

que presenta para obtener el grado de MAESTRO EN INGENIERÍA:

ING. RENEE FERNANDA ESPINOZA GUTIÉRREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. DANTE ALBERTO MAGDALENO MONCAYO

CODIRECTOR DE TESIS:

DRA. HAYDEE LOPEZ RODRÍGUEZ

ENSENADA, BC. DICIEMBRE 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA ARQUITECTURA Y DISEÑO
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA


Síntesis y caracterización de nanopartículas de Pd por química verde utilizando el extracto de la microalga *Dunaliella salina* SQ

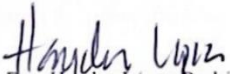
T E S I S

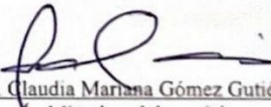
que presenta para obtener el grado de MAESTRO EN INGENIERÍA:


ING. RENEE FERNANDA ESPINOZA GUTIÉRREZ


Aprobado por:


Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo
Director de tesis


Dra. Haydee López Rodríguez
Codirector de tesis


Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez
Miembro del comité


Dr. Guillermo Amaya Parra
Miembro del comité


Dr. Oscar González Davis
Miembro del comité

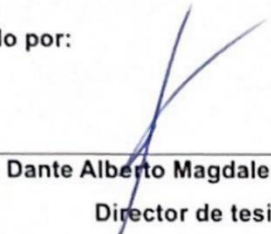
Ensenada Baja California, México. Diciembre 2024.

Resumen

Resumen de la tesis de Renee Fernanda Espinoza Gutiérrez, presentada como requisito para la obtención del grado MAESTRO EN INGENIERÍA, Ensenada B.C. a diciembre de 2024.

Síntesis y caracterización de nanopartículas de Pd por química verde utilizando el extracto de la microalga Dunaliella salina SQ

Aprobado por:



Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo
Director de tesis



Dra. Haydee López Rodríguez
Codirector de tesis

Resumen:

En este trabajo, se utilizó el extracto de la microalga verde *Dunaliella salina* SQ rico en biocompuestos como pigmentos que funcionan como agentes reductores y estabilizantes para la síntesis verde de nanopartículas de paladio. Se realizaron experimentos variando la concentración del extracto de *D. salina* SQ al 5 %, 10 % y 20 %, y se utilizaron las temperaturas de reacción de 22 °C, 60 °C, 80 °C y 90 °C con el objetivo de determinar las condiciones óptimas para la síntesis y la influencia de estas variables sobre las características de las nanopartículas. Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas mediante técnicas como UV-Vis, FTIR, TEM y DLS. Los espectros UV-Vis confirmaron la reducción de los iones de paladio y su conversión en nanopartículas, mientras que las imágenes de TEM revelaron una morfología esférica y tamaños promedio de 5.27 nm, 2.76 nm y 5.67 nm para las nanopartículas sintetizadas a 60 °C, 70 °C y 80 °C respectivamente. Los análisis de DLS mostraron que las nanopartículas obtenidas a mayor temperatura presentaban una mayor estabilidad, y los espectros de FTIR indicaron la presencia de grupos funcionales, como amidas e hidroxilos, atribuidos al extracto de la microalga. Por otro lado, se llevaron a cabo ensambles por referencia a nivel de ADN y ARNm de los datos genómicos de *D. Salina* SQ, con el objetivo de realizar una búsqueda *in silico* de las enzimas involucradas en la síntesis de betacaroteno pigmento que se especula pudiera estar involucrado en la síntesis de nanopartículas de paladio; las enzimas investigadas fueron geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPS), Fitoeno sintasa (PSY) y Licopeno betaciclase (CrtL-b). Los resultados mostraron ensambles por referencia únicamente a nivel de ARNm, utilizando como referencia las cepas de *D. Salina* YC y GYH13 y la especie de *Dunaliella* Bardawil. Los análisis bioinformáticos permiten obtener información de los organismos para futuras aplicaciones biotecnológicas.

Palabras clave: síntesis verde; nanopartículas de paladio; betacaroteno; geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPS); fitoeno sintasa (PSY); licopeno betaciclase (CrtL-B).

Dedicatoria

*A mis padres y
hermano ...*

Agradecimientos

A mi director y codirectora de tesis, el Dr. Dante y la Dra. Haydee, que me acompañaron y guiaron durante todo el proceso de maestría, proporcionándome lo necesario para desarrollar este proyecto.

A mis sinodales que ayudaron con las revisiones, firmas y a mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT), por proporcionar recursos durante mis estudios de maestría.

A la UABC, por albergarme en estos dos años y medio, y brindar los recursos para completar mi formación.

A mi hermano Alfredo, por ayudarme cuando necesitaba segundas opiniones.

A mis padres, por todo el apoyo, acompañamiento y visitas a Ensenada cuando se podía.

A mis amigos, compañeros de laboratorio y cubículo, que hicieron muy llevaderas las horas de estudio.

Contenido

Resumen	ii
<i>Dedicatoria</i>	iii
<i>Agradecimientos</i>	iv
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	viii
I. Introducción	1
II. Antecedentes.....	16
II.1. Síntesis verde de nanopartículas de paladio	16
II.2. Aplicaciones de las nanopartículas de paladio	18
II.3. Análisis bioinformáticos de genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de betacaroteno	21
II.3.1. Geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS)	21
II.3.2. Pirofosfato sintasa (PSY).....	22
II.3.3. Licopeno betaciclasa (LYCB).....	23
III. Justificación	26
IV. Hipótesis.....	27
V. Objetivos.....	27
V.1. Objetivo general:	27
V.2. Objetivos específicos:	27
VI. Métodos y materiales.....	28
VI.1. Parte I: síntesis verde de nanopartículas	29
VI.1.1. Cultivo de <i>Dunaliella salina</i> SQ:	29
VI.1.2. Preparación del extracto:.....	30
VI.1.3. Síntesis de nanopartículas de paladio:.....	30

VI.1.4.	Caracterización de las nanopartículas de paladio	31
VI.2.	Parte II: análisis bioinformático	33
VI.2.1.	Preprocesamiento de datos genómicos de <i>D. salina</i> SQ	33
VI.2.2.	Ensamble por referencia con Bowtie2	33
VI.2.3.	Visualización del ensamble	34
VII.	Resultados y discusión	37
VII.1.	Uv-Vis	37
VII.2.	FTIR.....	41
VII.3.	TEM.....	44
VII.4.	Análisis bioinformático	49
VII.4.1.	Preprocesamiento de datos genómicos de <i>D. salina</i> SQ	49
VII.4.2.	Ensamble por referencia con Bowtie2	51
VIII.	Conclusiones	61
IX.	Bibliografía.....	62

Índice de tablas

Tabla 1.	Receta medio Jonhson modificado utilizado en el cultivo de <i>D. salina</i> SQ.....	29
Tabla 2.	Condiciones experimentales.	32
Tabla 3.	Equipos utilizados en la caracterización de las nanopartículas	33
Tabla 4.	Organismos, número de identificación de las secuencias y resultados del ensamble por referencia del gen que codifica para la enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS).....	35
Tabla 5.	Organismos, número de identificación de las secuencias y resultados del ensamble por referencia del gen que codifica para la enzima fitoeno sintasa (PSY).....	36
Tabla 6.	Organismos, número de identificación de las secuencias y resultados del ensamble por referencia del gen que codifica para la enzima licopeno betaciclase (CrtL-b).....	36
Tabla 7.	Tamaño medio de partículas, potencial Z e índice de polidispersión.....	48
Tabla 8.	Cambio de base, codón y aminoácido en la secuencia de la enzima PSY tomando como referencia secuencias del organismo <i>D. salina</i> GYH13.	52
Tabla 9.	Cambio de base, codón y aminoácido en la secuencia de la enzima GGPPS tomando como referencia secuencias del organismo <i>D. salina</i> YC.	53
Tabla 10.	Cambio de base, codón y aminoácido en la secuencia de la enzima CRTLB, GGPPS y PSY tomando como referencia secuencias del organismo <i>D. bardawil</i>	54
Tabla 11.	Comparación de la secuencia consenso y la secuencia de referencia de la enzima Geranilgeranil pirofosfato sintasa	57
Tabla 12.	Comparación de la secuencia consenso y la secuencia de referencia de la enzima Fitoeno sintasa	57
Tabla 13.	Comparación de la secuencia consenso y la secuencia de referencia de la enzima licopeno betaciclase	57

Índice de figuras

Figura 1.	Esquema del enfoque top-down y bottom-up de la síntesis de nanopartículas. Modificado de Shyam et al., 2020.	3
Figura 2.	Esquema de la formación de nanopartículas por reducción de iones metálicos. Modificada de Habibullah et al., 2021.	5
Figura 3.	Molécula de betacaroteno. Modificado de https://shre.ink/DsvW	9
Figura 4.	Esquematación de la ruta del betacaroteno del género <i>Dunaliella</i> . Basado en lo reportado por Félix-Castro et al., 2023.....	10
Figura 5.	Línea del tiempo de las plataformas de secuenciación de primera generación (Sanger, Pirosecuenciación) y NGS (Illumina, Ion Torrent, PacBio, Nanopore). Basado en lo reportado en Satam et al., 2023.....	12
Figura 6.	Metodología de secuenciación de ADN de la plataforma Illumina. Imagen adaptada de “Next Generation Sequencing (Illumina)” por BioRender.com, 2024.....	14
Figura 7.	Metodología general del análisis bioinformático y la síntesis de nanopartículas de paladio.	28
Figura 8.	Procedimiento de la preparación del extracto	31
Figura 9.	Procedimiento de la síntesis de nanopartículas de paladio	32
Figura 10.	Visualización del resultado del ensamble por referencia del gen que codifica para la enzima GGPPS, utilizando como referencia la secuencia de <i>Dunaliella bardawil</i>	35
Figura 11.	Espectros de absorbancia de las diferentes condiciones de síntesis de nanopartículas de paladio: a) concentración de extracto, b) temperatura, d) tiempo de reacción.	40
Figura 12.	Espectro de FTIR del extracto de <i>D. salina</i> SQ y las nanopartículas de paladio sintetizadas a 22 (TA), 60, 80 y 90 °C.....	43
Figura 13.	Imagen TEM de las nanopartículas de paladio sintetizadas a 60 °C.....	45
Figura 14.	Imagen TEM de las nanopartículas de paladio sintetizadas a 80 °C.....	46
Figura 15.	Imagen TEM de las nanopartículas de paladio sintetizadas a 90 °C.....	47
Figura 16.	Distribución de tamaños de las nanopartículas de paladio sintetizadas a 60 °C, 80 °C y 90 °C.....	48
Figura 17.	Información de las secuencias obtenidas por FASTQC.....	49
Figura 18.	Gráfico de calidad de las bases (QS) de las lecturas forward.	50
Figura 19.	Gráfico de calidad de las bases (QS) de las lecturas reverse.	50

Figura 20.	Visualización del alineamiento de la secuencia que codifica para la enzima GGPPS utilizando como referencia la secuencia de <i>D. salina</i> YC.	58
Figura 21.	Visualización del alineamiento de la secuencia que codifica para la enzima GGPPS utilizando como referencia la secuencia de <i>D. bardawil</i>	58
Figura 22.	Visualización del alineamiento de la secuencia que codifica para la enzima PSY utilizando como referencia la secuencia de <i>D. salina</i> GYH13.	59
Figura 23.	Visualización del alineamiento de la secuencia que codifica para la enzima PSY utilizando como referencia la secuencia de <i>D. bardawil</i>	59
Figura 24.	Visualización del alineamiento de la secuencia que codifica para la enzima CRTLB utilizando como referencia la secuencia de <i>D. bardawil</i>	60

I. Introducción

Las nanopartículas metálicas son materiales que sus dimensiones se encuentran en la escala de 1 a 100 nm. Al tener sus dimensiones confinadas en el rango de los nanómetros, los materiales exhiben propiedades fisicoquímicas diferentes a las que muestra el material a granel. Estas variaciones son causadas por el aumento del área y energía superficial con respecto a su volumen, reflejándose en mejoras en su reactividad química, propiedades ópticas, mecánicas y conductividad eléctrica y térmica (Jamkhande et al., 2019).

Estas mejoras en las propiedades permiten que las nanopartículas sean estudiadas para la aplicación en una gran variedad de sectores industriales, como el automotriz, aeroespacial, energético, ambiental, farmacéutico (Li et al., 2021). Algunos ejemplos son la utilización de nanopartículas metálicas en los empaques de comida debido a sus características antibacterianas (Adeyemi & Fawole, 2023) o su implementación en fertilizantes para la entrega dirigida y administración de nutrientes, lograda por sus efectos de reactividad y adherencia de superficie (Ndaba et al., 2022).

Las nanopartículas de paladio se distinguen particularmente por sus aplicaciones en el campo de catálisis de reacciones de descomposición de sustancias contaminantes y en la producción de compuestos de valor, como obtención de hidrógeno o compuestos orgánicos de interés. En especial, participan activamente en reacciones de reducción de compuestos químicos como el 4-nitrofenol y el cristal violeta (Tanreh et al., 2018). Además, han demostrado su eficacia en la transformación del cromo VI en cromo III, una forma menos tóxica y móvil de cromo, enfrentando el riesgo ambiental asociado con este metal (Matsena & Chirwa, 2021a). También se ha estudiado su actividad catalítica en la reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura (Chatterjee & Bhattacharya, 2018; Tanreh et al., 2018).

Las nanopartículas de paladio también han sido objeto de investigación en aplicaciones biológicas, centrándose en su actividad antibacteriana (Salman et al., 2023; Sharmila, Farzana Fathima, et al., 2017; Sharmila, Haries, et al., 2017; Ullah et al., 2018; Vellaisamy et al., 2023). Este amplio espectro de aplicaciones destaca la versatilidad y relevancia de las nanopartículas de paladio en diversos campos científicos e industriales.

Por otra parte, el paladio se obtiene por extracción minera o por su reciclaje de catalizadores, joyería y desperdicio electrónico. La extracción minera es la principal fuente de paladio y se ha mantenido constante durante los últimos diez años, produciendo alrededor de 200 a 225 toneladas al año (Joudeh et al., 2022). El consumo de paladio a granel ha aumentado debido a su implementación como catalizador en la industria automotriz, siendo esta su principal consumidor. El aumento de su demanda no es proporcional con respecto a los recursos disponibles, provocando el incremento del precio. Esta situación crea la necesidad de encontrar alternativas que garanticen el aprovechamiento del paladio para mejorar la relación entre su costo y efectividad de aplicación (Joudeh et al., 2022). Se piensa que la implementación de la nanotecnología puede ayudar en optimizar los recursos del paladio, utilizando menos cantidad de material sin perder o incluso mejorar sus propiedades.

Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas están estrechamente vinculadas a su forma, tamaño y la química de su superficie, características que son determinadas por el método de síntesis empleado (Moraes et al., 2021). El método de síntesis ejerce una influencia directa en las características del nanomaterial resultante, vinculándose con la estabilidad y reactividad de la nanopartícula (Vishnukumar et al., 2017).

Existen dos enfoques para la síntesis de nanomateriales, clasificados según el estado inicial del material. En el enfoque top-down, se parte del material en su estado macro y se reduce gradualmente su tamaño. Por otro lado, el enfoque

bottom-up parte de átomos o moléculas para construir el nanomaterial (figura 1) (Jamkhande et al., 2019).

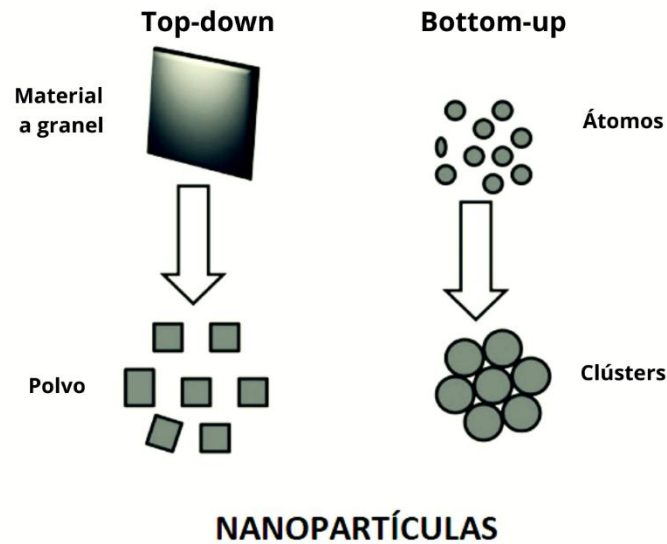


Figura 1. Esquema del enfoque top-down y bottom-up de la síntesis de nanopartículas. Modificado de Shyam et al., 2020.

Estos enfoques son aplicados en los métodos de síntesis de nanopartículas y comúnmente se clasifican según el mecanismo o los componentes utilizados en la formación del material, resultando en las agrupaciones de métodos físicos, químicos y biológicos (Jamkhande et al., 2019). En el estudio de Borja-Borja y Rojas-Oviedo (2020), se mencionan que los métodos mayormente utilizados en la producción de nanopartículas metálicas son los físicos y químicos.

Los métodos de síntesis físicos comúnmente utilizados para producir nanopartículas de paladio son la deposición física de vapor (PVD por sus siglas en inglés) y ablación láser (Vishnukumar et al., 2017).

En el método de PVD se destacan cuatro pasos principales: la evaporación del material a depositar o del precursor mediante una fuente de alta energía como un

haz de electrones, el transporte de vapor al sustrato, la reacción entre los átomos del sustrato y el gas reactivo, y finalmente, la deposición del recubrimiento sobre la superficie del sustrato (Escorcia-Díaz et al., 2023). Uno de los parámetros principales a considerar en este método de síntesis es el efecto del sustrato en las características de las nanopartículas obtenidas.

En estudios como el de Safavi et al., (2012) , se comparó el efecto que tienen los sustratos de carbono dopados con azufre en la síntesis de nanopartículas de paladio por PVD. En el experimento, los autores mantuvieron las condiciones de síntesis y variaron el sustrato utilizado; los resultados indicaron que la variación del sustrato impactaba en el tamaño de la nanopartícula de paladio, reportando los tamaños de 10 nm cuando se utilizaron nanotubos de 1 pared, 40 nm con el sustrato de nanotubos de multipared, 100 nm para el sustrato de nanofibras de carbono y 250 nm para sustrato de carbono. De igual forma, en la investigación de Sobczak et al., (2017) también les interesaba conocer la posible influencia del sustrato sobre el tamaño medio de las nanopartículas de paladio. Se evaluaron los sustratos Al_2O_3 , SiO_2 , Si y Mo, y se encontró que los sustratos no tenían influencia sobre el tamaño medio de las nanopartículas de paladio.

Por otro lado, el método de síntesis de ablación láser consiste en sublimar una placa de metal (en este caso de paladio), para obtener nanopartículas de paladio (Habibullah et al., 2021). Los parámetros del láser, como la intensidad de irradiación, y su longitud de onda influyen sobre las propiedades de las nanopartículas sintetizadas. Salman et al. (2023) sintetizaron nanopartículas de paladio con ablación láser, probando tres distintas intensidades de energía del láser, obtuvieron nanopartículas de forma esférica y distribuciones de tamaño diferentes atribuidas a la variación de intensidad de energía. Por otra parte, en la investigación de Fernández-Arias et al. (2022) se experimentó con longitudes de onda de la radiación proveniente del láser, eligiendo 532 y 1064 nm. En este estudio los autores notaron que hay un comportamiento de tamaños más homogéneos cuando se utiliza la

longitud de onda de 532 nm, reportando tamaños con diámetro medios inferiores a los 6 nm.

Las desventajas de los métodos físicos en la síntesis de nanopartículas incluyen la utilización de equipo costoso y altos requerimientos de energía, especialmente por la necesidad de alcanzar condiciones de vacío y altas temperaturas. En contraste, en los últimos veinte años, los métodos químicos han ganado considerable interés debido a su rapidez y la ausencia de requerimientos de equipos costosos (Khan, Shahid, et al., 2022). Este enfoque ha permitido la síntesis de una amplia variedad de nanopartículas, abarcando desde metales nobles hasta óxidos metálicos.

La síntesis de nanopartículas de paladio mediante métodos químicos abarca varias técnicas, entre las que se destacan el método de reducción alcohólica, la reducción química, métodos sonoquímicos y el proceso de poliol (Nasrollahzadeh et al., 2020). En términos generales, la síntesis química de nanopartículas metálicas de paladio implica la reducción de los iones metálicos a un estado metálico cerovalente. En este estado, se inicia la nucleación para formar la nanopartícula (Vishnukumar et al., 2017) (figura 2). Comúnmente, se utiliza como precursor el complejo de potasio tetracloropalladato (II) (K_2PdCl_4) y sales metálicas de paladio, tales como el cloruro de paladio ($PdCl_2$), nitrato de paladio ($Pd(NO_3)_2$) y acetato de paladio ($Pd(CH_3COO)_2$) (Szczyglewska et al., 2023).

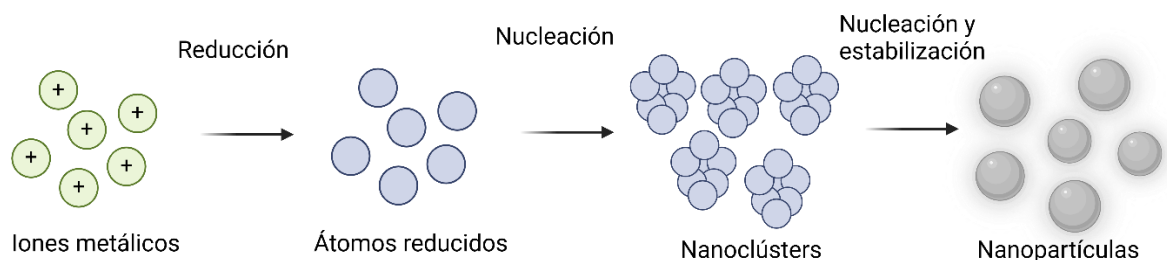


Figura 2. Esquema de la formación de nanopartículas por reducción de iones metálicos. Modificada de Habibullah et al., 2021.

Los métodos de reducción química para la síntesis de nanopartículas de paladio involucran la reducción de sales metálicas, empleando agentes reductores fuertes como el borohidruro de sodio (NaBH_4) y el borohidruro de potasio (KBH_4) (Nasrollahzadeh et al., 2020). En un estudio realizado por Bravo et al. (2020), se informa sobre la síntesis de nanopartículas de paladio utilizando NaBH_4 como agente reductor y PdCl_2 como agente precursor. La reacción se lleva a cabo en presencia de ligandos orgánicos y los resultados destacan la relevancia de estos ligandos en la estabilidad de las nanopartículas. Por otro lado, Zheng et al. (2014) detallan la síntesis de nano cadenas de paladio compuestas por subunidades de nanopartículas de paladio, utilizando KBH_4 como agente reductor. Utilizó hidrato de hidracina y ácido ascórbico como agentes reductores alternativos para realizar una comparación con la síntesis realizada con NaBH_4 . El resultado fue la formación de agregados de nanopartículas en cúmulos en lugar de las cadenas deseadas. Este efecto se atribuye al papel del agente reductor en la velocidad de reacción y destaca la importancia de la elección del agente reductor en la síntesis de nanoestructuras específicas.

La mayoría de los métodos físicos y químicos descritos anteriormente requieren condiciones poco amigables con el medio ambiente, como altas temperaturas y el uso de reactivos contaminantes, resultando en procesos costosos y generando subproductos indeseables (Chan et al., 2022). En respuesta a estos desafíos, se han implementado métodos de síntesis que buscan reducir el consumo energético, disminuir costos y emplear compuestos naturales, todo con el objetivo de minimizar el impacto ambiental (Ying et al., 2022). Estos enfoques más sostenibles de producción de nanopartículas, conocidos como métodos de síntesis verde, buscan aprovechar compuestos naturales y reducir el impacto ambiental asociado con la síntesis de nanomateriales.

La síntesis verde se considera una variación del método de reducción química ya que el mecanismo es el mismo, simplemente difieren en los reactivos utilizados. Se

eliminan reactivos con potencial a ser sustancias tóxicas y dañinas como la hidracina, hidroxilamina, citrato de sodio, borohidruro de sodio, poli-N-vinilpirrolidona (Nasrollahzadeh et al., 2020) y se sustituyen por una fuente biológica (Zhou et al., 2023).

La elección del componente biológico es importante, ya que además de reducir la sal metálica, recubren y estabilizan a la nanopartícula. Se han sintetizado nanopartículas metálicas con la participación de diversos organismos, entre ellos bacterias, levaduras, plantas, algas y hongos. Las microalgas, en particular, se consideran organismos ideales para la síntesis verde debido a su fácil manipulación y mantenimiento de cultivo, rápido crecimiento y la presencia abundante de biomasa, fitoquímicos, proteínas y pigmentos (Jacob et al., 2021; Khan, Shariq, et al., 2022; Marslin et al., 2018).

Dunaliella salina es una microalga verde unicelular que destaca entre el grupo de las microalgas. Se encuentra distribuida globalmente en aguas salinas e hipersalinas y es de gran interés científico y comercial debido a su alta tolerancia a condiciones extremas de salinidad, luz, pH y temperatura, así como por su capacidad para producir valiosos biocompuestos como carotenos, lípidos y glicerol (Preetha et al., 2012). Adicionalmente, su clasificación como GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) y características fisiológicas, como la ausencia de pared celular, facilitan la extracción de productos de interés y la manipulación genética, favoreciendo su uso tanto en laboratorios como en la industrial para la producción de betacaroteno, debido a su gran capacidad de almacenamiento de este compuesto (Polle et al., 2020). Estas propiedades la convierten en un excelente candidato para la síntesis de nanopartículas, habiéndose ya demostrado su capacidad para sintetizar nanopartículas de plata y oro (Cepoi et al., 2022; Hyrslova et al., 2022; S et al., 2023; Singh et al., 2019).

La biosíntesis de nanopartículas puede realizarse con una amplia gama de compuestos presentes en los organismos marinos, incluyendo grupos carbonilo,

terpenoides, fenoles, flavonas, polisacáridos, proteínas, pigmentos, aminas, amidas, alcaloides y otros agentes reductores presentes en extractos biológicos (Momeni & Nabipour, 2015). Estudios recientes, como el de Cepoi et al., (2022) observaron cambios en la biomasa de *D. salina* durante la síntesis de nanopartículas de plata, señalando una disminución en el contenido de lípidos, proteínas y betacaroteno, atribuyéndolo a la formación de las nanopartículas. Se ha reportado también que compuestos antioxidantes como la quercetina, ácido gálico, vitamina C y betacaroteno no solo reducen efectivamente los iones metálicos, sino que también produce nanopartículas estables con morfología triangular (Alzharani et al., 2021).

En este estudio, se ha utilizado el extracto de la cepa *Dunaliella salina* SQ, aislada de una laguna hipersalina de San Quintín, Baja California, México (Magdaleno et al., 2017), con el objetivo de sintetizar nanopartículas de paladio. Esta elección se fundamenta en la capacidad de la microalga para producir pigmentos que se utilizan en la reducción del precursor y contribuyen a la estabilización de nanopartículas durante el proceso de síntesis. Entre los pigmentos producidos por esta cepa de *D. salina* destacan la clorofila a y b, así como carotenoides como la neoxantina, violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, luteína y betacaroteno (Valencia-Yañez et al., 2018).

Además de su relevancia en la síntesis de nanopartículas, *D. salina* es estudiada por su capacidad para producir compuestos valiosos, como el betacaroteno, en particular, los estudios se enfocan en la ruta del betacaroteno dado a su gran interés comercial y sus implicaciones para la salud. Investigar y optimizar la ruta del betacaroteno en *D. salina* puede llevar a mejoras en la producción de este importante compuesto (Polle et al., 2017; Shaker et al., 2021; Siqueiros, 2017). Con la ayuda de estudios bioinformáticos, se pueden identificar y caracterizar genes específicos de las vías metabólicas en *D. salina* que están involucrados en la producción de metabolitos secundarios, como los carotenoides y otros pigmentos (Ambroggi et al., 2014; Zhang & Liu, 2013).

Los carotenoides pertenecen al grupo de pigmentos más diversos. Son pigmentos liposolubles que están ubicados en el cloroplasto, considerados accesorios, son componentes estructurales del fotosistema, donde su función es proteger a los aparatos fotosintéticos del daño oxidativo (Félix-Castro et al., 2023). Entre los carotenoides, el betacaroteno es un hidrocarburo de color anaranjado con una cadena de ocho unidades de isoprenos ($C_{40}H_{56}$), con un centro de simetría y un anillo de betaciclohexeno en cada terminación (figura 3). El betacaroteno tiene un potente efecto antioxidante, beneficiando la salud humana, por lo que es de interés en la industria farmacéutica para el desarrollo de nutraceúticos y vitaminas (Félix-Castro et al., 2023).

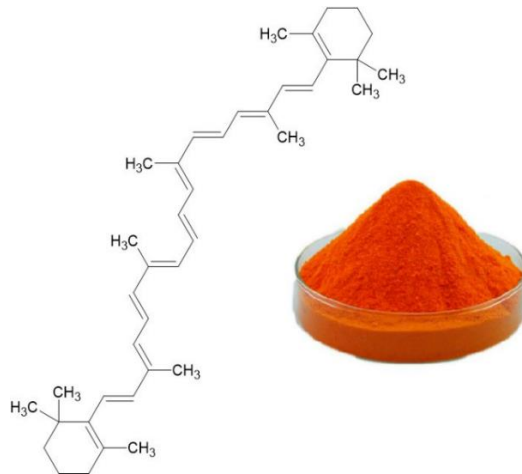


Figura 3. Molécula de betacaroteno. Modificado de <https://shre.ink/DsvW>

La ruta metabólica del betacaroteno en el género de microalgas verdes *Dunaliella* es una serie de reacciones sucesivas que comienza con el precursor geranilgeranil pirofosfato (GGPP). Este compuesto es el resultado de la síntesis de isoprenoides y es catalizado por la enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS), representando el primer factor limitante en la síntesis de carotenos. La ruta comienza con la condensación de dos moléculas de GGPP para formar fitoeno, un proceso catalizado por la enzima fitoeno sintasa (PSY), que constituye el primer paso limitante de la ruta. Posteriormente, el fitoeno se transforma a través de cuatro

reacciones secuenciales de desaturación e isomerización, llevadas a cabo por enzimas fitoeno desaturasa (PDS), 15-cis-zeta-caroteno isomerasa (ZISO), zeta-caroteno desaturasa (ZDS) y la carotenoide isomerasa (CRTISO). Estas enzimas producen los intermediarios fitoflueno, gamma caroteno y neurosporeno, que finalmente conducen a la formación de licopeno. El último paso en la formación de betacaroteno es la ciclización del licopeno, catalizada por la enzima licopeno betaciclasa (LYCB) (figura 4) (Félix-Castro et al., 2023).

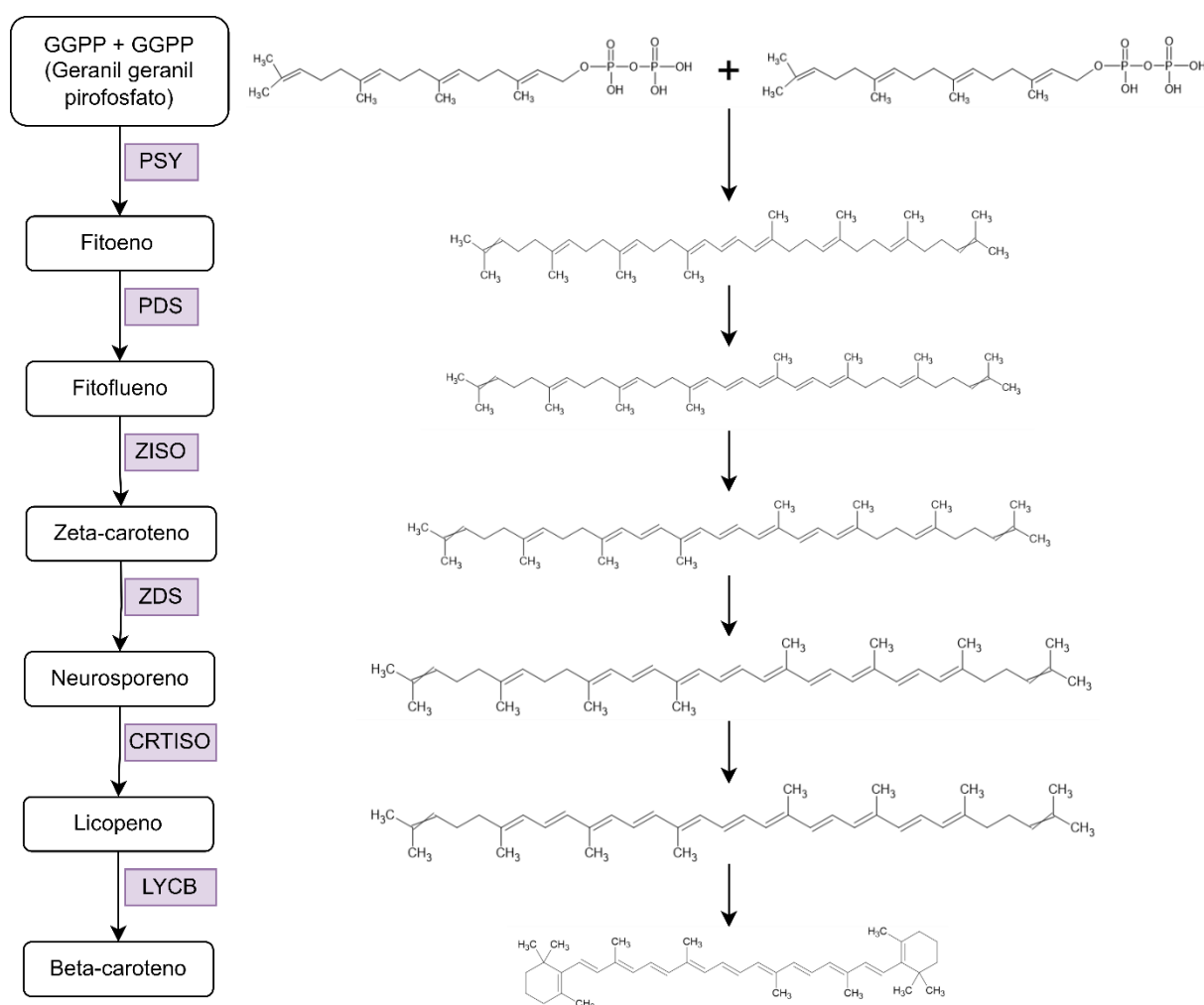


Figura 4. Esquemización de la ruta del betacaroteno del género *Dunaliella*. Basado en lo reportado por Félix-Castro et al., 2023.

La participación enzimática en la ruta de biosíntesis del betacaroteno es fundamental. La enzima GGPPS regula la velocidad de reacción de la condensación de tres moléculas de isopentil pirofosfato (IPP) con una molécula del dimetilalil pirofosfato (DMAPP) para formar geranilgeranil pirofosfato, precursor de los carotenos (Ding et al., 2019). Esta enzima se caracteriza por tener dominios altamente conservados, denominados dominios primero y segundo, ricos en aspartato (FARM y SARM, por sus siglas en inglés), los cuales son sitios de unión y catálisis (Barja & Rodríguez-Concepcion, 2021; Ding et al., 2019). La enzima PSY es fundamental para la síntesis de carotenoides; es la encargada de condensar las dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato en fitoeno, molécula primordial, reguladora de la síntesis y el contenido de otros miembros de la familia de carotenoides (Han et al., 2015). La actividad reguladora de la enzima PSY se informa en Couso et al., (2011); los autores comprueban que su sobreexpresión en el organismo *Chlorella vulgaris* muestra incrementos en los niveles totales de carotenoides, este hecho también se ha comprobado en diferentes plantas y bacterias. Por último, la enzima LYCB es la encargada de catalizar las reacciones de ciclización de los extremos del licopeno para formar el betacaroteno. Esta enzima está asociada a la membrana, conteniendo dos regiones hidrófobas que posiblemente forman dominios de hélices transmembranales (Blatt et al., 2015).

Debido a la importancia que tienen estas enzimas en la regulación y la producción de betacaroteno y al gran aumento de la información de las secuencias de diferentes organismos (Han et al., 2015), en esta investigación se utilizan herramientas bioinformáticas para la identificación *in vitro* de secuencias de genes y aminoácidos que permitan conocer características estructurales de genes y proteínas, dominios conservados, sitios reguladores y relación filogenética.

El aumento de información genómica disponible puede atribuirse al avance de las tecnologías de secuenciación, que tienen la capacidad de generar grandes volúmenes de datos en poco tiempo y una disminución considerable de costos (figura 5). Uno de los primeros métodos de secuenciación que adquirió relevancia fue el de terminación de cadena desarrollado por Frederick Sanger en el año de

1977. El método se centra en la utilización de dideoxinucleótidos para terminar la elongación de la cadena de ADN durante su replicación (Satam et al., 2023). Se logró su automatización utilizando dideoxinucleótidos marcados por fluorescencia y electroforesis capilar, lo que permitió incrementar la velocidad y la precisión de la secuenciación (Shendure & Ji, 2008).

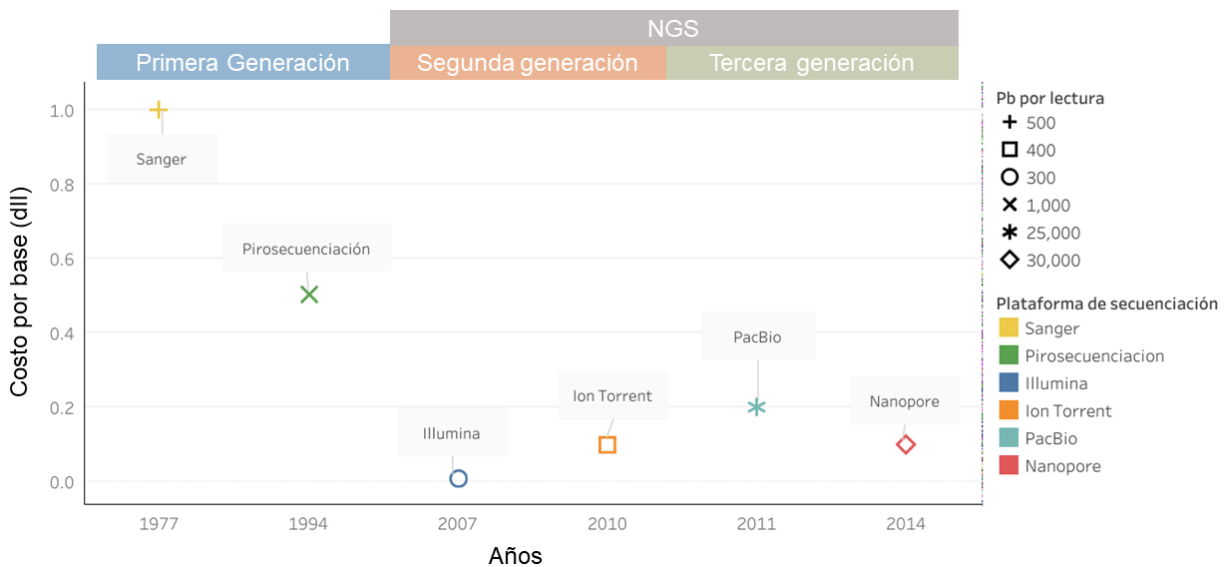


Figura 5. Línea del tiempo de las plataformas de secuenciación de primera generación (Sanger, Pirosecuenciación) y NGS (Illumina, Ion Torrent, PacBio, Nanopore). Basado en lo reportado en Satam et al., 2023.

Las plataformas de secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés), como Illumina, Pacific Biosciences y Oxford Nanopore, se distinguen del método de Sanger por su capacidad para realizar secuenciación masiva, permitiendo secuenciar millones de fragmentos de ADN de manera simultánea (Melanie Kappelman-Fenzl, 2021). La plataforma de Pacific Biosciences SMRT (Single-Molecule, real-time) fue difundida en el año 2011 y tiene la capacidad de realizar lecturas largas. El fundamento de la técnica consiste en el monitoreo de los eventos de fluorescencia provocados por la unión de nucleótidos marcados con

fluoróforos diferentes según la base. La unión de las bases se realiza a través de la ADN polimerasa, que se encuentra posicionada en el fondo de nanoestructuras denominadas ZMV (Zero Mode Wavelengths), las cuales delimitan el volumen de observación. Se registran los cambios de los pulsos de luz mientras se agregan los nucleótidos, la secuencia de los pulsos indica la secuencia del ADN. Esta técnica no requiere la amplificación del ADN, sin embargo, necesita de la unión de adaptadores en los extremos del fragmento de ADN que brindan estabilidad a la molécula, proporciona un sitio de unión para la ADN polimerasa y permiten una secuenciación circular continua (Baum, 2021).

Otra plataforma de secuenciación que permite realizar lecturas largas es la desarrollada por Oxford Nanopore. Esta tecnología fue lanzada en 2014. Su principio se basa en la linearización del ADN y su capacidad por moverse a través de un poro biológico denominado nanoporo debido a su tamaño nanométrico. Los nanoporos están ubicados en una membrana a la cual se le aplica corriente eléctrica, el ADN pasa a través del poro, obstruyendo parcialmente el flujo de corriente eléctrica a través de la membrana. Los nucleótidos del DNA son de diferente forma y tamaño, estas diferencias provocan que las variaciones en la corriente eléctrica sean específicas para cada base. Estos cambios son medidos y traducidos por un algoritmo determinando la secuencia del ADN (Satam et al., 2023). Una de las limitantes de esta plataforma es la falta de precisión, causada por el paso de iones del medio en el que está expuesta la membrana, resultando en la introducción de errores en la secuenciación por la interpretación incorrecta de las señales con dicho ruido (Melanie Kappelmann-Fenzl, 2021).

En la figura 6 se muestra una esquematización de los pasos del proceso de secuenciación en Illumina. En contraste con el fundamento de las plataformas de secuenciación de Nanopore y PacBio, el principio de la plataforma Illumina se basa en la secuenciación por síntesis de terminación. Esta técnica utiliza nucleótidos marcados con etiquetas fluorescentes específicas para cada base de ADN. La secuenciación ocurre por ciclos, que consisten en la adición de los nucleótidos etiquetados por la ADN polimerasa y su detección por medio de la interrupción

temporal de la síntesis de ADN, ocasionada por la etiqueta fluorescente que actúa como un terminador reversible de la polimerización. El ciclo termina cuando la etiqueta es eliminada, permitiendo que la síntesis continúe para iniciar un ciclo nuevo (Melanie Kappelman-Fenzl, 2021). En Illumina si es necesaria la preparación de librerías. La elaboración de la librería implica la fragmentación del ADN y la unión de los fragmentos resultantes a adaptadores. Los adaptadores son secuencias compuestas de sitios de unión para la ADN polimerasa, índices para la identificación de muestras y regiones complementarias a oligos fijados en la celda de flujo de Illumina. Después de la adición de adaptadores, prosigue la generación de clústeres. La generación de clústeres es la amplificación de los fragmentos de ADN que fueron hibridados con los oligos de la celda de flujo, con el fin de posicionar la cadena de ADN templete de una forma que facilite el acceso enzimático. Se generan alrededor de 1000 copias de cada molécula de ADN, que permanecen con una proximidad cercana, generando los clústeres.

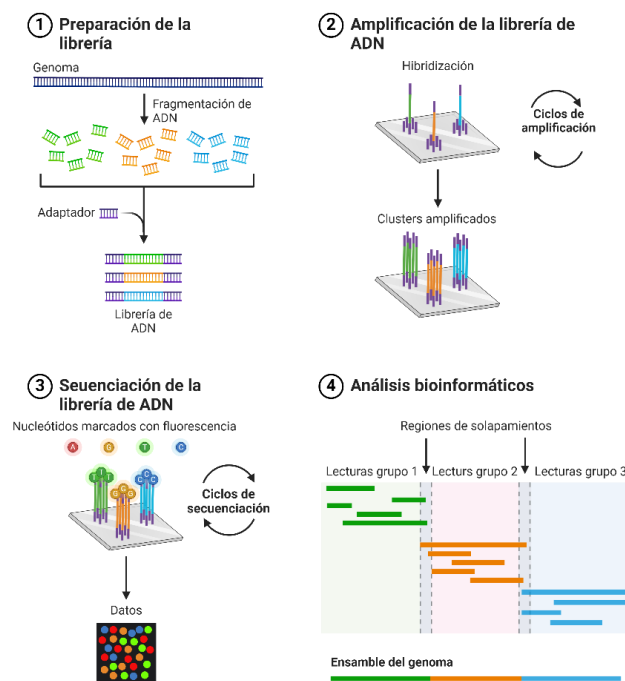


Figura 6. Metodología de secuenciación de ADN de la plataforma Illumina. Imagen adaptada de “Next Generation Sequencing (Illumina)” por BioRender.com, 2024.

En este trabajo se estudió conjuntamente la síntesis de nanopartículas de paladio mediante un enfoque de síntesis verde utilizando el extracto de *D. salina* SQ y la caracterización *in silico* de las enzimas involucradas en la biosíntesis de betacaroteno, identificadas por ensambles por referencia en los datos genómicos secuenciados por la plataforma Illumina. Las nanopartículas resultantes fueron caracterizadas mediante las técnicas de UV-Vis, DLS, FTIR y TEM, con el fin de identificar su tamaño, morfología, estabilidad y composición química de su superficie. También se evaluó la actividad antibacteriana de las nanopartículas obtenidas. Además, se llevó a cabo un análisis bioinformático con el propósito de encontrar información sobre los genes GGPPS, PSY y LYCB presente en el genoma de *D. salina* SQ involucrados en la ruta de la síntesis de betacaroteno, un pigmento presente en su extracto. Los análisis bioinformáticos proporcionaron información que permitió la caracterización *in silico* de las enzimas involucradas en la producción de betacaroteno, un pigmento que se identifica como posible candidato para la síntesis de nanopartículas de paladio.

II. Antecedentes

II.1. Síntesis verde de nanopartículas de paladio

Las nanopartículas de paladio han sido sintetizadas por plantas, hongos, bacterias y algas. La síntesis por medio de plantas se lleva a cabo por biocomponentes en el extracto de las plantas, que incluye polifenoles, alcaloides, terpenoides y flavonoides, los cuales proporcionan agentes reductores y estabilizantes, resultando en la formación de nanopartículas (Joudeh et al., 2022). El extracto puede ser obtenido de diferentes partes de la planta, como hojas, flores, semilla, fruta y raíces (Vishnukumar et al., 2017). Un ejemplo es la utilización del extracto de la hoja del árbol de *Cinnamomum camphora*. En este estudio querían conocer el efecto de la concentración del precursor en el tamaño y morfología de las nanopartículas. Los resultados indicaron que, a mayores concentraciones de precursor, disminuía el tamaño de partícula, además con el análisis de espectros obtenidos por FTIR, identificaron la disminución en las bandas relacionadas con grupos carbonilo en el espectro de las nanopartículas con respecto al extracto, infiriendo que moléculas como las flavonas, terpenoides y polisacáridos pueden estar involucrados en su formación. De igual forma, se encontró la presencia de una gran cantidad de oxígeno y carbono; los autores lo atribuyeron al posible recubrimiento de las nanopartículas por medio de grupos funcionales proporcionados por el extracto (Yang et al., 2010). Por otro lado, en Tahir et al., (2016) se utilizó el extracto de las hojas del árbol *Sapium sebiferum* y buscaron optimizar las condiciones de síntesis relacionadas con la temperatura de reacción y la concentración de extracto. El resultado indicó que con la temperatura de 60 °C se obtuvieron morfologías y tamaños homogéneos. La temperatura puede interferir con la velocidad de la reacción, temperaturas muy bajas pueden disminuir la tasa de reacción, y temperaturas muy altas pueden promover a una tasa de reacción más rápida e incluso la descomposición del extracto, produciendo morfologías y tamaños variables. En cuanto a la variación de la concentración del extracto, mayores concentraciones mostraron una mayor producción de nanopartículas, morfologías regulares y tamaños pequeños. En este estudio se concluyó que hay suficientes

moléculas para que se lleve a cabo la reducción y estabilización de las nanopartículas, ya que, a menores concentraciones de extracto, las nanopartículas sintetizadas presentaron morfologías irregulares y aglomeraciones. Así mismo, en el estudio realizado por Garole et al., (2019) se investigó la contribución del extracto de la planta *Lagerstroemia speciosa* a la síntesis de nanopartículas. Se encontró que las nanopartículas estaban dispersas en componentes del extracto. Con el análisis de espectro FTIR se comprobó la presencia de grupos funcionales asociados a biocomponentes de las plantas, además, los análisis de TGA mostraron una pérdida de peso de alrededor del 85 % entre los 110 - 250 °C, adjudicándolo a la pérdida de materia orgánica. Por último, en un estudio más reciente, se utilizó el extracto de pétalos de rosa para sintetizar nanopartículas de paladio, llegando a la conclusión de que los compuestos fenólicos que contiene el extracto son los encargados de reducir y estabilizar a las nanopartículas (Bi & Srivastava, 2024).

De manera similar, diferentes especies de hongo han sido utilizadas para sintetizar nanopartículas de paladio. En la investigación de Mohana & Sumathi (2020) se utilizó el extracto del hongo *Agaricus bisporus*. Los autores concluyeron que los compuestos fenólicos y los polisacáridos presentes en el extracto fueron los encargados de reducir y estabilizar el extracto. Otro extracto de hongo reportado es de *Inonotus obliquus*, donde se encontró que la concentración del extracto tenía un efecto sobre la morfología de las nanopartículas (Gil et al., 2018). Las imágenes de TEM mostraron que cuando aumentó la concentración del extracto, aumentó la porosidad de las nanopartículas. También se observó que el potencial Z es más negativo conforme el aumento del extracto, lo que puede deberse a los cambios en la porosidad. La dinámica de nucleación y crecimiento de las nanopartículas puede estar influenciada por la concentración del extracto. Una mayor concentración de extracto promueve una rápida nucleación seguida de un crecimiento no controlado de las nanopartículas favoreciendo la formación de estructuras porosas, debido a la generación de vacíos y canales entre los aglomerados de nanopartículas (Vanlalveni et al., 2021).

Así mismo, se ha conseguido la síntesis de nanopartículas de paladio por diferentes especies de algas, que incluyen tanto a macroalgas como a microalgas. Un ejemplo es el uso del extracto de *Sargassum bovinum*. Momeni y Nabipour (2015) proponen a los polioles y polisacáridos como los principales actores en la síntesis de nanopartículas de paladio. Por otro lado, Arsiya et al., (2017) reportaron por primera vez la utilización del extracto de la microalga *Chlorella vulgaris* para sintetizar nanopartículas de paladio, expresando que los grupos poliol y amida posiblemente participen en el proceso de síntesis. Igualmente, el extracto de *Spirulina platensis* fue reportado primeramente por Sayadi et al., (2018). Así mismo, se propone que el extracto de *Padina boryana* interviene en la formación de nanopartículas de paladio (Sonbol et al., 2021). El proceso consiste en dos pasos principales, el primero comprende la biorreducción de los iones metálicos (Pd^{+2}) a paladio metálico (Pd^0) para formar las semillas de crecimiento, y el segundo paso consiste en el crecimiento y el recubrimiento/estabilización de las nanopartículas. En ambos pasos, se sugiere que moléculas como hidrocarburos alifáticos, anillos aromáticos y aminas alifáticas pudieran estar involucradas en la biorreducción y contribuir en la estabilización de las nanopartículas por la adsorción en su superficie.

Hasta el momento, no se encuentra información reportada sobre la utilización del extracto de *D. salina* para la síntesis de nanopartículas de paladio. Como pudo observarse en diversos estudios, los parámetros de síntesis y los diferentes extractos influyen en las características de las nanopartículas sintetizadas. Por lo tanto, estudiar el extracto de *D. salina* y las condiciones de síntesis añade información sobre el efecto de estos parámetros en las nanopartículas sintetizadas.

II.2. Aplicaciones de las nanopartículas de paladio

Las nanopartículas de paladio obtenidas por síntesis verde se destacan por sus aplicaciones en los campos de catálisis y biomedicina. Las propiedades que les confiere el método de síntesis, como evitar el uso de agentes tóxicos y la biocompatibilidad favorece sus aplicaciones en dichos campos. Esto es notorio en

lo reportado por Matsena y Chirwa (2021), donde se sintetizaron nanopartículas de paladio por síntesis verde y síntesis química para comparar la actividad catalítica en la reducción de cromo VI, un contaminante presente en el ambiente. Se evaluó la eliminación del contaminante a diferentes concentraciones de nanopartículas sintetizadas por los diferentes métodos. Las nanopartículas obtenidas por métodos verdes alcanzaron la eliminación completa del contaminante en todas las concentraciones, mientras que las fabricadas por métodos químicos no lograron eliminar completamente el contaminante en ninguna concentración. Los autores sugieren que puede deberse a la diferencia de tamaños y morfología, ya que, por síntesis verde, gracias a la utilización del extracto de *Citrobacter sp.*, se adquirieron tamaños pequeños, partículas dispersas y morfologías esféricas y porosas, difiriendo con las características de las nanopartículas sintetizadas por el método químico, presentando tamaños de partícula más grandes y menos dispersas debido a la agregación. En el estudio de Mishra et al., (2019) también se evalúa la actividad catalítica de nanopartículas de paladio producidas por el extracto de *Chlorella vulgaris*, pero en este caso se enfoca en la catálisis de la síntesis de N-arilpiperazinas, un compuesto de interés para la industria farmacéutica. La evaluación de la reutilización de las nanopartículas indicó que, a partir del cuarto ciclo, el rendimiento de la actividad catalítica disminuyó considerablemente. Por otra parte, Chatterjee y Bhattacharya (2018) muestran la dependencia del tamaño de nanopartícula con la actividad catalítica de las reacciones Suzuki-Miyaura. Los autores señalaron que con la disminución del tamaño de partícula incrementaba la actividad catalítica y la reutilización en varios ciclos de reacción.

En el campo biomédico, las nanopartículas de paladio se evalúan principalmente por su actividad antibacteriana. En la investigación de Basak (2017) las nanopartículas mostraron actividad antibacteriana en menor medida para las bacterias gram-negativas que para las bacterias gram-positivas. El mecanismo de reacción lo atribuyen a la liberación de especies reactivas provocado por la superficie de las nanopartículas que permean la membrana celular. La penetración de la membrana celular se reflejó en la mayor fuga de proteínas y una mayor

inhibición del crecimiento de las bacterias gram-positivas. La relación entre la actividad antibacteriana y el tamaño de la nanopartícula es explorada en la investigación de Adams et al., (2014). Los autores evaluaron tres tamaños de nanopartículas (2, 2.5 y 3.1 nm) y los resultados revelaron que para la bacteria *E. coli* los tamaños más pequeños de partícula resultaron más efectivos, mientras que para *S. aureus* el tamaño más grande resultó tener una mayor actividad antibacteriana.

Los estudios de actividad catalítica y antibacteriana de las nanopartículas de paladio demuestran que las características del tamaño y la superficie están estrechamente relacionadas con su desempeño.

II.3. Análisis bioinformáticos de genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de betacaroteno

II.3.1. Geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPPS)

En el estudio de Barja y Rodriguez-Concepcion (2021) se revisó la información reportada sobre el gen que codifica para la enzima GGPPS en las especies de planta *Arabidopsis thaliana*, arroz (*Oryza sativa*), pimiento (*Capsicum annuum*), y tomate (*Solanum lycopersicum*). Se encontró que *A. thaliana* posee múltiples genes para GGPPS, cada uno cuenta con localización subcelular y expresión diferencial específicas, sugiriendo la diversificación funcional entre estos genes parálogos. En arroz se reportó un gen GGPPS como el principal productor de GGPP. Para el pimiento se identificó que el gen GGPPS es crítico para la producción de GGPP, siendo el precursor directo para la producción de carotenos, los cuales se acumulan durante la maduración del fruto. En el tomate se encontraron cinco genes que codifican para enzimas GGPPS. Estas enzimas se encuentran en el cloroplasto, ya que su actividad está relacionada con la síntesis de isoprenoides relacionados con la fotosíntesis, como los carotenoides. El artículo destaca la importancia de la expresión diferencial y la función de los genes según su ubicación, determinando así su función específica dentro de la célula. Consideran que la comprensión de estas enzimas es crucial para formular estrategias de ingeniería metabólica destinadas a manipular la producción de isoprenoides. Además, debido a la variabilidad en la expresión genética y su regulación, es importante realizar estudios específicos para cada especie de planta.

Se realizó un estudio similar por Feng et al., (2023); los autores estaban interesados en identificar los genes GGPPS en diferentes especies de algodón. Analizaron setenta y cinco genes de la familia GGPPS pertenecientes a las especies de algodón *Gossypium hirsutum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium arboreum* y *Gossypium raimondii*. También encontraron que las ubicaciones de los genes se dividían principalmente en los cloroplastos y plástidos. Además, realizaron análisis

estructurales en tres dimensiones y análisis de secuencias de las enzimas GGPPS, encontrando que tiene un gran número de hélices alfa y dos dominios ricos en aspartatos (DDxxxxD y DDxxD, donde la x representa cualquier aminoácido).

En cuanto a investigaciones con microalgas, se identificó el gen que codifica para la enzima GGPPS en el organismo *Dunaliella parva*. Los análisis bioinformáticos reportados por Shang et al., 2016 revelaron la longitud del gen de 1,612 pb, exhibiendo 10 exones y 9 intrones e identificando los dominios conservados ricos en aspartato y secuencias reguladoras. En la investigación de Liang et al., (2015) se aisló y se secuenció el gen GGPPS de la microalga *Dunaliella bardawil*; los análisis bioinformáticos revelaron que el gen contenía 10 exones y 9 intrones, reportando un tamaño de 1,814 pb, con un marco abierto de lectura de 1,074 pb codificando 357 aminoácidos. Los autores también identificaron los dominios conservados ricos en aspartato característicos de la enzima GGPPS. Por otro lado, en Zhu et al., (2020) se identificaron los genes de las enzimas involucradas en la síntesis de carotenos GGPPS, PSY, PDS, ZISO, ZDS, CRISTO y LCYB en *D. salina* GY-H13. Para la enzima GGPPS concuerda con las investigaciones anteriores en cuanto los dominios conservados ricos en aspartato, donde los autores compararon la secuencia de aminoácidos con las reportadas de otras especies de microalgas y plantas.

II.3.2. Pirofosfato sintasa (PSY)

En el estudio de Tran et al., (2009) investigaron la diversidad de PSY en el grupo de algas. Los autores realizaron un análisis comparativo de secuencias genómicas y de aminoácidos de la enzima PSY en algas verdes, rojas, diatomeas y haptófitas. Los resultados demostraron dos clases de PSY, tipo I y tipo II, el análisis filogenético revela que comparten ancestros en común y que la divergencia del gen puede relacionarse a elementos reguladores de un tipo a otro, ya que a nivel enzimático se mostró que contienen dominios conservados correspondientes al sitio de unión al sustrato y función catalítica. También encontraron la presencia de múltiples copias

parálogas de genes PSY, relacionándolo con respuesta a factores ambientales. La variación en la estructura genética también es demostrada en el análisis realizado por Han et al., (2015), donde reportan que en las algas el número de intrones varían ampliamente, mientras que en plantas se mantenía de 4 a 5 intrones.

La caracterización del gen PSY en *D. salina* es reportado en el estudio Yan et al., (2005). La estructura del gen consiste en cinco exones y cuatro intrones, y la longitud de 2,982 pb. Este gen codifica para una proteína de 420 aminoácidos y la comparación con las secuencias de otras especies de plantas y algas mostraron alta similitud, indicando la conservación de esta enzima en diversas especies fotosintéticas. Por otro lado, la investigación de Lao et al., (2011) profundiza en la investigación del gen PSY en la microalga *D. bardawil*. Se aisló y analizó el gen PSY para comprender su estructura y función. El gen contiene seis exones separados por 5 intrones con una longitud total del gen de 3,300 pb; los autores también identificaron secuencias promotoras y reguladoras conservadas, como la caja G con elementos reguladores de luz. La estructura de la proteína PSY fue simulada y su secuencia de aminoácidos se alineó con secuencias de otros organismos. Los resultados revelaron una proteína de 424 aminoácidos y en cuanto a su análisis estructural se encontraron sitios de unión a magnesio, residuos catalíticos y dos sitios ricos en aspartato (DxxxD). En la revisión de Shaker et al., (2021) se analizó el gen que codifica para PSY de diferentes especies del género *Dunaliella*. Los autores mencionan variaciones de intrones y exones del gen para las diferentes especies, concluyendo que hay una gran diversidad genómica entre las especies de microalgas, aunque pertenezcan al mismo género. También se encontraron diferencias en las características de la proteína, como distintos pesos moleculares y puntos isoeléctricos.

II.3.3. Licopeno betaciclase (LYCB)

La investigación bioinformática realizada por Cui et al., (2011) se estudia la evolución molecular y las características de las enzimas licopeno ciclase en las

algas eucariotas. Se realizaron análisis filogenéticos con las secuencias de los genes correspondientes a licopeno betaciclasa (LYCB) y licopeno épsilon-ciclasa (LYCE) de bacterias, cianobacterias, hongos, plantas y algas, los resultados sugieren que hubo un evento de duplicación de genes, resultando en las dos clases de enzimas. Este mismo hecho puede comprobarse con la identificación de solo el gen de la enzima LYCB que en las microalgas verdes como *D. salina* y *Haematococcus pluvialis*, mientras *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella sp.* solo tienen el gen que codifica para la enzima LCYE, indicando la pérdida de copias de genes. La secuencia de aminoácidos de los diferentes organismos es variada, lo que se traduce en diferencias en longitud, pesos moleculares y puntos isoeléctricos. Los autores localizaron dos dominios conservados para la LYCB cruciales para el sitio de unión del licopeno y la catálisis de la reacción de ciclización para formar el betacaroteno, y el otro dominio está relacionado con la estabilidad de la estructura de la enzima. Por otro lado, en el artículo publicado por Blatt et al., (2015) se caracterizó la enzima perteneciente a la microalga *Ostreococcus lucimarinus* que fusiona las enzimas LYCB y LCYE en una sola. La estructura de la enzima consiste en tres partes principales, LYCB, LCYE encargados de la ciclación del licopeno y el complejo de captación de luz (LHC). Los estudios filogenéticos sugieren que la fusión de los genes puede estar relacionado con adaptaciones metabólicas específicas del grupo *Prasinophytina*, ya que los genes que codifican para estas enzimas en otras algas verdes se encuentran por separado. La investigación de Lan et al., (2022) caracteriza la enzima LYCB en *D. salina*. Esta enzima resultó tener una longitud de 594 aminoácidos y un peso molecular de 65.69 kDa. El análisis de los dominios conservados mostró que la estructura de la proteína mantenía los sitios de unión y catalíticos característicos de LYCB. Para conocer más sobre la expresión del gen LYCB transformaron a *D. salina* y los resultados indicaron que bajo estrés lumínico incrementa la expresión del gen, resultando en un flujo mayor de producción de betacaroteno y derivados. En el estudio de Fang et al., (2023) caracterizan los genes para LYCB y LYCE para la microalga *Chlorella sorokiniana* FZU60. Los autores identificaron dominios conservados relacionados con

actividades catalíticas, unión del sustrato y el motivo específico de la familia de enzimas licopeno ciclasa.

III. Justificación

Las nanopartículas de paladio presentan un amplio espectro de aplicaciones, destacando especialmente en los campos catalítico y biomédico. Las características fundamentales de estas nanopartículas, como el tamaño, la morfología y la química superficial, son determinantes en sus posibles aplicaciones y dependen estrechamente del método de síntesis utilizado. Los métodos de síntesis verde surgen como alternativa a los métodos convencionales, ya que se obtienen nanopartículas con morfologías y tamaños homogéneos, funcionalización de la superficie sin la necesidad de agregar reactivos extras y promueven la sostenibilidad y el cuidado del medio ambiente. Estos métodos utilizan compuestos de origen biológico, como extractos de diversos organismos, que contienen moléculas como los pigmentos, responsables de la reducción del precursor metálico, así como del recubrimiento y estabilización de las nanopartículas de paladio. En este estudio, se emplea el extracto de la microalga *Dunaliella salina* SQ para sintetizar nanopartículas de paladio y explorar su aplicación como agente antibacteriano.

Por otro lado, la bioinformática brinda la posibilidad realizar experimentos *in silico*, partiendo de datos genómicos, facilitando la extracción de información y formulación de conclusiones acerca de un organismo. En particular, la identificación de genes de enzimas clave en la ruta del betacaroteno, como GGPPS, PSY y LYCB aportará conocimiento sobre la producción de este pigmento en *Dunaliella salina* SQ. Si bien ya existe información genética sobre los genes involucrados en la síntesis de betacaroteno en diversas cepas de *D. salina*, se ha reportado que hay una gran diversidad genómica en el grupo de algas, por lo tanto, hacer análisis específicos de la cepa de *D. salina* SQ puede contribuir con datos fundamentales para aplicaciones potenciales en el campo de la biotecnología.

IV. Hipótesis

- Se obtendrán nanopartículas de paladio con morfología y tamaño uniforme mediante el uso del extracto de la microalga *Dunaliella Salina* SQ,
- Por medio de análisis bioinformáticos de los datos genómicos de *Dunaliella salina* SQ se identificarán los genes involucrados en la ruta metabólica del pigmento betacaroteno.

V. Objetivos

V.1. Objetivo general:

Sintetizar nanopartículas de paladio mediante síntesis verde y realizar análisis bioinformáticos de la ruta metabólica del pigmento betacaroteno de la microalga *Dunaliella salina* SQ.

V.2. Objetivos específicos:

- Sintetizar nanopartículas de paladio con el extracto de la microalga *Dunaliella salina* SQ con diferentes condiciones de síntesis.
- Utilizar las técnicas de caracterización: TEM, UV-Vis, FTIR y DLS para evaluar la morfología, el tamaño y la funcionalización de las nanopartículas metálicas.
- Preprocesar los datos genómicos.
- Ensamblar por referencia los genes de la ruta metabólica de betacaroteno.

VI. Métodos y materiales

La metodología se dividió en dos partes principales (figura 7); la primera se relaciona con el análisis bioinformático para la búsqueda de los genes involucrados en la síntesis de betacaroteno en la microalga *D. salina* SQ. En general, el procedimiento consistió en identificar la ruta metabólica del betacaroteno. Se prosiguió con la búsqueda en bases de datos de las secuencias de los genes a nivel de ADN y ARNm de organismos cercanos evolutivamente. Con los datos recuperados se realizó el ensamble por referencia, que consistió en alinear las lecturas obtenidas por la secuenciación de *D. salina* SQ contra las secuencias obtenidas de las bases de datos. Se finalizó con el análisis de las secuencias consenso obtenidas a nivel de aminoácido y enzima codificada.

La segunda parte consistió en la síntesis de nanopartículas de paladio (figura 7), donde se utilizó el extracto de la microalga *D. salina* SQ y cloruro de paladio para la síntesis de las nanopartículas a diferentes condiciones experimentales. Por último, las nanopartículas se caracterizaron por Uv-Vis, DLS, FTIR y TEM.

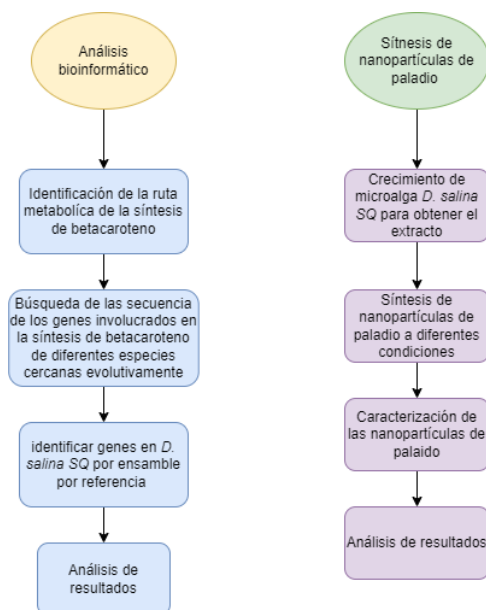


Figura 7. Metodología general del análisis bioinformático y la síntesis de nanopartículas de paladio.

VI.1. Parte I: síntesis verde de nanopartículas

VI.1.1. Cultivo de *Dunaliella salina* SQ:

Se preparó medio Jonhson modificado como medio de cultivo para la microalga *D. salina* SQ (tabla 1). Se realizaron curvas de crecimiento con conteos en la cámara de Neubauer y tomando la absorbancia a los 630 nm en el espectrofotómetro de UV-vis cada tercer día para determinar las fases de crecimiento de *D. salina* SQ.

Tabla 1. Receta medio Jonhson modificado utilizado en el cultivo de *D. salina* SQ.

Reactivo	Concentración en el medio de cultivo
NaCl	1.5 M
NaHCO ₃	50 mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	5 mM
KNO ₃	10 mM
CaCl ₂	0.2 mM
KH ₂ PO ₄	0.4 mM
H ₃ Bo ₃	185 uM
MnCl ₂ 4H ₂ O	7 uM
EDTA	5 uM
FeCl ₂ .6H ₂ O	2 uM
ZnCl ₂	1 uM
CoCl ₂ 6H ₂ O	1 uM
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	1 uM

VI.1.2. Preparación del extracto:

En la figura 8 se muestra el procedimiento para la preparación del extracto de la microalga *D. salina* SQ, cosechada en la fase de crecimiento exponencial. El cultivo se introdujo en tubos de 50 ml de PPCO para centrifuga, posteriormente se centrifugó durante 4 min a 6500 rpm con una temperatura de 15 °C, se retiró el sobrenadante y se re-suspendió el pellet en agua desionizada. Se repitió el proceso de centrifugación bajo los mismos parámetros. Una vez finalizada la centrifugación, se retira el sobrenadante y la biomasa se re-suspende agregando 30 ml de agua desionizada por cada 5g de biomasa (5g/30 ml). La biomasa obtenida se puso en baño María durante 15 min a una temperatura de 80 °C. Después se filtró la biomasa al vacío con la ayuda de un embudo Buchner, un matraz kitasato y papel filtro Whatman No. 4.

VI.1.3. Síntesis de nanopartículas de paladio:

Se prepararon 250 ml de una solución 2mM de cloruro de paladio con 1.6 ml de HCl y agua desionizada. Posteriormente, se mezcló el extracto de la microalga *D. salina* SQ con la solución de precursor de paladio, sometiéndose a agitación magnética durante 2 horas (figura 9). En la tabla 2 se muestran las condiciones de síntesis. La temperatura reportada para la síntesis verde de nanopartículas de paladio es de 60 °C (Arsiya et al., 2017), por lo que en el primer experimento de síntesis se utilizó esta temperatura para determinar la concentración óptima de extracto. Una vez establecida esta concentración, se evaluaron diferentes temperaturas para determinar su efecto en la síntesis de las nanopartículas de paladio, ya que se reporta (Nasrollahzadeh et al., 2020; Tahir et al., 2016; Uzair et al., 2020) que la síntesis de nanopartículas a distintas temperaturas puede afectar el comportamiento en la cantidad de nanopartículas obtenidas (Nasrollahzadeh et al., 2020; Tahir et al., 2016; Uzair et al., 2020).

VI.1.4. Caracterización de las nanopartículas de paladio

Se utilizó la técnica de UV-Vis para obtener una primera aproximación de las nanopartículas obtenidas con diferentes condiciones de síntesis (tabla 2). Esta técnica permitió establecer el tiempo de reacción de dos horas, concentración de 10% extracto. Las nanopartículas sintetizadas a diferentes temperaturas se evaluaron por las técnicas de FTIR (espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier), TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) y DLS (Dispersión Dinámica de Luz). En la Tabla 3 se presenta la información de los equipos utilizados en la caracterización.



Figura 8. Procedimiento de la preparación del extracto



Figura 9. Procedimiento de la síntesis de nanopartículas de paladio

Tabla 2. Condiciones experimentales.

No. Experimento	Concentración de extracto	Temperatura
1	5 %	60 °C
	10 %	
	20 %	
2	10 %	22 °C
		60 °C
		80 °C
		90 °C

Tabla 3. Equipos utilizados en la caracterización de las nanopartículas

Técnica de caracterización	Equipo
Uv-Vis	GENESYS 10S UV-Vis
FTIR	PERKIN ELMER
TEM	HITACHI 7500
DLS	ZETASIZER MALVER

VI.2. Parte II: análisis bioinformático

VI.2.1. Preprocesamiento de datos genómicos de *D. salina* SQ

El preprocesamiento de los datos incluyó la visualización de las lecturas de *D. salina* SQ utilizando FASTQC para evaluar la calidad de estas. Este paso es crucial para identificar y eliminar adaptadores y bases de baja calidad, asegurando así la precisión y fiabilidad de los datos para análisis posteriores.

VI.2.2. Ensamble por referencia con Bowtie2

Para el ensamble por referencia se utilizó el software Bowtie2 versión 2.2.4 (Langmead & Salzberg, 2012), las lecturas limpias de *D. salina* SQ obtenidas por la plataforma de secuenciación de Illumina HiSeq 2500 y las secuencias de ADN y ARNm que se utilizaron como referencia de los genes que codifican para las enzimas geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS), fitoeno sintasa (PSY) y licopeno betaciclasa (CRTLb). En las tablas Tabla 4, Tabla 5 y Tabla 6 se muestran los organismos a los que les pertenecen las secuencias utilizadas como referencia para el alineamiento, el número identificador de la secuencia y el resultado obtenido del ensamble. Las secuencias de referencia fueron obtenidas NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

El proceso de alineamiento con Bowtie2 comenzó con la indexación de la secuencia de referencia, lo cual implica procesarla para crear una serie de índices que permita al algoritmo hacer búsquedas rápidas y eficientes. Continuó con el alineamiento de lecturas contra la secuencia de referencia, con la finalidad de encontrar el mejor alineamiento posible. Este proceso arrojó como resultado un archivo con formato SAM (Sequence Alignment/Map), que contiene información sobre el alineamiento de las lecturas, su posición en el genoma de referencia, calidad del alineamiento y la secuencia alineada. Por último, con el software Samtools, el archivo SAM, se convirtió a formato BAM (Binary Alignment/Map) para obtener una versión comprimida del formato SAM, ya que necesita menos espacio de almacenamiento y es más rápido de procesar.

VI.2.3. Visualización del ensamble

Los resultados de alineamiento se observaron mediante el software de Tablet versión 1.17, permitiendo visualizar la profundidad de alineación de cada base con respecto a su posición en la secuencia de referencia, la cobertura de la secuencia, los espacios vacíos, e identificar cambios de nucleótidos entre el ensamble obtenido y la secuencia de referencia (figura 10). Posteriormente, con la ayuda de Samtools se extrajo una secuencia consenso de los ensambles con los cambios de los nucleótidos encontrados. Con el programa UGENE 50.0 se realizó una curación manual del resultado de la secuencia consenso en revisión con el alineamiento de la secuencia de referencia y con el marco de lectura de la región codificante. Además, por medio del programa se recabó la información sobre la longitud, el peso molecular y el punto isoeléctrico de las secuencias consenso y de referencia de las enzimas propuestas. Por último, se realizó una comparación entre las secuencias de proteínas de los diferentes organismos contra las secuencias de proteínas obtenidas.

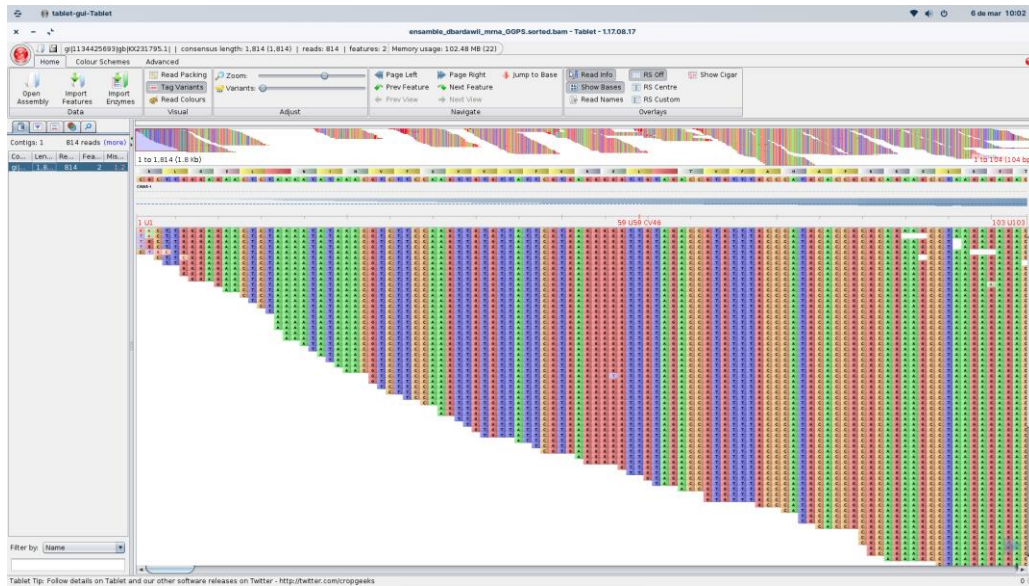


Figura 10. Visualización del resultado del ensamble por referencia del gen que codifica para la enzima GGPPS, utilizando como referencia la secuencia de *Dunaliella bardawil*.

Tabla 4. Organismos, número de identificación de las secuencias y resultados del ensamble por referencia del gen que codifica para la enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS).

Organismo	ADN	ARNm	Proteína	Resultado ensamble ADN	Resultado ensamble ARNm
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NC_003075.7	NM_119845.3	NP_195399.1	Negativo	Negativo
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	NC_057015.1	XM_001703117.2	XP_001703169.1	Negativo	Negativo
<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	NW_003307579.1	XM_002953422.1	XP_002953468.1	Negativo	Negativo
<i>Dunaliella salina</i> CCAP 19/18	MU069587.1	-	KAF5838202.1	Negativo	-
<i>Dunaliella salina</i> YC	-	MN172173.1	QID75818.1	-	Positivo
<i>Dunaliella salina</i> GY-H13	-	MN732754.1	QIW94437.1	-	Positivo
<i>Dunaliella bardawil</i>	-	KX231795.1	APW83740.1	-	Positivo
<i>Dunaliella viridis</i>	KT819634.1	-	AOR83330.1	Negativo	-
<i>Dunaliella viridis</i>	-	HM114366.1	ADL16411.1	-	Negativo
<i>Dunaliella parva</i>	-	KR425671.1	AMR55359.1	-	Negativo

Tabla 5. Organismos, número de identificación de las secuencias y resultados del ensamble por referencia del gen que codifica para la enzima fitoeno sintasa (PSY).

Organismo	ADN	ARNm	Proteína	Resultado ADN	Resultado ARNm
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NC_003076.8	NM_001343484.1	NP_001331504.1	Negativo	Negativo
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	NC_057005.1	XM_001701140.2	XP_001701192.1	Negativo	Negativo
<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	NW_003307608.1	XM_002956737.1	XP_002956783.1	Negativo	Negativo
<i>Dunaliella sp.</i> 336	DQ463306.1	DQ463305.1	ABE97388.1		Negativo
<i>Dunaliella salina</i> ATCC 30861	-	U91900.1	AAB51287.1	-	Positivo
<i>Dunaliella salina</i> CCAP 19/18	MU070378.1	-	KAF5828011.1	Negativo	-
<i>Dunaliella salina</i> GY-H13	-	MN732755.1	QIW94438.1	-	-
<i>Dunaliella bardawil</i>	-	EU328287.1	ABY50090.1	-	Positivo
<i>Dunaliella parva</i>	-	KY069272.1	ARH02607.1	-	Negativo
<i>Dunaliella salina</i>	-	AY601075.1	AAT46069.1	-	Negativo

Tabla 6. Organismos, número de identificación de las secuencias y resultados del ensamble por referencia del gen que codifica para la enzima licopeno betaciclasa (CrtL-b).

Organismo	ADN	mRNA	Proteína	Resultado ensamble ADN	Resultado ensamble ARNm
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NC_003074.8	NM_111858.2	NP_187634.1	Negativo	Negativo
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	NC_057011.1	XM_043064723.1	XP_042921724.1	Negativo	Negativo
<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	NW_003307614.1	XM_002957257.1	XP_002957303.1	Negativo	Negativo
<i>Dunaliella salina</i> CCAP 19/18	MU070084.1	-	KAF5830051.1	Negativo	-
<i>Dunaliella salina</i> CCAP 19/30	-	EU327876.1	ACA34344.1	-	Negativo
<i>Dunaliella bardawil</i>	-	KX218392.1	ANY98896.1	-	Positivo

VII. Resultados y discusión

VII.1. Uv-Vis

Para evaluar inicialmente la síntesis de nanopartículas de paladio, se tomaron los espectros de absorbancia obtenidos por Uv-vis bajo diversas condiciones de síntesis mostrados en la figura 11. En la figura 11a se presentan los espectros de absorbancia del extracto de *D. salina* SQ, la solución de cloruro de paladio, y las nanopartículas sintetizadas con 5%, 10% y 20% de extracto. El espectro de la solución de cloruro de paladio II revela una banda de absorbancia entre 383 y 526 nm, atribuido a los iones de Pd^{+2} , concordando con lo reportado en (Arsiya et al., 2017; Garole et al., 2019; Seku et al., 2024). Por su parte, el espectro del extracto muestra tres bandas en las longitudes de onda 256 – 292 nm, 372 – 503 nm y 645 – 694 nm, característicos de los pigmentos como los carotenos y clorofilas a y b, que absorben en las regiones de luz visible azul y rojo. Esto es consistente con lo reportado en la referencia Valencia-Yañez et al., (2018), donde se detalla el contenido de pigmentos como neoxantina, violaxantina, clorofila a y b, y betacaroteno para *D. salina* SQ.

Durante la síntesis de las nanopartículas ocurre un cambio de color de la mezcla de amarillo verdoso a café intenso, este cambio de color se puede relacionar con los espectros obtenidos, observando disminuciones de los picos presentes en el espectro del extracto y en la solución de paladio, indicativo de la reducción de los iones de Pd^{+2} a Pd metálico por los componentes del extracto. Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura, donde el espectro característico para las nanopartículas de paladio no muestra picos de absorción máximos, debido a sus propiedades no absorbentes en la región visible del espectro electromagnético (Garole et al., 2019; Sonbol et al., 2021; Yang et al., 2010).

La concentración de extracto afectó la síntesis de nanopartículas de paladio, lo cual se puede observar en los cambios del espectro. Con un 5% de extracto, es notable

una mayor presencia de las bandas correspondientes al extracto, en comparación con las nanopartículas sintetizadas con concentraciones del 10% y 20%, donde estas bandas de absorción disminuyen. Esto sugiere que una mayor concentración de extracto conduce a una mayor síntesis de nanopartículas, lo cual está en concordancia con el espectro esperado para las nanopartículas de paladio. Este resultado coincide con lo informado en Tahir et al., (2016), donde relaciona el aumento de la intensidad del espectro y la disminución de bandas con la producción de nanopartículas, indicando que a menor concentración de extracto no hay suficientes moléculas reductoras para sintetizar nanopartículas. Al incrementar la concentración del extracto, aumenta la disponibilidad de moléculas reductoras, lo que resulta en una producción más notable de nanopartículas, reflejada en cambios visibles en el color y en el espectro UV-vis.

Por otro lado, es evidente que, en el espectro de las nanopartículas de paladio sintetizadas, las bandas asociadas al extracto no desaparecen por completo. Un resultado similar es comunicado en Rafi Shaik et al. (2017), donde se varió la concentración del extracto, afectando la cantidad de nanopartículas sintetizadas. En este estudio se menciona que las contribuciones de las bandas de absorción del extracto en las nanopartículas sintetizadas pueden deberse a la unión de componentes del extracto a la superficie de las nanopartículas, actuando como agentes estabilizantes. Observaciones comparables son mencionadas en Garole et al., (2019), donde también se detectan contribuciones del extracto en el espectro de las nanopartículas.

Debido a la mínima diferencia observada entre los espectros al utilizar 10% y 20% de extracto, se optó por mantener la concentración de 10% y variar la temperatura para evaluar su impacto en la síntesis de nanopartículas de paladio (figura 11b). Las nanopartículas fueron sintetizadas a temperaturas de 22 °C (ambiente), 60 °C, 80 °C y 90 °C. A temperatura ambiente, se notó un cambio mínimo en las contribuciones del extracto, mientras que a temperaturas más altas se observaron cambios bien diferenciados entre el espectro del extracto y el de las nanopartículas

sintetizadas. Estos resultados demuestran que, además de la concentración del extracto, la temperatura tiene influencia en la síntesis de nanopartículas. A temperaturas elevadas, los espectros diferían principalmente en las contribuciones del extracto. A 90 °C, estas contribuciones fueron casi nulas, mientras que a 60 °C y 80 °C se mantuvo la banda ubicada entre los 600 y 700 nm. Tahir et al. (2016) obtuvo resultados similares, infiriendo que, a mayores temperaturas, los compuestos orgánicos pueden volverse inestables y descomponerse, lo que resulta en la pérdida de contribuciones del extracto. Además, la temperatura afecta tanto la tasa de reacción como la estabilidad de las nanopartículas, lo cual se refleja en la intensidad de la absorbancia de las nanopartículas sintetizadas. Debido a estas variaciones inducidas por la temperatura las aplicaciones potenciales de las nanopartículas pueden verse afectadas, como se documenta en Wang et al. (2022). En este estudio, la variación de la temperatura durante la síntesis influyó en las propiedades catalíticas de las nanopartículas en la reducción de CO₂, destacando la importancia del control de la temperatura durante el proceso de síntesis.

Por último, se analizó cómo el tiempo de reacción afecta al espectro, como se muestra en la figura 11c. Basándonos en resultados previos, se seleccionaron condiciones de un 10% de extracto y una temperatura de 60 °C para este experimento. Se registraron espectros en diversos intervalos: al inicio, y a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos de reacción. Se observó un aumento en la intensidad de los espectros a medida que avanzaba el tiempo, indicando una mayor concentración de nanopartículas. Además, es importante controlar el tiempo de reacción, ya que se ha demostrado que influye en el tamaño y distribución de tamaño, y por lo tanto, en su aplicación. Tiempos de reacción prolongados tienden a producir partículas más grandes, mientras que períodos más cortos podrían favorecer la formación de nanopartículas más pequeñas. Respecto a la distribución del tamaño, un tiempo de reacción insuficiente puede resultar en nanopartículas polidispersas, mientras que un tiempo adecuado puede conducir a la obtención de nanopartículas monodispersas. Estas características son cruciales para sus posibles aplicaciones (Adams et al., 2014; Chatterjee & Bhattacharya, 2018; Uzair et al., 2020).

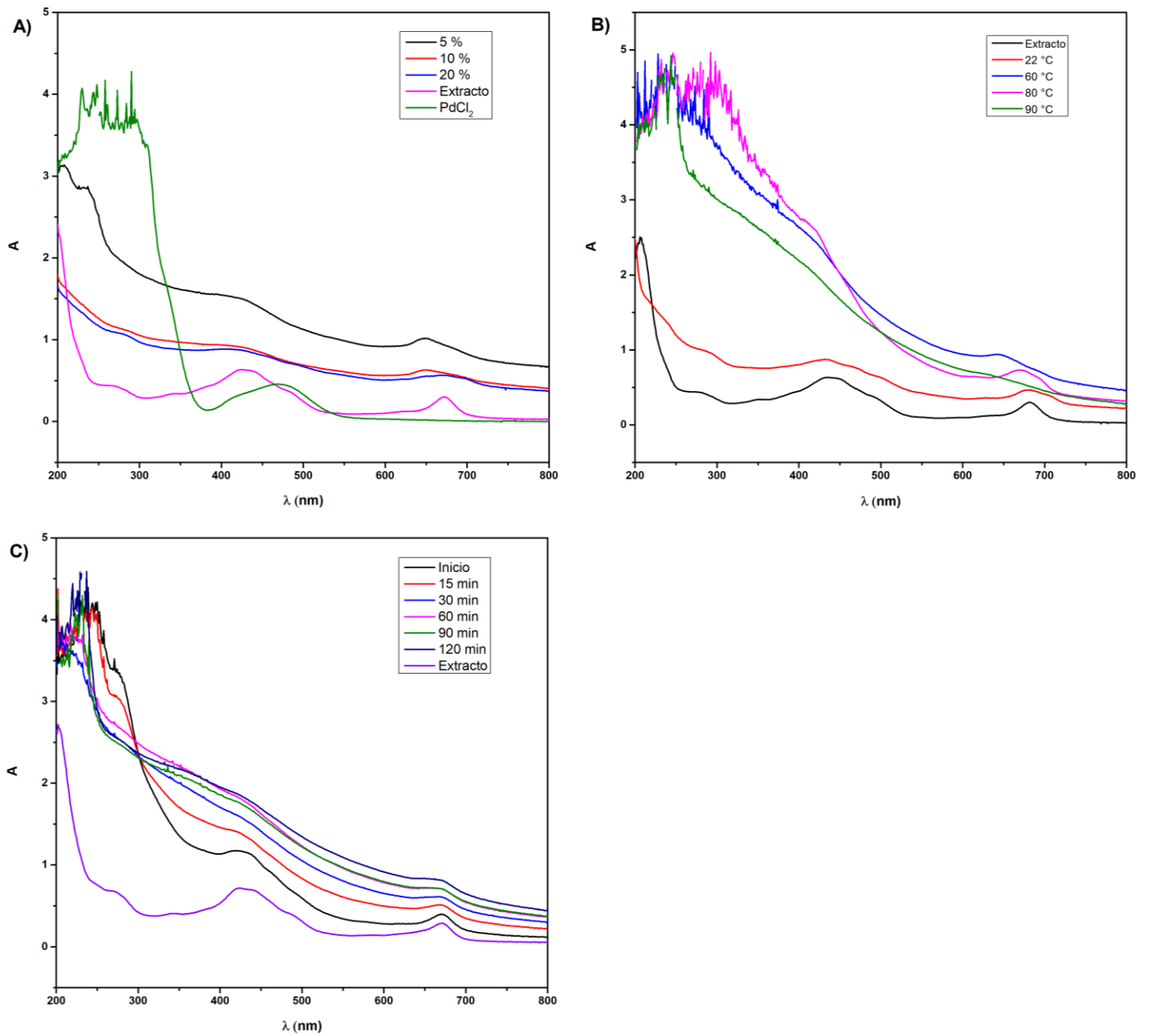


Figura 11. Espectros de absorción de las diferentes condiciones de síntesis de nanopartículas de paladio: a) concentración de extracto, b) temperatura, d) tiempo de reacción.

VII.2. FTIR

En la figura 12 se presentan los espectros de FTIR del extracto de *D. salina* SQ y de las nanopartículas sintetizadas a distintas temperaturas. Las bandas más prominentes del espectro de *D. salina* SQ se localizan en 3285, 2926, 1735, 1642, 1535, 1447, 1151, 1076 y 1023 cm^{-1} . Estas bandas son similares al espectro reportado de una cepa de *D. salina* proveniente de indonesia (Rusmawanto et al., 2019), indicando que la banda en el rango de 3500 a 3200 cm^{-1} corresponde a vibraciones de estiramientos O-H y enlaces de hidrogeno, relacionados con los grupos funcionales fenoles y alcoholes. La banda en 2926 cm^{-1} se relaciona con las vibraciones asimétricas de grupo alcanos, alquilos y cadenas alifáticas, grupos presentes en pigmentos como la clorofila (Sedjati et al., 2019), lo que concuerda con en el espectro UV-vis discutido anteriormente, donde se presentan bandas de absorbancia relacionadas con pigmentos como la clorofila a y b, mientras que la banda 1023 cm^{-1} se asocia contribución de carotenos (Rusmawanto et al., 2019). La banda en 1735 cm^{-1} se le atribuye al enlace C=O de los ésteres (Banu et al., 2023) . Por otro lado, las bandas 1642, 1535 y 1447 cm^{-1} se relaciona con la presencia de grupos aromáticos, amidas y grupos hidroxilo (Cepoi et al., 2022). Por último, las bandas 1151 y 1076 cm^{-1} se asocian a la vibración de grupos de aminas (Sharmila, Haries, et al., 2017).

La caracterización por FTIR se utilizó principalmente para identificar los cambios en el espectro del extracto de *D. salina* SQ y las nanopartículas sintetizadas, ya que investigaciones sugieren que al producir nanopartículas metálicas por síntesis verde quedan recubiertas por moléculas provenientes del extracto (Arsiya et al., 2017; Vellaisamy et al., 2023). Las regiones con mayor diferencia entre el extracto y las nanopartículas de paladio se encuentran señaladas por colores. Se puede observar que hay una diferencia notoria en la definición de las bandas del extracto con respecto al de las nanopartículas sintetizadas. Debido a que los cambios se identifican en las posiciones 3285, 2926, 1735, 1642, 1535, 1447 y un desplazamiento de la banda 1026 al 999 cm^{-1} se infiere que grupos fenólicos,

alcanos, alquilo, aminas, grupos aromáticos y amidas podrían estar involucrados en la reducción de los iones de paladio y en la estabilización de la nanopartícula (Bi & Srivastava, 2024). Estos resultados concuerdan con lo reportado Cepoi et al. (2022), donde se evaluó el cambio de la biomasa de la microalga *D. salina* durante la síntesis de nanopartículas de plata, indicando que los cambios en el espectro se relacionan con los grupos amina, alquilo y amina, proponiéndolos como grupos reductores y recubrimientos de las nanopartículas. También concuerdan con los resultados de la síntesis con *C. vulgaris*, donde se observa desplazamiento de las bandas del espectro de las nanopartículas sintetizadas, con respecto al extracto de la microalga, mencionando que los grupos amida y poliol pueden estar estrechamente relacionados con la síntesis de paladio (Arsiya et al., 2017).

Por otro lado, no hay diferencias notables entre el espectro de las nanopartículas sintetizadas a diferentes temperaturas. Esto discrepa de lo esperado, ya que según los resultados de Uv-Vis (figura 11b), el espectro de absorbancia de las nanopartículas sintetizadas por TA difiere considerablemente con las temperaturas de 60, 80 y 90 °C. Específicamente, cuando a la síntesis se realiza a 60 y 80 °C, la similitud entre los espectros de Uv-Vis y FTIR es consistente. Sin embargo, se esperaba un cambio más notorio para la temperatura de 90 °C, ya que según lo reportado Tahir et al., (2016) y en concordancia con los espectros Uv-Vis, la tendencia sería la descomposición de los componentes orgánicos presentes en el extracto. A pesar de esto, la similitud entre los espectros indica que no hay diferencias relevantes.

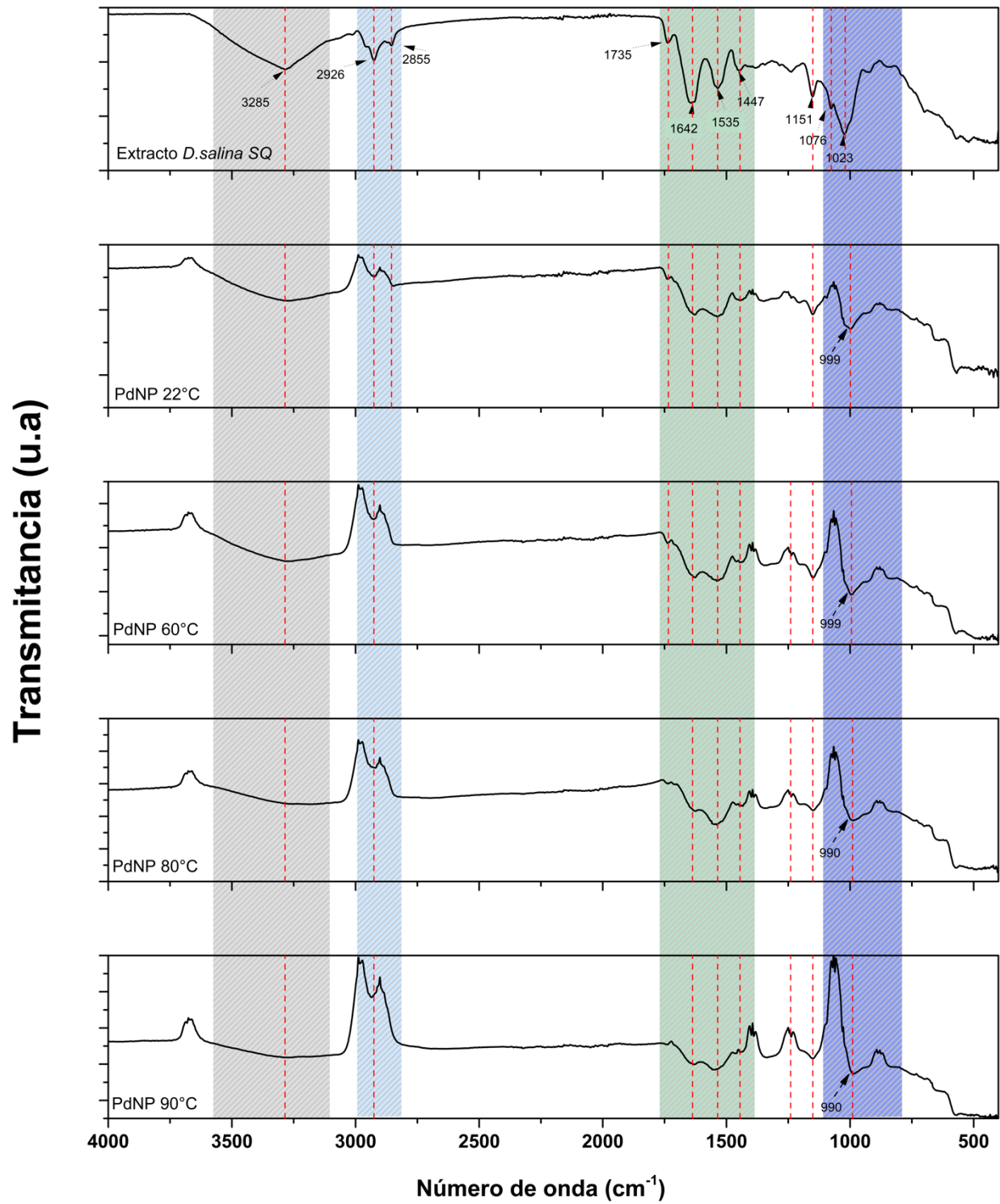


Figura 12. Espectro de FTIR del extracto de *D. salina* SQ y las nanopartículas de paladio sintetizadas a 22 (TA), 60, 80 y 90 °C.

VII.3. TEM

Los resultados obtenidos por TEM permitieron visualizar la morfología esférica de las nanopartículas para todas las temperaturas (figura 13, figura 14 y figura 15). En cuanto a la distribución de tamaños (figura 16), se obtuvo un tamaño medio de partícula de 5.2 ± 0.097 nm la temperatura de 60 °C, 2.76 ± 0.14 nm para 80 °C y 5.67 ± 0.099 nm para 90 °C. En todas las imágenes TEM se muestra un contraste, lo que sugiere que las nanopartículas se encuentran embebidas en una matriz, concordando con el espectro de FTIR y resultados reportados.

Por ejemplo, Arsiya et al. (2017) obtuvieron imágenes de TEM similares y complementaron con imágenes SEM, donde se visualizó que las nanopartículas estaban embebidas en una matriz. A través de FTIR, también infirieron que dicha matriz correspondía a componentes del extracto. Por otra parte, en el estudio de Yang et al., (2010), que reportó imágenes TEM con un contraste similar, utilizaron la técnica de XPS para analizar con mayor precisión la superficie de la muestra, encontrando elementos como el C, N y O, y atribuyéndolos a componentes de la biomasa. En contraste, en la síntesis por ablación láser, las imágenes TEM no presentan dichas características (Salman et al., 2023), por lo que puede inferirse que los componentes del extracto tienen una función de recubrimiento para las nanopartículas.

En cuanto al tamaño de las nanopartículas, no se mostró una tendencia a incrementar o disminuir según el aumento de la temperatura (Sathishkumar et al., 2009; Yang et al., 2010). No obstante, en la tabla 7 se resume el tamaño medio de nanopartícula, el potencial Z y el índice de polidispersión de acuerdo con la temperatura de síntesis. El potencial Z tomó valores de -32.1 y 30.2 mV para las temperaturas de 80 y 90 °C respectivamente, mientras que para la temperatura de 60 °C el valor de potencial Z fue de -19.5 mV, estos valores, en conjunto con el índice de polidispersión se relacionan con la estabilidad de la nanopartícula (Banu et al., 2023). El resultado apunta que se obtienen nanopartículas más estables con las temperaturas de 80 y 90 °C.



Figura 13. Imagen TEM de las nanopartículas de paladio sintetizadas a 60 °C

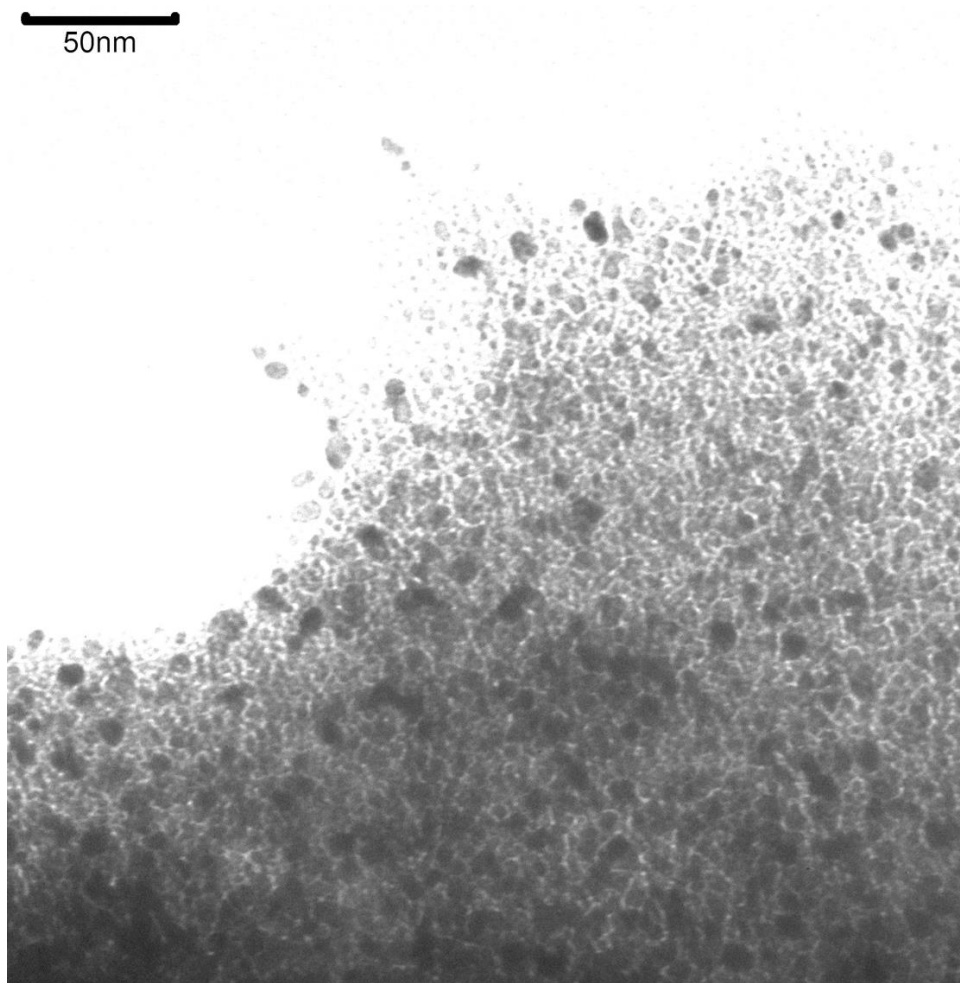


Figura 14. Imagen TEM de las nanopartículas de paladio sintetizadas a 80 °C.

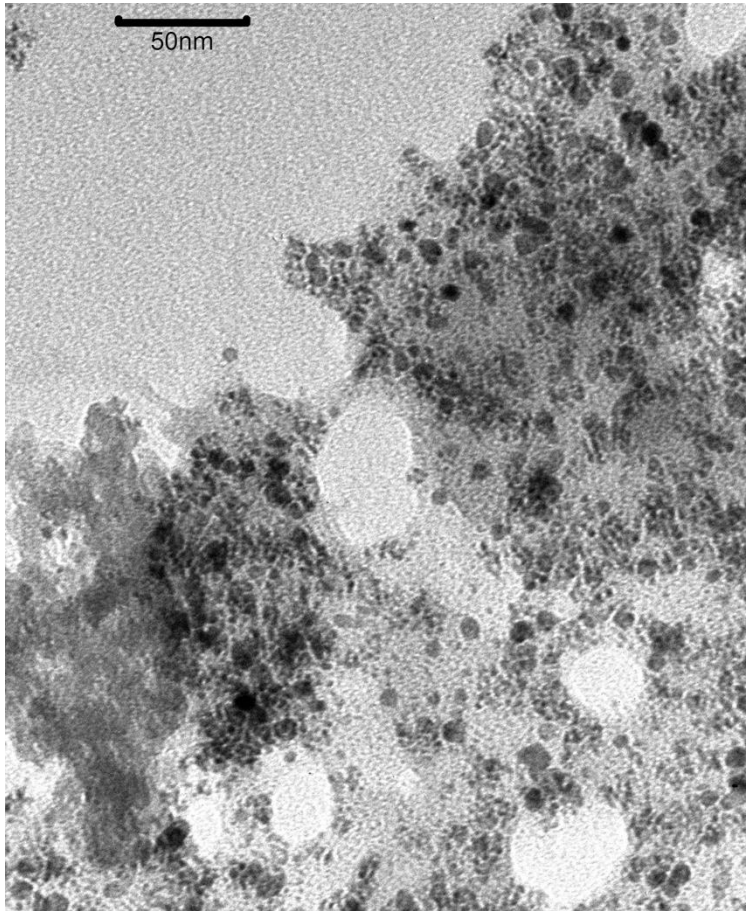


Figura 15. Imagen TEM de las nanopartículas de paladio sintetizadas a 90 °C.

Distribución de tamaño

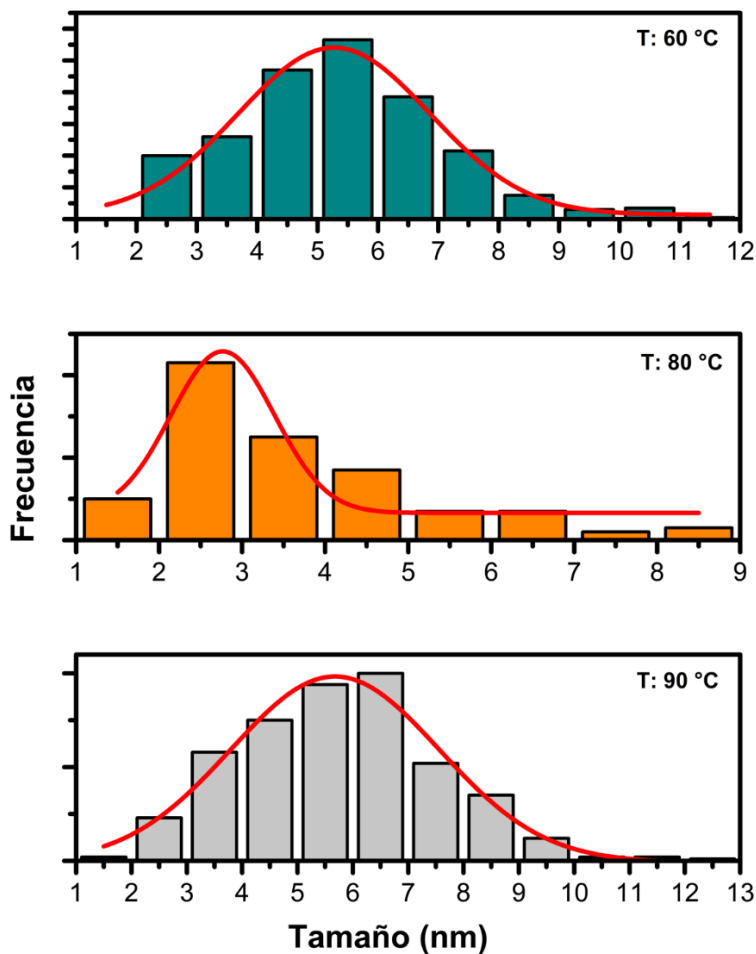


Figura 16. Distribución de tamaños de las nanopartículas de paladio sintetizadas a 60 °C, 80 °C y 90 °C.

Tabla 7. Tamaño medio de partículas, potencial Z e índice de polidispersión.

Variable	Tamaño medio	Error	Potencial Z	Índice de polidispersión
60 °C	5.27302 nm	0.09778	-19.5 mV	0.306
80 °C	2.76652 nm	0.14191	-32.1 mV	0.307
90 °C	5.67808 nm	0.09949	-30.2 mV	0.252

VII.4. Análisis bioinformático

VII.4.1. Preprocesamiento de datos genómicos de *D. salina* SQ

El preprocesamiento de datos es una parte importante en el análisis bioinformático ya que permite evaluar si es necesario realizar limpieza de los datos (Lantz et al., 2018).

La calidad de los datos genómicos se visualizó con el programa FASTQC, donde se ingresaron las lecturas forward y reverse de la secuenciación de *D. salina* SQ. En la figura 17 se presenta la información general de las lecturas, donde se observa que se tiene un total de secuencias de 190,095,303 de longitud de 100 pb para las lecturas forward y reverse; y la calidad de dichas lecturas se presentan en el gráfico de cajas y bigotes de la figura 18 y figura 19 respectivamente. El gráfico arroja información sobre la distribución de los datos según la posición y la calidad de las bases. La calidad de las bases se calcula por $Q = -10 \log_{10}P$, donde Q es la calidad de los datos y P es la probabilidad de que una base en una determinada posición sea incorrecta. La mediana (línea roja), y la media de las lecturas en cada posición (línea azul) tienen una calidad por encima de 30, lo que significa que la precisión del llamado de las bases es del 99.9% (Cacho et al., 2016). Se recomienda que las bases tengan una calidad igual o superior a 30 según Lantz et al. (2018), por lo que no fue necesario realizar limpieza de datos.

Lecturas forward		Lecturas reverse	
Measure	Value	Measure	Value
Filename	L1_R1.fastq.gz	Filename	L1_R2.fastq.gz
File type	Conventional base calls	File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9	Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	95047652	Total Sequences	95047651
Sequences flagged as poor quality	0	Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	100	Sequence length	100
%GC	46	%GC	46

Figura 17. Información de las secuencias obtenidas por FASTQC.

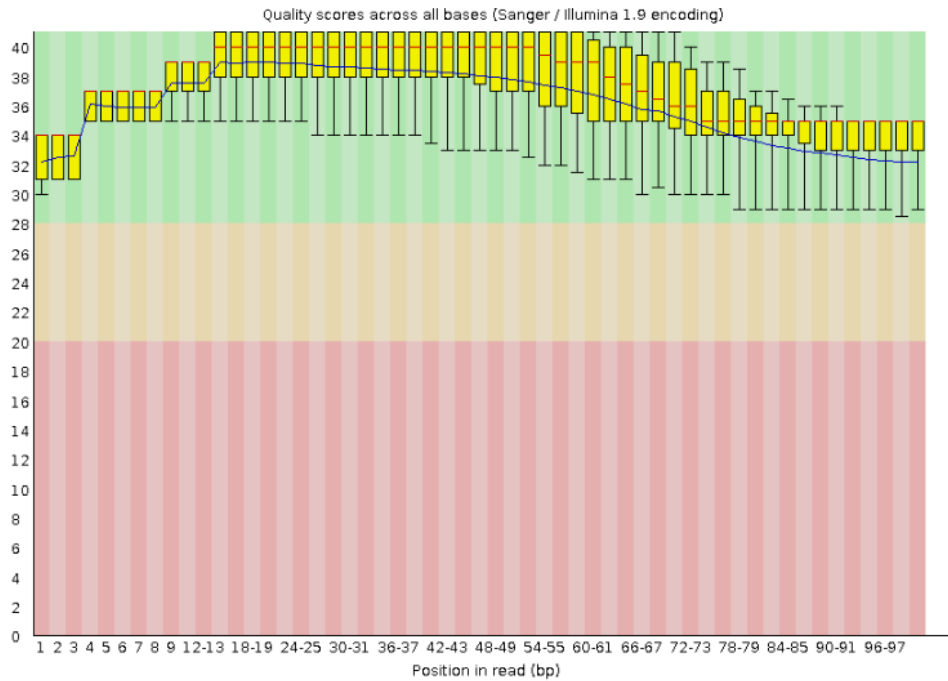


Figura 18. Gráfico de calidad de las bases (QS) de las lecturas foward.

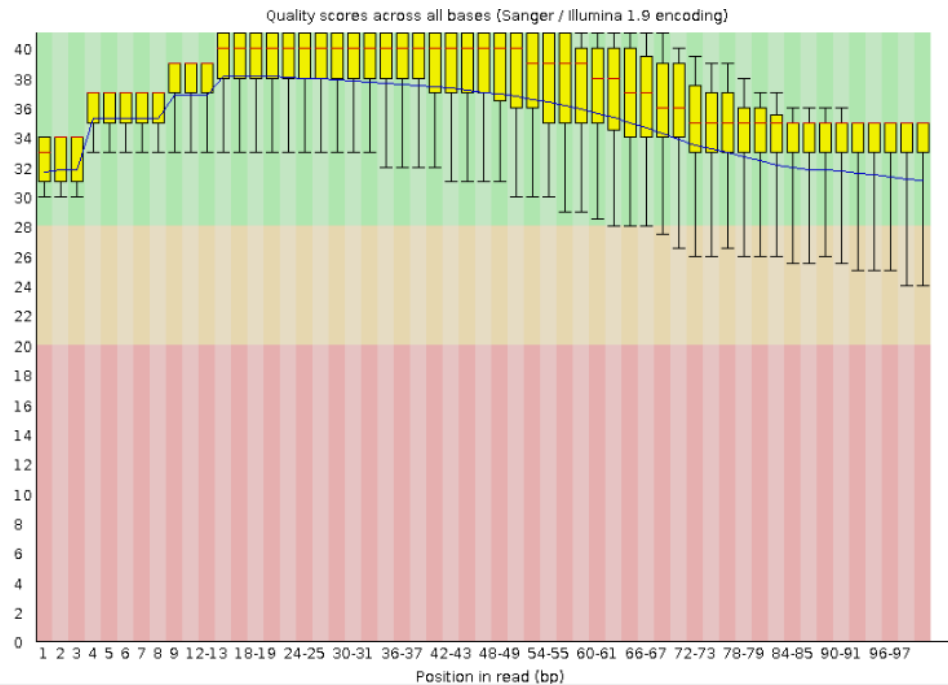


Figura 19. Gráfico de calidad de las bases (QS) de las lecturas reverse.

Por otro lado, en el artículo de Polle et al., (2017) estiman que el tamaño del genoma de la microalga *D. salina* es de 343.7 Mb, con los datos obtenidos por la secuenciación se cuenta con una cobertura de 55.3x, lo que indica que cada base del genoma de *D. salina* SQ se encuentra representado al menos 55 veces. En Sims et al. (2014) se recomienda una cobertura de al menos del 30x para generar ensamblajes de alta calidad, por lo tanto, se tiene suficiente información para generar los ensamblajes de referencia. Otro dato relevante es el porcentaje del contenido de GC, concordando con lo obtenido por Polle et al., (2017).

VII.4.2. Ensamble por referencia con Bowtie2

Después de realizar todos los ensamblajes con las secuencias de referencia de los distintos organismos especificados en la metodología, solo se obtuvieron alineamientos positivos con las secuencias CDS (región de codificación de proteína) de *D. salina* GYH13, *D. salina* YC y *D. bardawil*. Se lograron alineamientos exitosos en los siguientes casos: para *D. salina* GYH13, utilizando la secuencia de ARNm que codifica para la enzima PSY. En el caso de *D. bardawil*, con las secuencias de ARNm que codifican para las enzimas GGPPS, PSY y CRTLB. Para *D. salina* YC, empleando la secuencia de ARNm que codifica para la enzima GGPPS.

Los polimorfismos de nucleótido único (por sus siglas en inglés SNP) identificadas en las secuencias resultantes del alineamiento se presentan en las tablas0, Tabla 9 y Tabla 10, correspondientes a los organismos *D. salina* GYH13, *D. salina* YC y *D. bardawil*, respectivamente.

En la tabla 8 los cambios observados en la secuencia de PSY de *D. salina* GYH13 incluyen una mutación silenciosa, donde una base A cambia por una T en la posición 27, modificando el codón de CGA a CGT. Además, en la posición 1000, un cambio de G a C transforma el codón de GAG a CAG, alterando el aminoácido de glutamato a glutamina.

Tabla 8. Cambio de base, codón y aminoácido en la secuencia de la enzima PSY tomando como referencia secuencias del organismo *D. salina* GYH13.

Gen	Tipo de Secuencia	ID	Posiciones SNP	Cambio de base	Cambio de Codón	Cambio de AA	Tipo de aminoácido
PSY	mrna	MN732755.1	27	A-T	CGA-CGT	M-S	-
			1000	G-C	GAG-CAG	E-Q	Grupo R - Grupo R polar (neutro)

La tabla 9 resume las mutaciones en la secuencia de GGPPS de *D. salina* YC. Se observa un cambio de las bases G a T y A a T en las posiciones 355 y 357, respectivamente, alterando el codón de GAA a TAT y cambiando el aminoácido de glutamato a tirosina. En la posición 360, una sustitución de A por T modifica el codón de TTA a TTT, resultando en un cambio de leucina a fenilalanina. Otras mutaciones incluyen un cambio de GTC a TGC en las posiciones 361 y 362, cambiando valina por cisteína, y un cambio de G a C en la posición 365, alterando el codón de GGA a GCA y cambiando glicina por alanina. En la posición 660, una mutación de T a G en el codón GTT a GTG resulta en una mutación silenciosa.

Para *D. bardawil*, se comprobó que la secuencia de GGPPS es idéntica a la de *D. salina* YC, con un porcentaje de identidad del 100% en BLASTN, indicando conservación de la secuencia entre ambos organismos.

Tabla 9. Cambio de base, codón y aminoácido en la secuencia de la enzima GGPPS tomando como referencia secuencias del organismo *D. salina* YC.

Gen	Tipo de secuencia	ID	Posiciones SNP	Cambio de base	Cambio de codón	Cambio de AA	Tipo de AA
GGPPS	mrna	MN172173.1	355 357	G-T A-T	GAA - TAT	E-Y	Grupo R – Grupo R no polar (aromático)
			360	A-T	TTA-TTT	L-F	Grupo R no polar (alifático) Grupo R no polar (aromático)
			361 362	G-T T-G	GTC-TGC	V-C	Grupo R no polar (alifático) Grupo R polar (neutro)
			365	G-C	GGA-GCA	G-A	Grupo R no polar (alifático) Grupo R no polar (alifático)
			660	T-G	GTT-GTG	M.S	-

Las mutaciones en la secuencia que codifica para la enzima PSY de *D. bardawil* se detallan en la tabla 10. Cambios notables incluyen una mutación de C a T en la posición 492, cambiando el codón de TAC a TAT (mutación silenciosa), y en la posición 586, un cambio de G a A modifica el codón de GGC a AGC, alterando glicina por serina. En la posición 699, un cambio de A a G transforma el codón de ATA a ATG, cambiando isoleucina por metionina. Finalmente, en la posición 970, un cambio de G a C modifica el codón de GAG a CAG, resultando en el cambio de glutamato a glutamina.

Por último, para la enzima CRTLB, se observaron cambios de base de A por C y T por A en las posiciones 654 y 1206, respectivamente, resultando en mutaciones silenciosas (tabla 10).

Tabla 10. Cambio de base, codón y aminoácido en la secuencia de la enzima CRTLB, GGPPS y PSY tomando como referencia secuencias del organismo *D. bardawil*.

Gen	Tipo de secuencia	ID	Posiciones SNP	Cambio de base	Cambio de codón	Cambio de AA	Tipo de AA
CRTLB	mrna	KX218392.1	654	A-C	TCA-TCC	M-S	-
			1206	T-A	ACT-ACA	M-S	-
GGPPS	mrna	KX231795.1	355 357	G-T A-T	GAA-TAT	-	-
			360	A-T	TTA-TTT	L-F	Grupo R no polar (alifático) Grupo R no polar (aromático)
			361 362	G-T T-G	GTC-TGC	V-C	Grupo R no polar (alifático) Grupo R polar (neutro)
			365	G-C	GGA-GCA	G-A	Grupo R no polar (alifático) Grupo R no polar (alifático)
			660	T-G	GTT-GTG	M-S	-
PSY	mrna	EU328287.1	492	C-T	TAC-TAT	M-S	-
			586	G-A	GGC-AGC	G-S	Grupo R no polar (alifático) Grupo R polar (neutro)
			699	A-G	ATA-ATG	I-M	Grupo R no polar (alifático) Grupo R no polar (alifático)
			970	G-C	GAG-CAG	E-Q	Grupo R - Grupo R polar (neutro)

En las tablas tabla 11, tabla 12 y tabla 13 se presentan los datos sobre las características de las proteínas traducidas a partir de las secuencias obtenidas por el ensamble de referencia y las secuencias utilizadas como referencia. El objetivo de estas tablas es mostrar cómo las propiedades de estas proteínas varían en función de las mutaciones previamente discutidas.

La tabla 11 se muestra que no existen diferencias en las características de las proteínas traducidas desde la secuencia de referencia, lo que confirma que se trata de la misma secuencia de aminoácidos. A pesar de que las secuencias de CDS son idénticas, lo que resulta en 358 aminoácidos tanto en las proteínas de ensamble como en las de referencia, se observa que el peso molecular y el punto isoeléctrico es de 38,862.54 g/mol y 6.72 para la enzima de referencia y para la enzima hipotética es de 31,654.60 g/mol y 5.27. Estas discrepancias podrían estar relacionadas con mutaciones no silenciosas que implican cambios de aminoácidos. El punto isoeléctrico, que es determinado por la suma de las cargas de todos los aminoácidos a un pH específico, puede verse afectado por estos cambios (Tokmakov et al., 2021) y el peso molecular por la suma de las diferencias entre los pesos moleculares de sus aminoácidos. Estas diferencias están en el rango de variabilidad observados en estudios previos, como el detallado en (Feng et al., 2023), donde se analizaron 75 miembros de la familia GGPPS identificados en especies de algodón, encontrando pesos moleculares entre 14,371.5 y 46.093.3 g/mol, longitudes de cadena de aminoácidos entre 131 y 421 aminoácidos, y puntos isoeléctricos entre 4.22 y 7.84. En Liang et al., (2015) se menciona que la secuencia de aminoácidos para GGPPS es similar entre algas y planta, mostrando regiones conservadas ricas en aspartato, proponiéndolas como sitios de unión para el difosfato, lo cual está relacionado con su actividad catalítica.

Las variaciones observadas entre la proteína de referencia y su predicción podrían estar influenciadas por los gaps en las posiciones 70 - 185 y 299 – 353 (en la figura 20 y Figura 21 se visualizan los gaps en el ensamble). Para establecer la fiabilidad de estas variables, es importante identificar las partes faltantes de la secuencia.

Los resultados obtenidos para la enzima PSY están presentados en la tabla 12. Se observa que la longitud de aminoácidos de la enzima secuenciada de *D. salina* GYH13 es de 435, mientras que para *D. bardawil* es de 425. El peso molecular y el punto isoeléctrico de la enzima de referencia de *D. salina* GYH13 son 49,515.94 g/mol y 9.24, respectivamente; para la enzima ensamblada, estos valores son 48,507.80 g/mol y 9.40. La diferencia en el punto isoeléctrico y el peso molecular puede atribuirse al gap de los primeros 8 aminoácidos indeterminados, debido a la baja profundidad de alineamiento en las primeras 24 bases, como se muestra en la figura 22, además de un cambio de aminoácido de glutamato a glutamina en la posición 334 de la secuencia de aminoácidos.

Para *D. bardawil*, el peso molecular y el punto isoeléctrico de la enzima de referencia son 48,292.32 g/mol y 9.15, respectivamente, mientras que para la enzima ensamblada son 48,101.1 g/mol y 9.24. En este caso, se presentaron un mayor número de mutaciones no silenciosas, lo que podría explicar los cambios en estos parámetros. El ensamble también reveló un gap en los primeros cinco nucleótidos, visible en la figura 23.

En el estudio Shaker et al., (2021), se evaluaron 12 genes PSY del género *Dunaliella*, encontrando que los valores teóricos del punto isoeléctrico oscilan entre 8.41 y 9.65, valores cercanos a los obtenidos para la proteína hipotética analizada en este trabajo.

La tabla 13 presenta los resultados de la secuencia codificante para la enzima CRTLB. Según se observa en la figura 24, este gen no presenta gaps y solo tiene dos mutaciones silenciosas, lo que resulta en un alto porcentaje de identidad. Ambas proteínas consisten en 598 aminoácidos y comparten el mismo punto isoeléctrico, que es de 6.94. Se nota la diferencia entre sus pesos moleculares, esto puede estar relacionado a la falta de profundidad de cobertura de las primeras 4 bases, resultando en una falta en la definición de los primeros dos aminoácidos. Se reporta la caracterización de la enzima licopeno betaciclase en la microalga *Chlorella sorokiniana*, obteniendo 542 aminoácidos de longitud y un punto isoeléctrico de 8.91 (Fang et al., 2023). Por otro lado, pasando a lado de las frutas,

el punto isoeléctrico reportado por frutas de caqui fue de 8.32, con una longitud de aminoácidos de 504 (Cui et al., 2011), el punto isoeléctrico puede influir en la estabilidad y solubilidad de la enzima a diferentes condiciones de pH, por lo que la diferencia entre las proteínas de los diferentes organismos puede estar relacionadas a adaptaciones de entorno o diferentes compartimentos celulares (Tokmakov et al., 2021).

Tabla 11. Comparación de la secuencia consenso y la secuencia de referencia de la enzima Geranilgeranil pirofosfato sintasa

Geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS)	Referencia <i>D.salina</i> YC	Consenso <i>D. salina</i> YC	Referencia <i>D. bardawil</i>	Consenso <i>D. bardawil</i>
Número de aminoácidos	358	358	358	358
Peso molecular (g/mol)	38,862.54	31,654.60	38,862.54	31,654.60
pI	6.72	5.27	6.72	5.27

Tabla 12. Comparación de la secuencia consenso y la secuencia de referencia de la enzima Fitoeno sintasa

Fitoeno sintasa (PSY)	Referencia <i>D.salina</i> GYH13	Consenso <i>D.salina</i> GYH13	Referencia <i>D. bardawil</i>	Consenso <i>D. bardawil</i>
Número de aminoácidos	435	435	425	425
Peso molecular (g/mol)	49,515.94	48,507.80	48,292.32	48,101.1
pI	9.24	9.40	9.15	9.24

Tabla 13. Comparación de la secuencia consenso y la secuencia de referencia de la enzima licopeno betaciclasa

Licopeno betaciclasa (CRTL B)	Referencia <i>D. bardawil</i>	Consenso <i>D. bardawil</i>
Número de aminoácidos	598	598
Peso molecular (g/mol)	65664.51	65369.15
pI	6.94	6.94

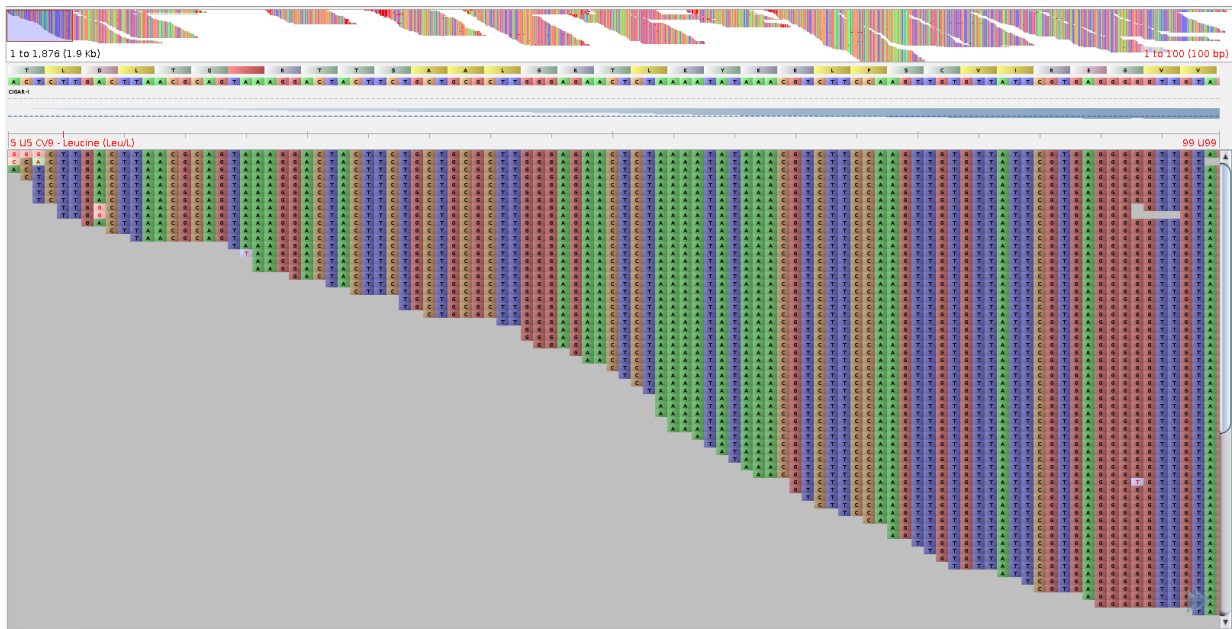


Figura 20. Visualización del alineamiento de la secuencia que codifica para la enzima GGPPS utilizando como referencia la secuencia de *D. salina* YC.

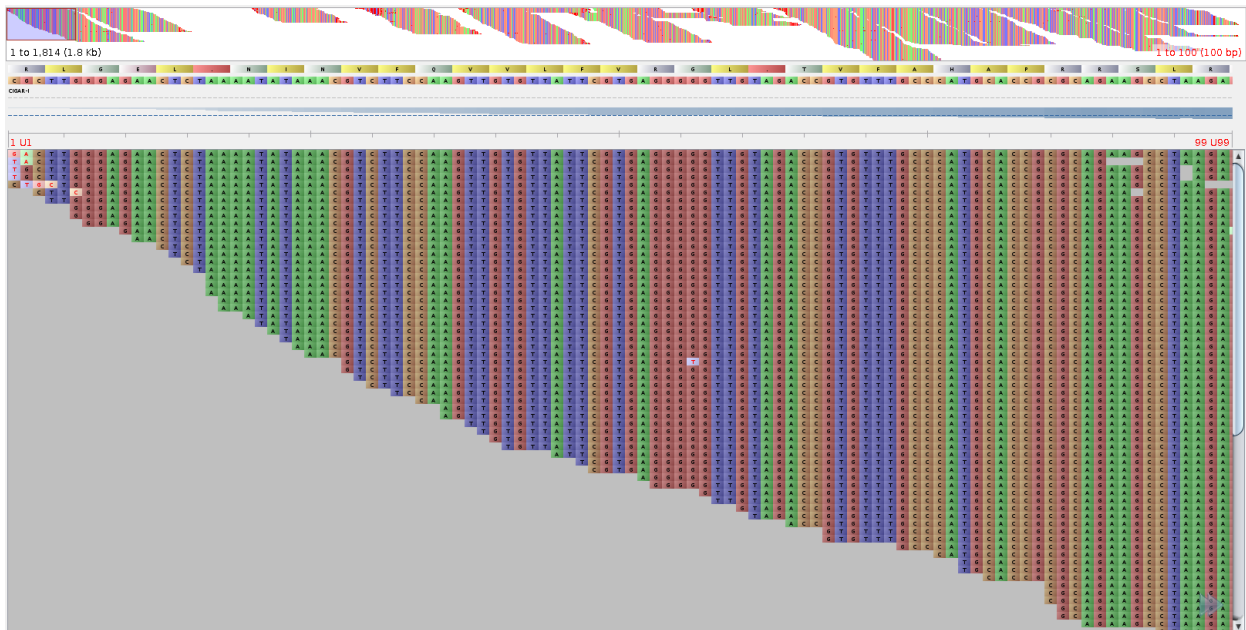


Figura 21. Visualización del alineamiento de la secuencia que codifica para la enzima GGPPS utilizando como referencia la secuencia de *D. bardawil*.

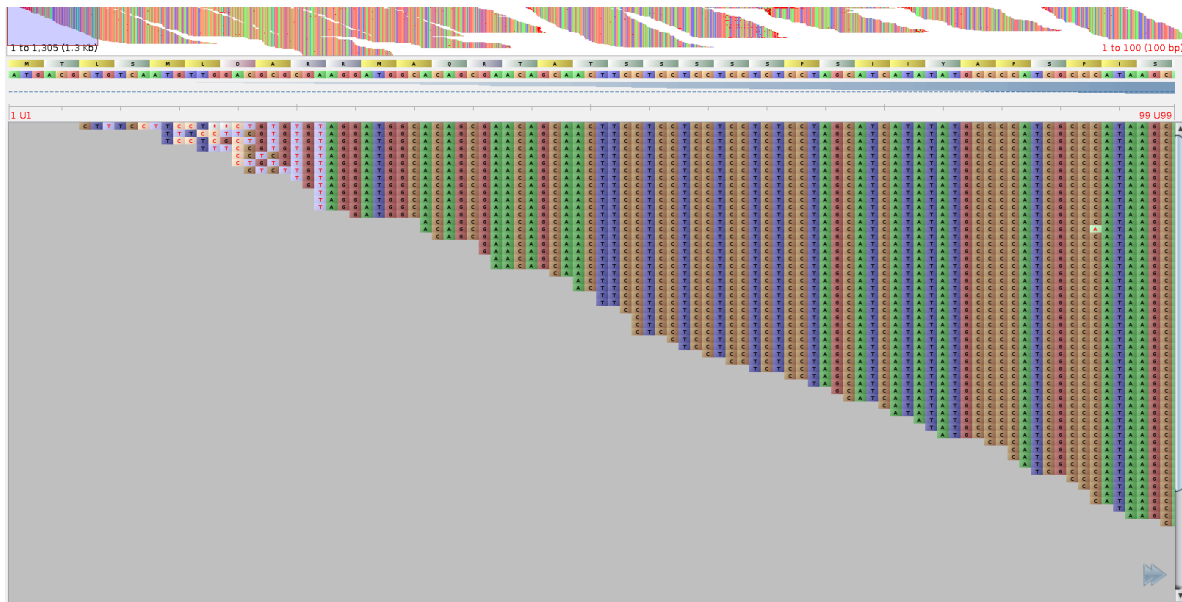


Figura 22. Visualización del alineamiento de la secuencia que codifica para la enzima PSY utilizando como referencia la secuencia de *D. salina* GYH13.

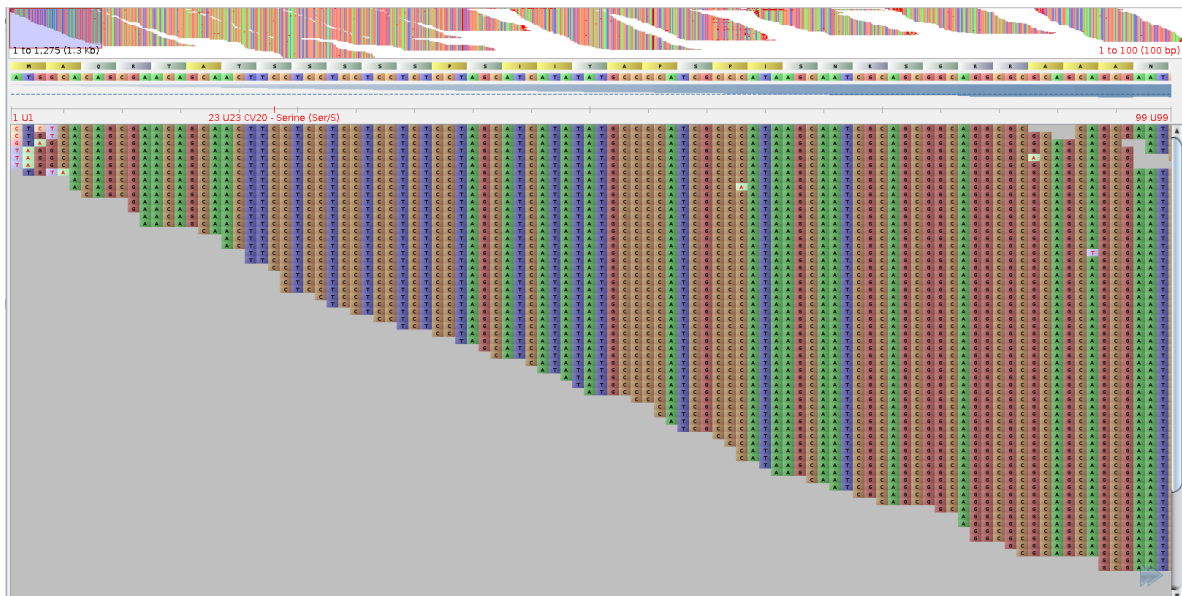


Figura 23. Visualización del alineamiento de la secuencia que codifica para la enzima PSY utilizando como referencia la secuencia de *D. bardawil*.

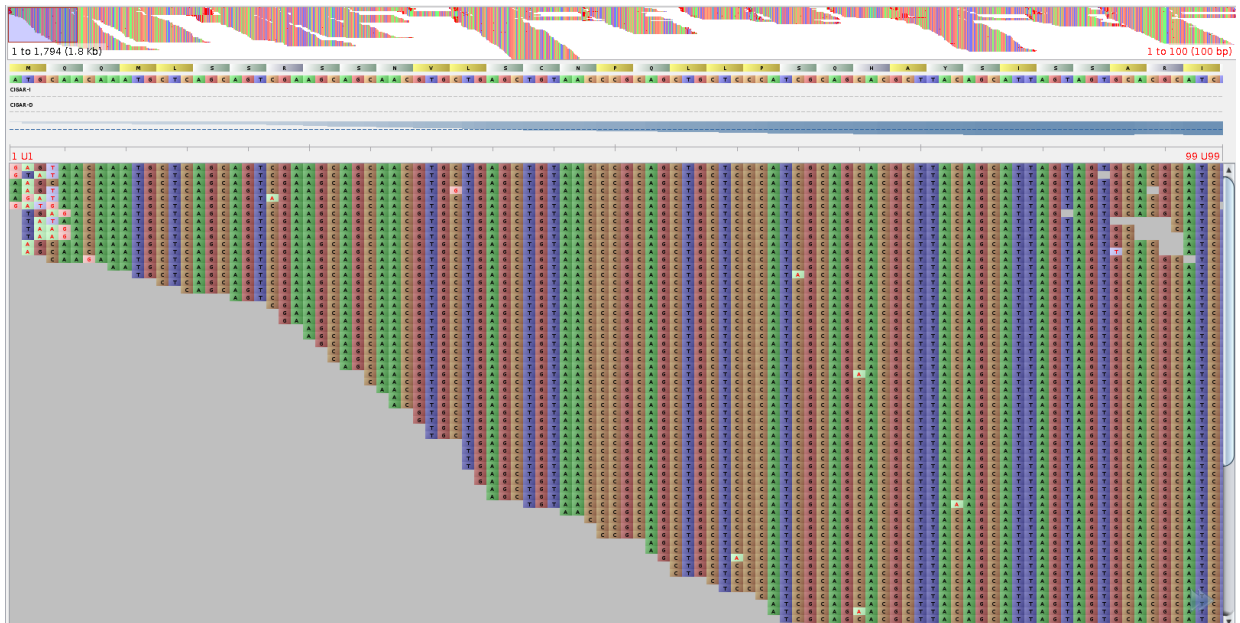


Figura 24. Visualización del alineamiento de la secuencia que codifica para la enzima CRTLB utilizando como referencia la secuencia de *D. bardawil*.

VIII. Conclusiones

Se logró sintetizar y caracterizar nanopartículas de paladio por medio de síntesis verde con el extracto de *D. salina* SQ. Las nanopartículas mostraron morfologías esféricas y tamaños uniformes. Las técnicas de caracterización de FTIR y TEM mostraron que las diferentes temperaturas en la síntesis no manifestaron diferencias relevantes en las características morfológicas y en los espectros de FTIR, sin embargo, los resultados de DLS sugieren que las nanopartículas sintetizadas a 80 y 90 °C son más estables que las sintetizadas a 60 °C.

Por otra parte, se consiguió el ensamble por referencia a nivel de ARNm de los genes GGPPS, PSY y CRTLB, los cuales codifican enzimas claves para la síntesis de betacaroteno, molécula de gran interés, ya que se infiere su participación como agente reductor y estabilizante en la síntesis de nanopartículas de paladio.

En el futuro, la combinación de las herramientas bioinformáticas para obtener información in silico sobre los organismos será de gran ayuda para su elección y aplicación en la síntesis verde de nanopartículas metálicas.

IX. Bibliografía

- Adams, C. P., Walker, K. A., Obare, S. O., & Docherty, K. M. (2014). Size-dependent antimicrobial effects of novel palladium nanoparticles. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085981>
- Adeyemi, J. O., & Fawole, O. A. (2023). Metal-Based Nanoparticles in Food Packaging and Coating Technologies: A Review. In *Biomolecules* (Vol. 13, Issue 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biom13071092>
- Alzharani, S., Astudillo-calderón, S., Pintos, B., Pérez-urria, E., Manzanera, J. A., Martín, L., & Gomez-garay, A. (2021). Role of synthetic plant extracts on the production of silver-derived nanoparticles. *Plants*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/plants10081671>
- Ambrogi, F., Coradini, D., Bassani, N., Boracchi, P., & Biganzoli, E. M. (2014). Bioinformatics and nanotechnologies: Nanomedicine. *Springer Handbook of Bio-/Neuroinformatics*, 517–532. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30574-0_32/FIGURES/4
- Arsiya, F., Sayadi, M. H., & Sobhani, S. (2017). Green synthesis of palladium nanoparticles using *Chlorella vulgaris*. In *Materials Letters* (Vol. 186, pp. 113–115). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.09.101>
- Banu, R., Bhagavanth Reddy, G., Ayodhya, D., Ramakrishna, D., & Kotu, G. M. (2023). Biogenic Pd-nanoparticles from *Lantana trifolia* seeds extract: Synthesis, characterization, and catalytic reduction of textile dyes. *Results in Chemistry*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100737>
- Barja, M. V., & Rodriguez-Concepcion, M. (2021). Plant geranylgeranyl diphosphate synthases: every (gene) family has a story. In *aBIOTECH* (Vol. 2, Issue 3, pp. 289–298). Springer. <https://doi.org/10.1007/s42994-021-00050-5>
- Basak, G. (2017). Antimicrobial activity of biostabilized palladium nanoparticles against bacterial pathogens. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* .

- Baum, C. (2021). *New approaches and concepts to study complex microbial communities*. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03531325>
- Bi, S., & Srivastava, R. (2024). Rosa damascena leaf extract mediated palladium nanoparticles and their anti-inflammatory and analgesic applications. *Inorganic Chemistry Communications*, 162. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2024.112122>
- Blatt, A., Bauch, M. E., Pörschke, Y., & Lohr, M. (2015). A lycopene β -cyclase/lycopene ϵ -cyclase/light-harvesting complex-fusion protein from the green alga *Ostreococcus lucimarinus* can be modified to produce α -carotene and β -carotene at different ratios. *Plant Journal*, 82(4), 582–595. <https://doi.org/10.1111/tpj.12826>
- Cacho, A., Smirnova, E., Huzurbazar, S., & Cui, X. (2016). A comparison of base-calling algorithms for illumina sequencing technology. *Briefings in Bioinformatics*, 17(5), 786–795. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv088>
- Cepoi, L., Zinicovscaia, I., Rudi, L., Chiriac, T., & Turchenko, V. (2022). Changes in the *Dunaliella salina* biomass composition during silver nanoparticles formation. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 7(1), 235–243. <https://doi.org/10.1007/s41204-022-00218-4>
- Chan, S. S., Low, S. S., Chew, K. W., Ling, T. C., Rinklebe, J., Juan, J. C., Ng, E. P., & Show, P. L. (2022). Prospects and environmental sustainability of phyconanotechnology: A review on algae-mediated metal nanoparticles synthesis and mechanism. In *Environmental Research* (Vol. 212). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113140>
- Chatterjee, S., & Bhattacharya, S. K. (2018). Size-Dependent Catalytic Activity and Fate of Palladium Nanoparticles in Suzuki-Miyaura Coupling Reactions. *ACS Omega*, 3(10), 12905–12913. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01598>
- Couso, I., Vila, M., Rodriguez, H., Vargas, M. A., & León, R. (2011). Overexpression of an exogenous phytoene synthase gene in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* leads to an increase in the content of carotenoids. *Biotechnology Progress*, 27(1), 54–60. <https://doi.org/10.1002/btpr.527>
- Cui, H., Wang, Y., & Qin, S. (2011). Molecular Evolution of Lycopene Cyclases Involved in the Formation of Carotenoids in Eukaryotic Algae. *Plant Molecular*

Biology Reporter, 29(4), 1013–1020. <https://doi.org/10.1007/s11105-011-0297-2>

- Ding, B. Y., Niu, J., Shang, F., Yang, L., Chang, T. Y., & Wang, J. J. (2019). Characterization of the Geranylgeranyl Diphosphate Synthase Gene in *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) and Its Association With Carotenoid Biosynthesis. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01398>
- Escorcia-Díaz, D., García-Mora, S., Rendón-Castrillón, L., Ramírez-Carmona, M., & Ocampo-López, C. (2023). Advancements in Nanoparticle Deposition Techniques for Diverse Substrates: A Review. In *Nanomaterials* (Vol. 13, Issue 18). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/nano13182586>
- Fang, H., Liu, J., Ma, R., Zou, Y., Ho, S. H., Chen, J., & Xie, Y. (2023). Functional Characterization of Lycopene β - and ϵ -Cyclases from a Lutein-Enriched Green Microalga *Chlorella sorokiniana* FZU60. *Marine Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md21070418>
- Félix-Castro, M. B., Arredondo-Vega, B. O., Rojas, M., & Gómez-Anduro, G. A. (2023). Synthesis of β -carotene in *Dunaliella*: From genome analysis to metabolic engineering. In *Algal Research* (Vol. 72). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103135>
- Feng, W., Mehari, T. G., Fang, H., Ji, M., Qu, Z., Jia, M., Wang, D., Ditta, A., Khan, M. K. R., Cao, Y., Wu, J., & Wang, B. (2023). Genome-wide identification of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPS) gene family involved in chlorophyll synthesis in cotton. *BMC Genomics*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09249-w>
- Fernández-Arias, M., Vilas, A. M., Boutinguiza, M., Rodríguez, D., Arias-González, F., Pou-Álvarez, P., Riveiro, A., Gil, J., & Pou, J. (2022). Palladium Nanoparticles Synthesized by Laser Ablation in Liquids for Antimicrobial Applications. *Nanomaterials*, 12(15). <https://doi.org/10.3390/nano12152621>
- Garole, V. J., Choudhary, B. C., Tetgure, S. R., Garole, D. J., & Borse, A. U. (2019). Palladium nanocatalyst: green synthesis, characterization, and catalytic

- application. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(12), 7885–7892. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2173-1>
- Gil, Y.-G., Kang, S., Chae, A., Kim, Y.-K., Min, D.-H., & Jang, H. (2018). Synthesis of porous Pd nanoparticles by therapeutic chaga extract for highly efficient tri-modal cancer treatment. *Nanoscale*, 10(42), 19810–19817. <https://doi.org/10.1039/C8NR07172A>
- Habibullah, G., Viktorova, J., & Ruml, T. (2021). Current Strategies for Noble Metal Nanoparticle Synthesis. In *Nanoscale Research Letters* (Vol. 16, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03480-8>
- Han, Y., Zheng, Q. S., Wei, Y. P., Chen, J., Liu, R., & Wan, H. J. (2015). In silico identification and analysis of phytoene synthase genes in plants. *Genetics and Molecular Research*, 14(3), 9412–9422. <https://doi.org/10.4238/2015.August.14.5>
- Hyršlova, I., Krausova, G., Mrvikova, I., Stankova, B., Branyik, T., Malinska, H., Huttli, M., Kana, A., & Dorskocil, I. (2022). Functional Properties of *Dunaliella salina* and Its Positive Effect on Probiotics. *Marine Drugs*, 20(12). <https://doi.org/10.3390/md20120781>
- Jacob, J. M., Ravindran, R., Narayanan, M., Samuel, S. M., Pugazhendhi, A., & Kumar, G. (2021). Microalgae: A prospective low cost green alternative for nanoparticle synthesis. In *Current Opinion in Environmental Science and Health* (Vol. 20). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.12.005>
- Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 53). Editions de Sante. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>
- Joudeh, N., Saragliadis, A., Koster, G., Mikheenko, P., & Linke, D. (2022). Synthesis methods and applications of palladium nanoparticles: A review. *Frontiers in Nanotechnology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fnano.2022.1062608>
- Khan, F., Shahid, A., Zhu, H., Wang, N., Javed, M. R., Ahmad, N., Xu, J., Alam, M. A., & Mehmood, M. A. (2022). Prospects of algae-based green synthesis of

- nanoparticles for environmental applications. *Chemosphere*, 293. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133571>
- Khan, F., Shariq, M., Asif, M., Siddiqui, M. A., Malan, P., & Ahmad, F. (2022). Green Nanotechnology: Plant-Mediated Nanoparticle Synthesis and Application. In *Nanomaterials* (Vol. 12, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nano12040673>
- Lan, Y., Song, Y., Guo, Y., Qiao, D., Cao, Y., & Xu, H. (2022). DsLCYB Directionally Modulated β -Carotene of the Green Alga *Dunaliella salina* under Red Light Stress. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(12), 1622–1631. <https://doi.org/10.4014/jmb.2208.08044>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lantz, H., Dominguez Del Angel, V., Hjerde, E., Sterck, L., Capella-Gutierrez, S., Notredame, C., Vinnere Pettersson, O., Amselem, J., Bouri, L., Bocs, S., Klopp, C., Gibrat, J. F., Vlasova, A., Leskosek, B. L., Soler, L., & Binzer-Panchal, M. (2018). Ten steps to get started in Genome Assembly and Annotation. *F1000Research*, 7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13598.1>
- Lao, Y. M., Xiao, L., Ye, Z. W., 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(16), 2201–2208. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr371>
- Li, S. N., Wang, R., & Ho, S. H. (2021). Algae-mediated biosystems for metallic nanoparticle production: From synthetic mechanisms to aquatic environmental applications. *Journal of Hazardous Materials*, 420. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126625>
- Liang, M. H., Liang, Y. J., Jin, H. H., & Jiang, J. G. (2015). Characterization and Functional Identification of a Gene Encoding Geranylgeranyl Diphosphate Synthase from *Dunaliella bardawil*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(35), 7805–7812. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02732>
- 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: Resources*, 2(1), 311–312.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1331331>
- Marslin, G., Siram, K., Maqbool, Q., Selvakesavan, R. K., Kruszka, D., Kachlicki, P., & Franklin, G. (2018). Secondary metabolites in the green synthesis of metallic nanoparticles. In *Materials* (Vol. 11, Issue 6). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ma11060940>
- Matsena, M. T., & Chirwa, E. M. N. (2021a). Comparative analysis of biological versus chemical synthesis of palladium nanoparticles for catalysis of chromium (VI) reduction. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96024-0>
- Matsena, M. T., & Chirwa, E. M. N. (2021b). Comparative analysis of biological versus chemical synthesis of palladium nanoparticles for catalysis of chromium (VI) reduction. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96024-0>
- Melanie Kappelmann-Fenzl. (2021). *Next Generation Sequencing and Data Analysis*. <http://www.springer.com/series/15430>
- Mishra, V., Arya, A., & Chundawat, T. S. (2019). High Catalytic Activity of Pd Nanoparticles Synthesized from Green Alga *Chlorella vulgaris* in Buchwald-hartwig Synthesis of N-Aryl Piperazines. *Current Organocatalysis*, 7(1), 23–33.
<https://doi.org/10.2174/2213337206666190515091945>
- Mohana, S., & Sumathi, S. (2020). Multi-Functional Biological Effects of Palladium Nanoparticles Synthesized Using *Agaricus bisporus*. *Journal of Cluster Science*, 31(2), 391–400. <https://doi.org/10.1007/s10876-019-01652-2>
- Momeni, S., & Nabipour, I. (2015). A Simple Green Synthesis of Palladium Nanoparticles with *Sargassum* Alga and Their Electrocatalytic Activities Towards Hydrogen Peroxide. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(7), 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1690-3>
- Moraes, L. C., Figueiredo, R. C., Ribeiro-Andrade, R., Pontes-Silva, A. V., Arantes, M. L., Giani, A., & Figueredo, C. C. (2021). High diversity of microalgae as a tool for the synthesis of different silver nanoparticles: A species-specific green

- synthesis. *Colloids and Interface Science Communications*, 42. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100420>
- Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Dadashi, J., & Ghafuri, H. (2020). Pd-based nanoparticles: Plant-assisted biosynthesis, characterization, mechanism, stability, catalytic and antimicrobial activities. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 276). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102103>
- Ndaba, B., Roopnarain, A., Rama, H., & Maaza, M. (2022). Biosynthesized metallic nanoparticles as fertilizers: An emerging precision agriculture strategy. In *Journal of Integrative Agriculture* (Vol. 21, Issue 5, pp. 1225–1242). Editorial Department of Scientia Agricultura Sinica. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(21\)63751-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(21)63751-6)
- Polle, J. E. W., Barry, K., Cushman, J., Schmutz, J., Tran, D., Hathwaik, L. T., Yim, W. C., Jenkins, J., McKie-Krisberg, Z., Prochnik, S., Lindquist, E., Dockter, R. B., Adam, C., Molina, H., Bunkenborg, J., Jin, E. S., Buchheim, M., & Magnuson, J. (2017). Draft nuclear genome sequence of the halophilic and beta-carotene-accumulating green alga *Dunaliella salina* strain CCAP19/18. In *Genome Announcements* (Vol. 5, Issue 43). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01105-17>
- Polle, J. E. W., Jin, E. S., & Ben-Amotz, A. (2020). The alga *Dunaliella* revisited: Looking back and moving forward with model and production organisms. In *Algal Research* (Vol. 49). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101948>
- Preetha, K., John, L., Subin, C. S., & Vijayan, K. K. (2012). Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian salinas and their diversity. *Aquatic Biosystems*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-27>
- Rafi Shaik, M., Ali, Z. J. Q., Khan, M., Kuniyil, M., Assal, M. E., Alkathlan, H. Z., Al-Warthan, A., Siddiqui, M. R. H., Khan, M., & Adil, S. F. (2017). Green synthesis and characterization of palladium nanoparticles using *origanum vulgare* L. extract and their catalytic activity. *Molecules*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/molecules22010165>

- Rusmawanto, R., Prajitno, A., & Yuniarti, A. (2019). Minimum Inhibitory Concentration of Marine Microalgae *Dunaliella salina* on Fish Pathogenic Bacteria *Edwardsiella tarda*. *Research Journal of Life Science*, *6*(2), 72–82. <https://doi.org/10.21776/ub.rjls.2019.006.02.1>
- S, S., M, P., KK, U., MS, V. Das, S, N., K, G., & A, M. (2023). Bioynthesis of silver nanoparticles using *Dunaliella salina* and its antibacterial applications. *Applied Surface Science Advances*, *13*. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2023.100377>
- Safavi, A., Maleki, N., & Doroodmand, M. M. (2012). Comparative investigation of chemical vapor deposition of palladium nanoparticles on different carbon substrates. *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*, *20*(1), 56–71. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2010.533301>
- Salman, S. H., Khashan, K. S., & Hadi, A. A. (2023). Green Synthesis and Characterization of Palladium Nanoparticles by Pulsed Laser Ablation and Their Antibacterial Activity. *Metals*, *13*(2). <https://doi.org/10.3390/met13020273>
- Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. In *Biology* (Vol. 12, Issue 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biology12070997>
- Sathishkumar, M., Sneha, K., Kwak, I. S., Mao, J., Tripathy, S. J., & Yun, Y. S. (2009). Phyto-crystallization of palladium through reduction process using *Cinnamom zeylanicum* bark extract. *Journal of Hazardous Materials*, *171*(1–3), 400–404. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.014>
- Sayadi, M. H., Salmani, N., Heidari, A., & Rezaei, M. R. (2018). Bio-synthesis of palladium nanoparticle using *Spirulina platensis* alga extract and its application as adsorbent. *Surfaces and Interfaces*, *10*, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2018.01.002>
- Sedjati, S., Santosa, G. W., Yudiati, E., Supriyantini, E., Ridlo, A., & Kimberly, F. D. (2019). Chlorophyll and Carotenoid Content of *Dunaliella salina* at Various Salinity Stress and Harvesting Time. *IOP Conference Series: Earth and*

Environmental Science, 246(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/246/1/012025>

- Seku, K., Pejjai, B., Osman, A. I., Hussaini, S. S., Al Abri, M., Kumar, N. S., Vijaya Kumar, N. S., Reddy, S. S. K., Sadasivuni, K. K., Al Fatesh, A. S., & Reddy, B. (2024). Ecofriendly synthesis of Salmalia Malabarica gum stabilized palladium nanoparticles: antibacterial and catalytic properties. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-024-05443-2>
- Shaker, S., Morowvat, M. H., & Ghasemi, Y. (2021). Bioinformatics Analysis and Identification of Phytoene Synthase Gene in Microalgae. *Recent Patents on Biotechnology*, 15(3), 216–226. <https://doi.org/10.2174/1872208315666210712121951>
- Shang, C., Xu, X., Yuan, Z., Wang, Z., Hu, L., Alam, M. A., & Xie, J. (2016). Cloning and differential expression analysis of geranylgeranyl diphosphate synthase gene from *dunaliella parva*. *Journal of Applied Phycology*, 28(4), 2397–2405. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0767-2>
- Sharmila, G., Farzana Fathima, M., Haries, S., Geetha, S., Manoj Kumar, N., & Muthukumaran, C. (2017). Green synthesis, characterization and antibacterial efficacy of palladium nanoparticles synthesized using *Filicium decipiens* leaf extract. *Journal of Molecular Structure*, 1138, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.02.097>
- Sharmila, G., Haries, S., Farzana Fathima, M., Geetha, S., Manoj Kumar, N., & Muthukumaran, C. (2017). Enhanced catalytic and antibacterial activities of phytosynthesized palladium nanoparticles using *Santalum album* leaf extract. *Powder Technology*, 320, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.07.026>
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. In *Nature Biotechnology* (Vol. 26, Issue 10, pp. 1135–1145). <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
- Shyam, A., Chandran S., S., George, B., & Sreelekha, E. (2020). Plant mediated synthesis of AgNPs and its applications: an overview. In *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*. <https://doi.org/10.1080/24701556.2020.1852254>

- Sims, D., Sudbery, I., Illott, N. E., Heger, A., & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: Key considerations in genomic analyses. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 15, Issue 2, pp. 121–132). <https://doi.org/10.1038/nrg3642>
- Singh, A. K., Tiwari, R., Singh, V. K., Singh, P., Khadim, S. R., Singh, U., Laxmi, Srivastava, V., Hasan, S. H., & Asthana, R. K. (2019). Green synthesis of gold nanoparticles from *Dunaliella salina*, its characterization and in vitro anticancer activity on breast cancer cell line. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.023>
- Siqueiros, F. (2017). *Caracterización de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la bioacumulación de beta-carotena en Dunaliella salina y Dunaliella bardawil*.
- Sobczak, K., Kozłowski, M., & Czerwosz, E. (2017). The influence of substrate on size of Pd nanoparticles in C–Pd composites obtained in the PVD and CVD processes. *Acta Physica Polonica A*, 131(5), 1413–1416. <https://doi.org/10.12693/APHYSPOLA.131.1413>
- Sonbol, H., Ameen, F., AlYahya, S., Almansob, A., & Alwakeel, S. (2021). Padina boryana mediated green synthesis of crystalline palladium nanoparticles as potential nanodrug against multidrug resistant bacteria and cancer cells. *Scientific Reports*, 11(1), 5444. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84794-6>
- Szczyglewska, P., Feliczak-Guzik, A., & Nowak, I. (2023). Nanotechnology–General Aspects: A Chemical Reduction Approach to the Synthesis of Nanoparticles. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 13). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/molecules28134932>
- Tahir, K., Nazir, S., Li, B., Ahmad, A., Nasir, T., Khan, A. U., Shah, S. A. A., Khan, Z. U. H., Yasin, G., & Hameed, M. U. (2016). Sapium sebiferum leaf extract mediated synthesis of palladium nanoparticles and in vitro investigation of their bacterial and photocatalytic activities. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 164, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.09.030>

- Tanreh, S., Hallajian, S., Hamedani, Y. P., Nazari, P., Darvishi, K., & Hekmati, M. (2018). Green Synthesis of Pd Nanoparticles Mediated by *Thymbra Spicata* Leaves Extract and Its Application as a Recyclable Nanocatalyst for Reduction of 4-Nitrophenol and Suzuki Reactions. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 28(3), 1001–1010. <https://doi.org/10.1007/s10904-017-0775-6>
- Tokmakov, A. A., Kurotani, A., & Sato, K. I. (2021). Protein pl and Intracellular Localization. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.775736>
- 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(3), 723–729. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0866-2>
- Ullah, S., Ahmad, A., Khan, A., Zhang, J., Raza, M., Rahman, A. ur, Tariq, M., Ali khan, U., Zada, S., & Yuan, Q. (2018). Palladium nanoparticles synthesis, characterization using glucosamine as the reductant and stabilizing agent to explore their antibacterial & catalytic applications. *Microbial Pathogenesis*, 125, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.020>
- Uzair, B., Liaqat, A., Iqbal, H., Mena, B., Razzaq, A., Thiripuranathar, G., Rana, N. F., & Mena, F. (2020). Green and cost-effective synthesis of metallic nanoparticles by algae: Safe methods for translational medicine. In *Bioengineering* (Vol. 7, Issue 4, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040129>
- Valencia-Yañez, R., Giffard-Mena, I., Cruz-lópez, R., García-Mendoza, E., & Stephano-Hornedo, J. (2018). *CharaCterization of a new Dunalliela salina strain isolated from san Quintin, Baja California (méxiCo) produCer of lipids, pigments and miCronutrients*. <https://utex.org/>
- Vanlalveni, C., Lallianrawna, S., Biswas, A., Selvaraj, M., Changmai, B., & Rokhum, S. L. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: a review of recent literature. In *RSC Advances* (Vol.

- 11, Issue 5, pp. 2804–2837). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0ra09941d>
- Vellaisamy, K., Govindasamy, C., Khan, M. I., Ganesan, V., Narayanan, V., Shanmugasundram, E., Velmurugan, A., Rajamohan, R., & Thambusamy, S. (2023). Eco-friendly production of palladium-modified γ -cyclodextrin and its methyl cinnamate inclusion complex: Catalyst for reduction and antibacterial properties. *Materials Today Communications*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.107367>
- Vishnukumar, P., Vivekanandhan, S., & Muthuramkumar, S. (2017). Plant-Mediated Biogenic Synthesis of Palladium Nanoparticles: Recent Trends and Emerging Opportunities. In *ChemBioEng Reviews* (Vol. 4, Issue 1, pp. 18–36). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/cben.201600017>
- Wang, Y., Hu, F., Chen, Y., Wang, H., Fetohi, A. E., Hao, Y., Li, L., El-Khatib, K. M., & Peng, S. (2022). Ligand and temperature effects of porous palladium nanoparticle ensembles with grain boundaries for highly efficient electrocatalytic CO₂ reduction. *Journal of Materials Science*, 57(14), 7276–7289. <https://doi.org/10.1007/s10853-022-07107-w>
- 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*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1466–1469. <https://doi.org/10.1021/jf048358s>
- Yang, X., Li, Q., Wang, H., Huang, J., Lin, L., Wang, W., Sun, D., Su, Y., Opiyo, J. B., Hong, L., Wang, Y., He, N., & Jia, L. (2010). Green synthesis of palladium nanoparticles using broth of *Cinnamomum camphora* leaf. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1589–1598. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9675-1>
- Ying, S., Guan, Z., Ofoegbu, P. C., Clubb, P., Rico, C., He, F., & Hong, J. (2022). Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. In *Environmental Technology and Innovation* (Vol. 26). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102336>

- Zhang, S. Y., & Liu, S. L. (2013). Bioinformatics. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 338–340. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00155-8>
- Zhou, W., Yang, R., Yu, S., Yuan, C., & Liu, J. (2023). Comparative study on the toxicity of biosynthesized and chemically synthesized gold nanoparticles. *Chemical Papers*, 77(4), 1999–2007. <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02602-5>
- Zhu, Q. L., Zheng, J. L., & Liu, J. (2020). Transcription activation of β -carotene biosynthetic genes at the initial stage of stresses as an indicator of the increased β -carotene accumulation in isolated *Dunaliella salina* strain GY-H13. *Aquatic Toxicology*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105472>

