

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño



Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Ingeniero en Nanotecnología

**“Nanopartículas por síntesis verde: Pruebas de actividad antimicrobiana
de nanopartículas de plata (AgNP’s) sintetizadas con diferentes
concentraciones de extracto de la microalga Dunaliella salina SQ”**

Presenta

Joselyn Andrea Macias Ceja

Directora de tesis

Dra. Haydeé López Rodríguez

Codirector de tesis

Dr. Guillermo Amaya Parra

Ensenada, Baja California. Mayo de 2024



“Nanopartículas por síntesis verde: Pruebas de actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata (AgNP’s) sintetizadas con diferentes concentraciones de extracto de la microalga *Dunaliella salina* SQ”

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOSELYN ANDREA MACIAS CEJA
1271568

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

DRA. HAYDEE LÓPEZ
RODRÍGUEZ
DIRECTOR

DR. GUILLERMO AMAYA
PARRA
CODIRECTOR

DR. FRANKLIN DAVID
MUÑOZ MUÑOZ
SINODAL

DR. JORGE OCTAVIO
MATA RAMIREZ
SINODAL

DR. OSCAR GONZÁLEZ
DAVIS
SINODAL

“Por la Realización Plena del Ser”

Resumen

Los subproductos tóxicos, el uso de costoso equipo y mezcla de distintos compuestos químicos para la síntesis de AgNP's que involucran los métodos convencionales, ha llevado al desarrollo de síntesis de AgNP's mediante el uso de microorganismos, llamada síntesis verde. Existen lagunas de conocimiento dentro del campo de la síntesis verde, sobre todo cuando se trata del uso de microalgas. Estas, además de tener la capacidad de crecer en ambientes extremos, tienen la capacidad de producir en mayor concentración compuestos bioactivos que logran la síntesis y estabilidad de las AgNP's sin la necesidad de añadir compuestos extras. Es por ello, que en el presente trabajo se realizó la síntesis verde de AgNP's con el uso del extracto de biomasa (EB) de la microalga *Dunaliella salina* SQ. Se analizaron los extractos de biomasa (EB) obtenidos de cultivos de *D. salina* a distintos tiempo de crecimiento (9, 15 y 30 días) mediante la técnica UV-Vis, con el análisis de los datos se determinó como 15 días el tiempo de crecimiento óptimo para la obtención de un buen rendimiento de EB. Asimismo, con el cultivo de 15 días seleccionado (C15) se realizaron síntesis de AgNP's a concentraciones de 5%, 10% y 20% de EB. Las AgNP's obtenidas fueron analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión dinámica de la luz (DLS). Mostraron un tamaño promedio de 81 y 86 nm respectivamente, descartando la última síntesis por incongruencias en resultados. Las AgNP's al 5% de EB-C15 mostraron una excelente estabilidad (p. zeta: -24.3mV) y una eficiente actividad antimicrobiana contra *E. coli* en comparación con las síntesis al 10 y 20% de EB-C15 que presentaron nula actividad antimicrobiana.

Palabras clave: *Nanopartículas de plata, Dunaliella salina, síntesis verde, actividad antimicrobiana, nanotecnología.*

Abstract

Toxic by-products, the use of expensive equipment and mixing of different chemical compounds for AgNP's synthesis that involve conventional methods, has led to the development of AgNP's synthesis using microorganisms, called green synthesis. There are knowledge gaps within the field of green synthesis, especially when it comes to the use of microalgae. These, besides having the ability to grow in extreme environments, have the capacity to produce in higher concentration bioactive compounds that achieve the synthesis and stability of AgNP's without the need of extra compounds. Therefore, in the present work the green synthesis of AgNP's was achieved with the use of the biomass extract (EB) of the microalga *Dunaliella salina*. Biomass extracts (EB) obtained from *D. salina* cultures at different growth times (9, 15 and 30 days) were analyzed by UV-Vis technique, with the analysis of the data was determined as 15 days the optimal growth time for obtaining a good yield of BE. Likewise, with the 15-day culture selected (C15), AgNP's synthesis was carried out at concentrations of 5, 10 and 20% of EB. The AgNP's obtained were analyzed by transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS). They showed an average size of 81 and 86 nm respectively, discarding the last synthesis due to inconsistencies in results. AgNP's at 5% EB-C15 showed excellent stability (p. zeta: -24.3mV) and efficient antimicrobial activity against *E. coli* compared to syntheses at 10% and 20% EB-C15 which showed no antimicrobial activity.

Keywords: *Silver nanoparticles, Dunaliella salina, green synthesis, antimicrobial activity, nanotechnology.*

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Haydee López Rodríguez, mi directora de tesis, por su inquebrantable apoyo, tutoría y confianza para la realización de este trabajo. Su guía y dedicación han sido fundamentales para el desarrollo y culminación de esta investigación.

Al Dr. Guillermo Amaya Parra, mi codirector de tesis, por su valioso apoyo durante la realización de este trabajo y por todas las veces que me brindó su ayuda a lo largo de mi carrera universitaria. Su compromiso y asesoramiento han sido esenciales para mi formación académica y profesional.

Al comité sinodal conformado por el Dr. Franklin David Muñoz Muñoz, Dr. Jorge Octavio Mata Ramirez y el Dr. Oscar González Davis por su tiempo y dedicación en la revisión de mi trabajo, contribuyendo a la calidad de esta investigación.

A la Dra. Socorro Jiménez Valera, por la confianza y mentoría que me otorgó al inicio de la carrera. Las bases y conocimientos adquiridos en ese período fueron de gran ayuda para la realización de este trabajo.

Índice de contenido

1. Introducción	1
1.1 Nanotecnología	1
1.2 Nanopartículas de plata	2
1.4 Métodos convencionales de síntesis para NP metálicas	2
1.5 Síntesis verde	5
1.6 Microalgas y su uso en síntesis verde	6
1.6.1 <i>Dunaliella salina</i>	6
1.7 Propiedades antimicrobianas en nanopartículas	7
2. Antecedentes	10
3. Justificación	14
4. Hipótesis	16
5. Objetivos de la Investigación	16
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivos específicos	16
6. Metodología	17
6. 1 Cultivo de <i>Dunaliella salina</i>	17
6.2 Obtención de Extracto de <i>D. Salina</i>	18
6.3 Síntesis de Nanopartículas de plata.	19
6.4 Lavado de nanopartículas de plata	20
6.5 Pesaje y preparación de soluciones	20
6.6 Caracterización de las nanopartículas de plata	21
6.7 Pruebas de actividad antimicrobiana	21
7. Resultados y discusión	23
7.1 Tiempo de cultivo y rendimiento de síntesis	23
7.2 Tiempo de síntesis	25
7.3 Concentración del extracto de biomasa	26
7.4 Caracterización de AgNP's	28
7.4.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	28
7.4.2 Dispersión dinámica de la luz (DLS)	29
7.5 Actividad antimicrobiana	34
8. Conclusiones	37
9. Referencias	38

Índice de figuras

Figura 1. Nanotecnología y sus distintos campos de aplicación. Adaptado de [2].	1
Figura 2. Representación de los métodos de síntesis Top-Down y Bottom-up para la síntesis de nanomateriales. Adaptado de [10].	5
Figura 3. Cultivos de <i>Dunaliella salina</i> en medio Johnson modificado bajo luz artificial a distintos días de crecimiento. Se pueden observar diferencias en la coloración de los cultivos debido a las diferentes concentraciones celulares de microalga en el medio.	18
Figura 4. Representación esquemática del proceso de obtención del extracto de biomasa del cultivo de <i>Dunaliella salina</i> .	19
Figura 5. Representación esquemática del proceso de síntesis de AgNP's bajo luz artificial y agitación magnética constante.	20
Figura 6. Representación esquemática del proceso de lavado de AgNP's.	20
Figura 7. Representación esquemática del proceso de pesado de AgNP's y preparación de soluciones homogéneas.	21
Figura 8. Espectro UV-Vis de AgNP's obtenidas mediante síntesis verde con cultivos a distintos tiempos de crecimiento. Refiriéndose a C9, C15 y C30 a 9, 15 y 30 días de crecimiento respectivamente. La síntesis se llevó a cabo durante 1 hora.	24
Figura 9. Proceso de síntesis de AgNP's. a) AgNO ₃ 4mM sin biomasa añadida. b) Inicio de síntesis (0 min). AgNO ₃ 4mM con biomasa de C15 al 10% con exposición a luz artificial y agitación magnética constante. c) Finalización de síntesis transcurridos 60 minutos.	25
Figura 10. Espectros UV-Vis de la síntesis verde de AgNP's durante 1 hora. a) Síntesis realizada con EB-C15 al 5% durante 1 hora. b) Síntesis realizada con el EB-C15 al 20% durante 1 hora.	26
Figura 11. Espectro UV-Vis de las soluciones finales de síntesis verdes de AgNP's realizadas a las concentraciones de 5%, 10% y 20% de EB-C15 durante 1 hora.	27
Figura 12. Imágenes TEM a distintas magnificaciones de las AgNP's. A,B) AgNP's obtenidas por síntesis verde con EB-C9 al 10%. C,D) AgNP's obtenidas por síntesis verde con EB-C15 al 10%. E,F) AgNP's obtenidas por síntesis verde con EB-C30 al 10%.	29
Figura 13. Espectro DLS de la distribución del tamaño por número de partículas a diferentes dimensiones. A) Espectro correspondiente a AgNP's obtenidas con EB-C9 al 10%. B) Espectro correspondiente a AgNP's obtenidas con EB-C15 al 10%. C) Espectro correspondiente a AgNP's obtenidas con EB-C30 al 10%.	31
Figura 14. Espectro DLS de la distribución del tamaño de las AgNP's por número de partículas presentes en diferentes dimensiones sintetizadas con EB-C15 al A) 5%, B) 10% y C) 20%.	33

Figura 15. Actividad antibacteriana de AgNP's obtenidas por síntesis verde con EB-C15 de *Dunaliella salina* al A)5%, B)10% y C)20% contra *E. Coli*. 35

Índice de tablas

Tabla 1. Métodos Top-Down para la síntesis de nanopartículas metálicas y sus desventajas. Adaptado de [10]	3
Tabla 2. Métodos Bottom-up para la síntesis de nanopartículas metálicas y sus desventajas. Adaptado de [10].	4
Tabla 3. Propiedades de la bacteria y su relación con la susceptibilidad ante nanopartículas. Adaptado de [24].	8
Tabla 4. Componentes presentes en el Medio Johnson Modificado. Adaptado de [52].	17
Tabla 5. Síntesis realizadas variando el tiempo de cultivo de <i>Dunaliella salina</i> .	19
Tabla 6. Composición de Mueller Hinton Agar (MHA)	22
Tabla 7. Distribución de ensayos de la actividad antimicrobiana de las AgNP's.	22
Tabla 8. Cuantificación del rendimiento en peso de biomasa obtenido en gramos de los distintos cultivos.	23
Tabla 9. Cuantificación en gramos del rendimiento de síntesis verde con el uso de EB de los 3 distintos cultivos (C9, C15 y C30).	24

1. Introducción

1.1 Nanotecnología

La nanotecnología es una disciplina tecnológica emergente que se encarga del estudio, manipulación e implementación de materiales que cuentan con al menos una de sus dimensiones igual o menor a los 100 nm (10^{-9} m). Esto con el fin de aprovechar los efectos únicos que suceden a esta escala y la potencialización de propiedades físicas, ópticas, químicas y hasta biológicas. Dado que las propiedades de la materia a nanoescala son diferentes que a macroescala, y el aprovechamiento de estas propiedades puede llevar a la creación de tecnología cada vez más pequeña y eficiente, el impacto de la integración de la nanotecnología al mundo en el siglo XXI puede compararse al impacto que tuvo la tecnología de semiconductores e informática en el siglo XX [1], [2]. La implementación de la nanotecnología a tecnologías actuales para un mejor aprovechamiento de las propiedades del material ha llevado al desarrollo y aplicación de distintos nanomateriales en la industria [3].

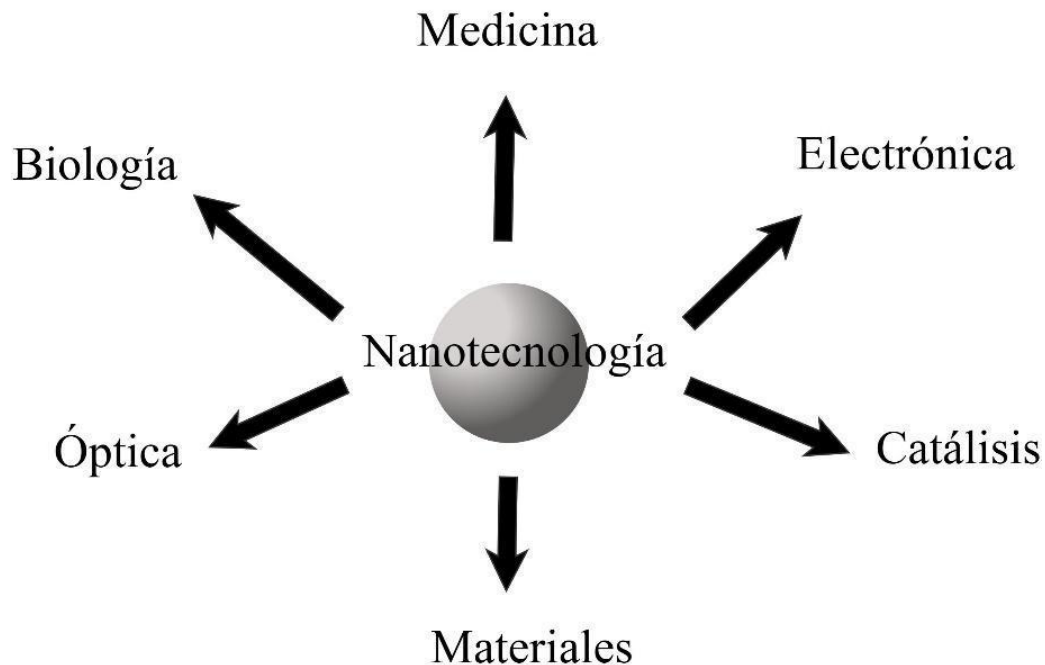


Figura 1. Nanotecnología y sus distintos campos de aplicación. Adaptado de [2].

1.2 Nanopartículas de plata

Uno de los nanomateriales más producidos son las nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos [4], cuyas propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, catalíticas, etc., vienen dadas por su naturaleza metálica, forma y tamaño; haciéndolas fuente de un sinnúmero de aplicaciones prácticas [5]. Son de principal interés ya que pueden ser sintetizadas y modificadas con varios grupos funcionales que permiten su conjugación con anticuerpos y ligandos, haciéndolas químico-específicas. Sin mencionar claro, que muchas de sus propiedades pueden ser modificadas únicamente variando parámetros y método de síntesis [6].

Las nanopartículas de plata (AgNP's) se han vuelto unas de las nanopartículas más fascinantes en virtud de sus múltiples aplicaciones en diversas disciplinas, sobre todo en el área médica y biológica por sus propiedades antimicrobianas y fungicidas; haciéndolas uno de los nanomateriales más altamente producidos y utilizados [4]. La plata [Ag] es un metal con notables propiedades y actividad antimicrobiana contra más de 650 organismos patógenos. La plata y su uso como agente antimicrobiano se remonta desde el siglo XVII, siendo utilizadas las sales metálicas, como el nitrato de plata, para el tratamiento de úlceras, la cual fue establecida en el siglo XIX. Las propiedades de este metal son un campo actual de investigación, siendo reguladas las nanopartículas de plata en 1920 por La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) [7], la obtención y manipulación de este material a escalas nanométricas para el estudio de sus propiedades se ha vuelto de crucial importancia [8],[9].

1.4 Métodos convencionales de síntesis para NP metálicas

Específicamente hablando de las nanopartículas metálicas, existen dos métodos de síntesis: Top-down y Bottom-up (Fig. 2), los cuales también se pueden subdividir en físicos y químicos. Desde el punto de vista químico, este método requiere la implementación de diversas técnicas y reactivos para obtener una menor polidispersidad y una mayor estabilidad en las nanopartículas. Por otro lado, para el empleo de métodos físicos, se requieren equipos con un valor elevado, convirtiéndose en un método poco rentable [10], [11].

Tabla 1. Métodos Top-Down para la síntesis de nanopartículas metálicas y sus desventajas. Adaptado de [10]

Método Top-Down		
Método		Desventajas
Fresado mecánico	Molienda	<ul style="list-style-type: none"> ● Alta energía requerida. ● Largo periodo de molienda. ● Contaminación del polvo debido a las bolas de acero. ● Se puede moler una microestructura muy sensible
	Mecanoquímico	<ul style="list-style-type: none"> ● Las nanoestructuras formadas son muy sensibles a las condiciones de molienda ● Contaminación no deseada ● Larga duración para obtención de nanoestructuras menores a los 20 nm
Ablación láser		<ul style="list-style-type: none"> ● La ablación láser prolongada provoca la formación de una gran cantidad de nanopartículas en la solución coloidal que bloquean el paso del láser. ● La energía láser es absorbida por las nanopartículas ya formadas en lugar de por la superficie objetivo. Esto conduce a una reducción de la tasa de ablación
Sputtering		<ul style="list-style-type: none"> ● La naturaleza del gas de pulverización catódica (He, Ne, Ar, Kr y Xe) puede producir efectos en la morfología de la superficie, la composición, la textura y las propiedades ópticas de los films nanocristalinos de óxido metálico.

Tabla 2. Métodos Bottom-up para la síntesis de nanopartículas metálicas y sus desventajas. Adaptado de [10].

Método Bottom-up		
Método		Desventajas
Métodos de estado sólido	Depósito físico de vapor	<ul style="list-style-type: none"> ● Costoso ● Genera poco volumen de material.
	Depósito químico de vapor	<ul style="list-style-type: none"> ● Riesgos químicos debido a los gases precursores tóxicos, corrosivos y explosivos. ● Depósito de materiales multicomponentes es complicado
Métodos de estado líquido	Reducción química	<ul style="list-style-type: none"> ● Limitaciones asociadas a los agentes reductores, como la toxicidad ● Costos elevados ● Escasa capacidad reductora ● Impurezas
	Hidrotermal	<ul style="list-style-type: none"> ● Procesos difíciles de controlar. ● Limitación de la fiabilidad y la reproducibilidad.

Estos distintos métodos permiten la transformación de metales en bulto o compuestos químicos a nanopartículas metálicas monodispersas con composición y estructura controlable (en la mayoría de los casos), sin embargo, las desventajas que implican estos métodos suelen ir desde peligros para el humano como el medio ambiente.

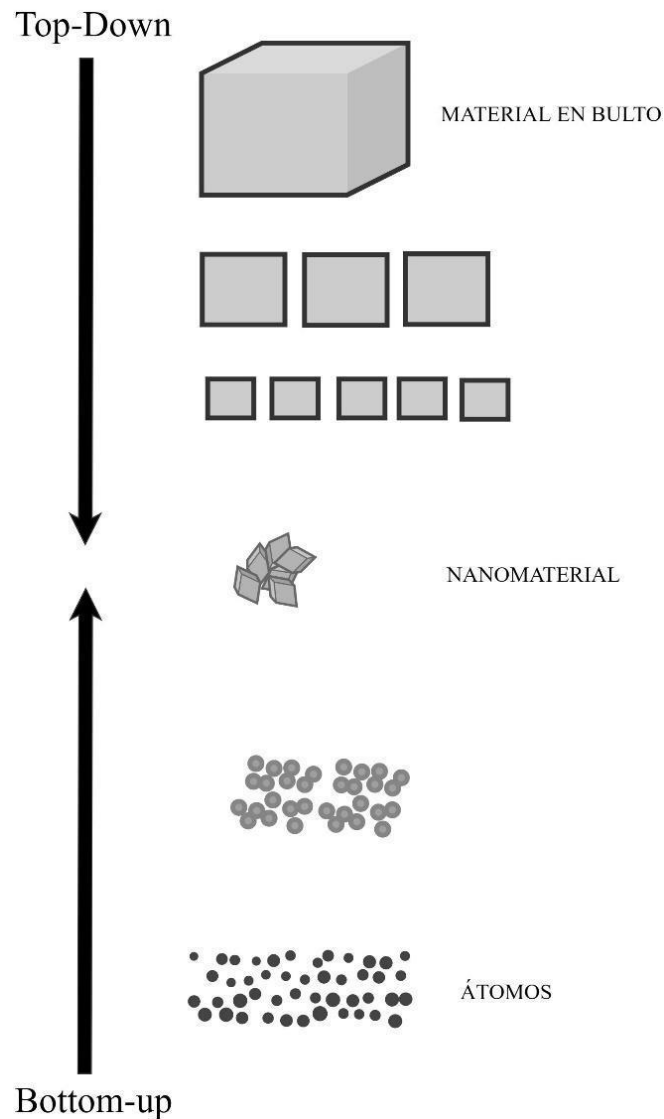


Figura 2. Representación de los métodos de síntesis Top-Down y Bottom-up para la síntesis de nanomateriales. Adaptado de [10].

1.5 Síntesis verde

La búsqueda de métodos sustentables nos lleva a la síntesis verde. Este enfoque utiliza recursos biológicos, como extractos de plantas, hongos, bacterias y algas, que actúan como agentes reductores y estabilizadores para convertir los iones de plata en nanopartículas [12]. El uso de extractos de plantas en la síntesis de AgNP's es particularmente atractivo debido a la disponibilidad y diversidad de compuestos fitoquímicos que pueden facilitar la reducción de los iones de plata. La ventaja de estos métodos es que suelen ser más seguros, económicos y menos tóxicos en comparación con los métodos químicos y físicos tradicionales [13].

Estas técnicas tienen una serie de ventajas sobre otros métodos físicos y químicos, ya que son rentables, respetuosas con el medio ambiente y fácilmente escalables para la producción a gran escala. Además, la síntesis verde no implica el uso de alta presión, exceso de energía, altas temperaturas y productos químicos tóxicos [14].

La síntesis de nanopartículas metálicas por síntesis verde se divide en dos categorías:

1) Biorreducción: en este método, los iones metálicos se reducen químicamente utilizando microorganismos y sus enzimas. Las nanoestructuras metálicas formadas son estables e inertes y pueden separarse de forma segura de la solución final.

2) Biosorción: se trata de un método único de síntesis de nanopartículas en el que los cationes metálicos presentes en un medio acuoso se unen a la pared celular del organismo, lo que conduce a la formación de nanopartículas estables debido a la interacción de la pared celular o el péptido [10], [15].

1.6 Microalgas y su uso en síntesis verde

Uno de los organismos usados para la síntesis verde son las microalgas. Su uso para la síntesis verde de nanopartículas de plata representa un enfoque innovador y ecológico en la nanotecnología. Las algas y microalgas, debido a su abundancia en la naturaleza y su capacidad para crecer en diversos ambientes, se han convertido en candidatas ideales para este proceso. Son particularmente atractivas por su eficiencia en la biosíntesis de nanopartículas, ya que contienen una variedad de compuestos bioactivos que pueden reducir los iones de plata y estabilizar las nanopartículas formadas [16]. Estos compuestos incluyen polisacáridos, lípidos, proteínas y metabolitos secundarios, que actúan como agentes reductores naturales y capas protectoras, evitando la aglomeración y proporcionando una dispersión uniforme [17].

1.6.1 *Dunaliella salina*

Dentro de este mundo protista se encuentra la microalga *Dunaliella salina*, la cual es de interés en la síntesis verde de AgNP's y otras nanopartículas metálicas debido a que es rica en metabolitos bioactivos que facilitan la reducción durante la síntesis [18]. El interés en *Dunaliella salina* para la síntesis de nanopartículas se debe a su capacidad de

crecimiento bajo condiciones ambientales extremas e hipersalinas [19], [20]. La capacidad de esta microalga para producir en mayor cantidad una amplia gama de metabolitos abre posibilidades para su uso en diversas aplicaciones industriales y tecnológicas, lo que convierte a *Dunaliella salina* en un recurso valioso en el campo de la nanotecnología verde [21], [22], [23].

1.7 Propiedades antimicrobianas en nanopartículas

La actividad antibacteriana está relacionada a compuestos que matan bacterias o ralentizan su crecimiento, por lo que su clasificación puede ser bactericida o bacteriostática [7].

La efectividad antimicrobiana que presentan las NP's depende de las propiedades de la bacteria (Tabla 3). Por tanto, más allá de las propiedades fisicoquímicas de las NP's, la forma de destruirlas (bacterias) son muy específicas de cada cepa [24].

Hay un extenso número de artículos discutiendo la actividad antimicrobiana de distintas NP's, sin embargo, la discrepancia y falta de correlación de las propiedades fisicoquímicas con su actividad antibacteriana se puede deber a la falta de estudios generalizados, es decir, uso único de NP's y bacterias disponibles, además de NP's mal definidas y caracterizadas, por lo que obtener una correlación con las propiedades fisicoquímicas básicas generales, se vuelve difícil [25], [26].

Tabla 3. Propiedades de la bacteria y su relación con la susceptibilidad ante nanopartículas. Adaptado de [24].

Propiedad	Susceptibilidad a NP's
Pared celular	Células grampositivas tienen una pared celular que contiene una capa gruesa (20-50 nm) de peptidoglicano (pg), que está unido a ácidos teicos. Las paredes de las gram negativas comprende una fina capa de pg y contiene una membrana externa, que cubre la membrana superficial. La membrana externa confiere resistencia a compuestos hidrófobos, y contiene como componente único los lipopolisacáridos, que aumentan la carga negativa de las membranas celulares y dificulta la entrada de antibióticos y NP's.
Velocidad de crecimiento	Las bacterias de crecimiento rápido son más susceptibles que las de crecimiento lento a los antibióticos y a las NPs. Es posible que la propiedad de tolerancia de las bacterias de crecimiento lento esté relacionada con la expresión de genes de respuesta al estrés.
Formación de biopelículas	La formación de biopelículas protege a las bacterias patógenas frente a los antibióticos. Las propiedades electrostáticas de las nanopartículas y las biopelículas influyen en su interacción.
Producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS)	Algunas bacterias tienen la capacidad de producir EPS's bajo estrés al estar en medios con NPs presentes. Esta sobreproducción les da una protección extra haciéndolas menos susceptibles a muerte celular por toxicidad de NPs.

Dada las diferencias que pueden llegar a tener las cepas bacterianas entre sí, las NP's pueden llegar a presentar distintos mecanismos de toxicidad. Estos mecanismos van desde cambios de permeabilidad en la membrana celular, como su internalización y daño al DNA. Algunos de estos mecanismos son: producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS), inducir cambios en la estructura de la membrana celular y su impermeabilidad, daño al DNA, daño mitocondrial, etc., todo esto induciendo la muerte celular [7], [24], [27].

Además de los diferentes mecanismos de acción, factores adicionales influyen en la actividad antibacteriana de las NP's y la susceptibilidad de las bacterias ante ellas [24], [28]. Dentro de la síntesis verde, el extracto y compuestos biológicos del organismo tienen la capacidad no solo tienen la capacidad de llevar a cabo la síntesis exitosamente, sino que, además, estos compuestos tienen la capacidad de mejorar las propiedades antimicrobianas [29], [30], [31], [32]. En estos casos, las nanopartículas ofrecen propiedades antimicrobianas ya no solo dado sus propiedades fisicoquímicas por sí solas, sino en conjunto con este recubrimiento orgánico, lo que puede llevar ya sea a

una mejora de la actividad antimicrobiana, o en algunos casos, una reducción de esta [33]. En general, los mecanismos de la actividad antimicrobiana de las NP's no está bien definida, como se menciona, los factores de los que depende van desde la cepa bacteriana hasta el método de síntesis y propiedades fisicoquímicas obtenidas [34].

El presente trabajo de investigación se enfoca en explorar el potencial antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas mediante este enfoque verde, utilizando extracto de *Dunaliella salina* SQ como agente reductor y estabilizador. A través de un análisis exhaustivo, se busca comprender en profundidad la actividad antimicrobiana de estas AgNP's en relación con sus propiedades fisicoquímicas otorgadas por el uso del extracto de esta microalga, destacando su viabilidad como una estrategia efectiva y sostenible en la lucha contra patógenos.

2. Antecedentes

Un estudio realizado en 2017 por la Dra. Silva Sein sobre la síntesis de AgNP's y el propósito que a estas se les adjunta, se encontró que la mayoría de estos se encuentran en las líneas de investigación biológica como: biomedicina, biosíntesis de metales, epidemiología, e interacción de materiales nanoestructurados con microorganismos patógenos. “Del total de los casos ... el 20% ha participado en algún proceso de protección intelectual, en aras de transferir su investigación a un producto con aplicación directa. Algunas de dichas aplicaciones incluyen: apósitos para heridas, recubrimientos antimicrobianos, rellenos dentales, cosméticos, biopelículas y revestimientos de polímeros” [4]. Como podemos notar, la mayoría de las aplicaciones que se le da a este nanomaterial son aprovechando sus propiedades fungicidas y antimicrobianas.

Estudios han demostrado que, dependiendo del método de síntesis utilizado, se obtienen diversas propiedades y características específicas en las nanopartículas. Dentro de estos estudios se menciona que las AgNP's sintetizadas por métodos químicos tienen una mayor estabilidad térmica y una mayor actividad antimicrobiana que las sintetizadas por métodos biológicos. Mientras que las sintetizadas por métodos biológicos suelen presentar una mayor actividad antifúngica [35], [36], [37], [38].

Sein, S. (2017) menciona en su estudio que las AgNP's sintetizadas por métodos químicos suelen tener más aplicación en el campo médico para instrumentos quirúrgicos, prótesis, catéteres y heridas médicas. Las sintetizadas por métodos físicos suelen tener una mayor aplicación en el tratamiento de aguas y suelos. Mientras que los métodos biológicos se utilizan más para textiles, electrodomésticos, conservación y envasado de alimentos, y cosméticos [4].

Esta diferencia de propiedades de las AgNPs y por lo tanto su potencial de aplicación final en el campo se debe a la estabilidad que les confiere el método de síntesis utilizado, lo cual viene determinado por su tamaño, distribución de tamaño, carga superficial, agentes estabilizantes, medio de dispersión, interacciones de superficie, pH del medio, temperatura, etc. [9].

Obtener buenas propiedades antimicrobianas y antifúngicas, lograr el control de las propiedades y mejorar la estabilidad en las AgNPs por síntesis verde se ha vuelto primordial para dejar de lado los métodos convencionales que dañan al ecosistema y no son redituables. Cada vez hay más estudios sobre la síntesis verde de AgNPs con diferentes organismos [39], [40]. La obtención de AgNPs utilizando extractos de plantas u otros organismos para síntesis verde, se encuentra ampliamente estudiado a diferencia de las microalgas. Sin embargo, las microalgas son de especial interés dado que estas tienen capacidades como biorremediación de metales pesados, y de producir diversidad de nanopartículas metálicas como plata, oro, cadmio y platino [41].

Buscando si existía una relación de las propiedades finales de las AgNP's según la especie, Moraes et al. probó la síntesis verde con el extracto de dos cianobacterias y dos microalgas. Aunque no encontraron una diferencia en la forma de las nanopartículas y las biomoléculas estabilizadoras, sí encontraron una diferencia significativa en el tamaño de las nanopartículas obtenidas entre cianobacterias y microalgas. Esta relación casi específica tamaño-especie nos abre camino a investigar el potencial de aplicación de las nanopartículas según la especie, ya que, dado que el tamaño puede llegar a ser muy diferente y con ello influir en su estructura y reactividad, se tiene un amplio potencial de aplicación en diferentes procesos catalíticos y biológicos [42]. Teniendo en cuenta que sí existe una relación tamaño-especie, los autores mencionan que la diversidad de algas debería explorarse mejor como una fuente de nanopartículas nuevas y diferentes.

Adentrándonos en las algas, estas son capaces de convertir metales tóxicos en formas no tóxicas mediante quelación, reacciones sucesivas o formación de nanopartículas. Esta capacidad se las confiere las biomoléculas presentes en ellas y la acción de enzimas reductasas y quinonas de transporte de electrones, interacciones electrostáticas entre los iones metálicos y los compuestos constituyentes de la microalga. Khalid et al. Realizó la síntesis de AgNP's con 3 distintas especies de microalgas. En el estudio, se obtuvo un variado rango de tamaños, así como distintas formas. Las AgNP's presentaron una diferencia de inhibición frente a distintas bacterias como era de esperarse dada la diferencia de tamaño y forma obtenida [43].

La síntesis verde con extracto de microalgas, aunque es un campo poco explorado en comparación con otros microorganismos, se encuentra en desarrollo actualmente. Muthusamy et al., Khalid et al., Patel et al. lograron producir AgNP's por síntesis verde con extracto de distintas microalgas sin la adición de ningún agente químico reductor y/o tamponante, con tamaño menor a los 100 nm y con actividad antimicrobiana [41], [43], [44].

Como se mencionó, la síntesis verde de AgNPs con microalgas aún se encuentra poco investigada. Aunque distintas algas y microalgas han sido de estudio para la síntesis verde de AgNP's, dentro de estos estudios muy pocos se centran en *Dunaliella salina*. Microalga halófila flagelada verde, miembro del grupo Chlorophyta clase Chlorophyceae que se encuentra más comúnmente en ambientes salinos y aguas marinas costeras [45]. Esta microalga es rica en componentes como betacaroteno y glicerol, además su facilidad de cultivo la hace de las microalgas de mayor uso para la obtención de glicerol, cosméticos, proteínas y carotenoides [21].

Entre los pocos estudios que se han realizado sobre la síntesis verde con *D. salina*, se encontró la comparación en la producción de nanopartículas de oro con extracto de la microalga *Dunaliella salina* y la planta *Arabidopsis thaliana*. Chumakov et al. menciona la obtención de NP's con un menor diámetro usando el extracto de *D. salina*, aunque los autores no hacen afirmaciones sobre la eficacia de un cultivo en concreto por la falta de estandarizaciones [46].

Cepoi et al. usó por primera vez *D. Salina* para la producción de nanopartículas de plata por síntesis verde. Obtuvo un diámetro de 15-40 nm, y con la utilización de diversos métodos encontró que la formación de las AgNP's estaba acompañada de una reducción de betacaroteno y lípidos en la biomasa [47].

Anteriormente, Nanopartículas de oro y plata sintetizadas con extracto de *Dunaliella salina* han sido puestas a prueba como antibacterianos y anticancerígenos. Demostrando efectividad ante distintas cepas, tanto gram positivas como gram negativas, por ejemplo *E. Coli*, y su potencial uso como anticancerígenos [33], [46], [48], [49].

Los mecanismos de toxicidad de las NP's aún se discute, como se mencionó, la discrepancia y falta de correlación de las propiedades fisicoquímicas con su actividad antibacteriana hace difícil obtener una estandarización de propiedades, así como su reproducibilidad a futuro.

Varios factores adicionales pueden influir en la susceptibilidad o tolerancia de las bacterias a las NP's [24]. Hablando específicamente de nanopartículas a base de síntesis verde, los extractos y agentes biológicos utilizados en la síntesis, no solo tienen la capacidad de reducir las sales metálicas dando paso a la nucleación y formación de las nanopartículas, sino que, además, son estos compuestos los que terminan recubriendo a la nanopartícula reduciendo la aglomeración, aumentando la estabilidad y mejorando las propiedades antimicrobianas [29], [30], [31], [32]. Singh, A et al., menciona que estos agente estabilizantes que recubren a la nanopartícula final, le adjunta o potencializa las propiedades antimicrobianas reduciendo la fácil disociación y proporcionando ciertas características, asimismo, en su estudio le atribuye la actividad cancerígena al complejo biomasa-nanopartícula, más que a los iones de plata en sí [49].

Además del complejo biomasa-nanopartícula, la propiedad antimicrobiana puede ser altamente atribuida a la carga de la nanopartícula. Ahmad et al., nos menciona en su estudio que las partículas cargadas positivamente tendrán una mejor superficie para la adhesión bacteriana que aquellas cargadas negativamente [50].

3. Justificación

Diversos estudios han demostrado ya que las AgNP's cuentan con gran actividad antimicrobiana, antifúngica y hasta antivirales. Dado entonces el gran desarrollo y campo de estudio que se ha convertido la nanotecnología y el crecimiento que se espera que esta tenga en el futuro, el desarrollo de nuevos métodos para una síntesis más eficaz, sustentable y rentable se ha convertido en uno de los objetivos más importantes de la nanociencia.

El usar una fuente natural, como las microalgas, puede dar lugar no solo a nanopartículas con mayor biocompatibilidad, también permite la funcionalización superficial de las nanopartículas con moléculas biológicamente activas que pueden exhibir o aumentar la actividad antimicrobiana, y con ello abrir aún más las posibilidades de aplicación en el área médica y biológica.

Las microalgas no sólo son fáciles de cultivar, lo cual resulta ventajoso en la búsqueda de métodos económicos, rápidos y con un mayor rendimiento en la producción de nanomateriales, sino que, además, tienen la capacidad de bioacumular metales de forma intensiva, lo cual resulta de interés cuando se habla de biorremediación o síntesis verde intracelular [6].

Hablando específicamente de *Dunaliella salina*, esta es capaz de producir una alta concentración de β -caroteno y glicerol, a comparación de otras microalgas y organismos. El β -caroteno es conocido por su capacidad antioxidante y su participación en la captura de electrones, lo que puede influir en la reducción de iones de plata y, por lo tanto, en la síntesis de AgNP's. Por otro lado, el glicerol, un componente intracelular importante, puede actuar como agente estabilizante, evitando la aglomeración y la sedimentación de las AgNP's [45], [51]. El papel sinérgico de estos compuestos en la síntesis y estabilización de AgNP's podría ser una pieza clave para maximizar la eficiencia del proceso y la calidad de los nanomateriales resultantes. Y claro, al ser *D. salina* una de las microalgas con mayor producción de estos compuestos, su estudio dentro del campo de síntesis verde resulta crucial para la búsqueda de microorganismos óptimos para su uso en síntesis verde de nanomateriales.

Comprender y optimizar la síntesis verde de nanopartículas de plata con extractos de *Dunaliella salina* no solo puede impulsar el desarrollo de métodos más sostenibles y eficientes en la producción de nanomateriales, sino también brindar valiosas perspectivas en la búsqueda de agentes antimicrobianos efectivos y seguros.

Es por ello, que con este trabajo se busca aportar a estas lagunas de conocimiento, resaltando la importancia de investigar en profundidad la actividad antimicrobiana de las AgNP's en correlación de los parámetros de síntesis y propiedades adjuntas por el extracto biológico.

4. Hipótesis

Las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde a partir de extractos de la microalga *Dunaliella salina* SQ presentará actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* (*E. coli*).

5. Objetivos de la Investigación

5.1 Objetivo general

→ Evaluar las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extracto de la microalga *Dunaliella salina* SQ en tres fases de crecimiento mediante difusión en agar.

5.2 Objetivos específicos

→ Evaluar el rendimiento de biomasa obtenida a distintos tiempos de crecimiento del cultivo de *Dunaliella salina* SQ mediante la técnica UV-Vis para determinar el tiempo de crecimiento óptimo.

→ Evaluar el rendimiento de la síntesis verde de AgNP's de biomasa de *Dunaliella salina* SQ de cultivos provenientes de distintas fases de crecimiento mediante la técnica UV-Vis para determinar el porcentaje de concentración óptimo.

→ Caracterizar las AgNP's mediante las técnicas UV-Vis, TEM y DLS para determinar las propiedades adquiridas con el uso del extracto de biomasa de la microalga *Dunaliella salina*.

→ Evaluar la actividad antimicrobiana de las AgNP's frente a *E. coli*, mediante el método de Kirby-Bauer a diferentes concentraciones para analizar su potencial de aplicación como agente antimicrobiano.

→ Determinar la correlación entre la actividad antimicrobiana y el complejo Biomasa-AgNP mediante el método de Kirby-Bauer contra *E. coli*.

6. Metodología

6.1 Cultivo de *Dunaliella salina*

De un previo cultivo de la cepa aislada de las lagunas hipersalinas de San Quintín B.C, se agregó a un matraz Erlenmeyer con Medio Johnson Modificado al 1.5M de NaCl (Tabla 4) [52] 1 mL de alga por cada 100 mL de medio. Se agregaron 50 μ L del antibiótico Ampicilina por cada 100 mL de medio para evitar contaminación del cultivo y se dejó en crecimiento bajo luz artificial. El cultivo se dejó en crecimiento durante 9 días, 15 días y 30 días, con el fin de analizar el rendimiento de la biomasa según el tiempo de cultivo.

Tabla 4. Componentes presentes en el Medio Johnson Modificado. Adaptado de [52].

Medio Johnson Modificado	
Compuesto	Concentración
NaCl	1.5 M
NaHCO ₃	50 mM
MgSO ₄	5 mM
KNO ₃	10 mM
CaCl ₂	0.2 mM
KH ₂ PO ₄	0.4 mM
H ₃ BO ₃	185 μ M
MnCl ₂ ·4H ₂ O	7 μ M
EDTA	5 μ M
FeCl ₂ ·6H ₂ O	2 μ M
ZnCl ₂	1 μ M
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1 μ M
CuCl ₂ ·H ₂ O	1 μ M
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1 μ M



Figura 3. Cultivos de *Dunaliella salina* en medio Johnson modificado bajo luz artificial a distintos días de crecimiento. Se pueden observar diferencias en la coloración de los cultivos debido a las diferentes concentraciones celulares de microalga en el medio.

6.2 Obtención de Extracto de *D. Salina*

Después de los días seleccionados de crecimiento, se dividió el cultivo equitativamente en viales y se llevaron a centrifugar a 6,500 RPM por 4 min a 20 °C dos veces. Se retiró el sobrenadante y se pesó la biomasa obtenida (Fig. 4A). Se resuspendió en agua desionizada en una equivalencia de 5 g por cada 30 mL de agua desionizada. Se llevó a hervir 15 minutos a 80 °C, se filtró con filtro Whatman No. 5 y se almacenó a 4 °C (Fig. 4B) [49].

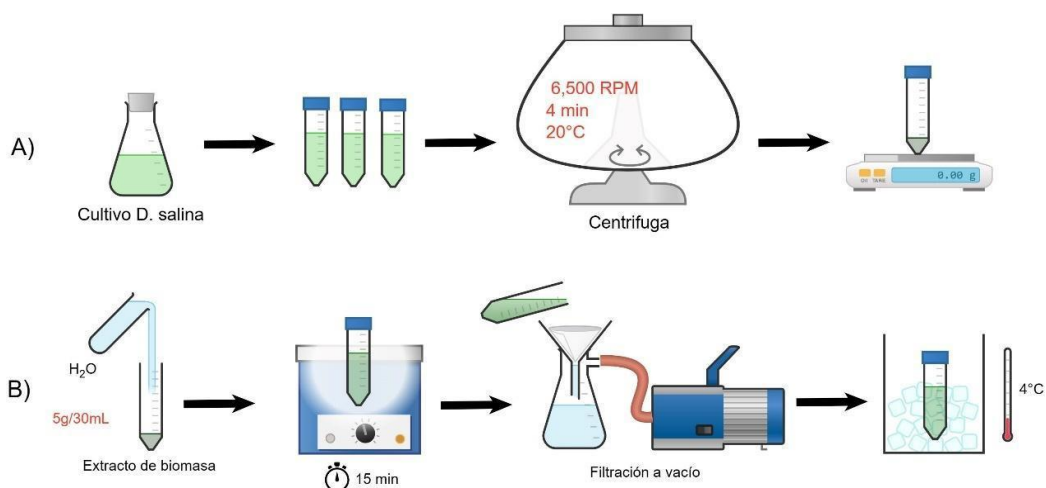


Figura 4. Representación esquemática del proceso de obtención del extracto de biomasa del cultivo de *Dunaliella salina*.

6.3 Síntesis de Nanopartículas de plata.

Adaptado de la metodología [49], en un vaso de precipitado se agregó nitrato de plata al 4 mM y se calentó entre 30 a 45°C en plancha. Una vez llegada la temperatura, se agregó una concentración del 10% del extracto de alga previamente filtrado, con agitación magnética y luz artificial (intensidad promedio de 16,000 lux) constante durante 1 hora (Figura 5). Durante las síntesis, se tomaron muestras cada 5 y 10 minutos para su posterior análisis en el UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10s) y así determinar la velocidad y rendimiento de la síntesis.

Tabla 5. Síntesis realizadas variando el tiempo de cultivo de *Dunaliella salina*.

Síntesis	Tiempo de cultivo	Concentración de extracto
1	9 días	10%
2	15 días	10%
3	30 días	10%

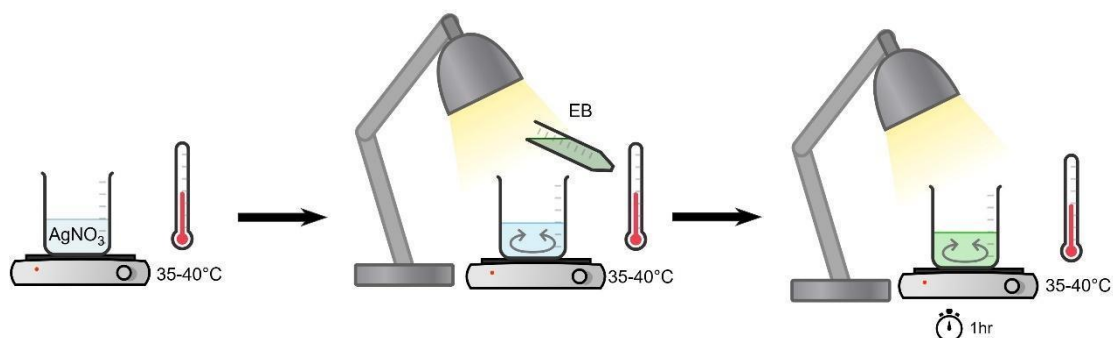


Figura 5. Representación esquemática del proceso de síntesis de AgNP's bajo luz artificial y agitación magnética constante.

6.4 Lavado de nanopartículas de plata

Al finalizar la síntesis, se vació 1 mL de la solución final de AgNP's en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron 2 veces a 10,000 RPM por 10 minutos a 20°C . Siempre retirando el sobrenadante y resuspendido en agua desionizada para su correcto lavado. (Fig. 6).

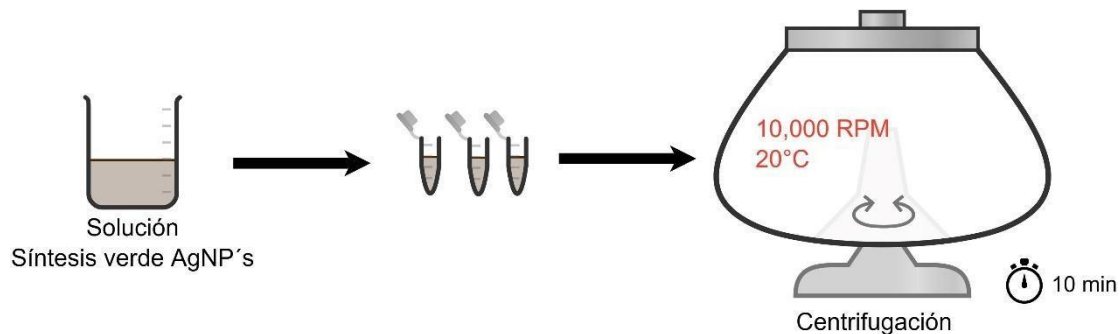


Figura 6. Representación esquemática del proceso de lavado de AgNP's.

6.5 Pesaje y preparación de soluciones

Para determinar el rendimiento final en peso de las diferentes síntesis y un mejor control de las concentraciones en solución, se llevaron los tubos Eppendorf a horno de secado con vacío a 40°C por 24 hrs. Una vez secadas y pesadas, se resuspendieron en agua desionizada y se ultrasonificaron durante 1 hora, ciclos de 0.8 y amplitud al 80% (hielscher. UP200S, Ultrasonic Processor).

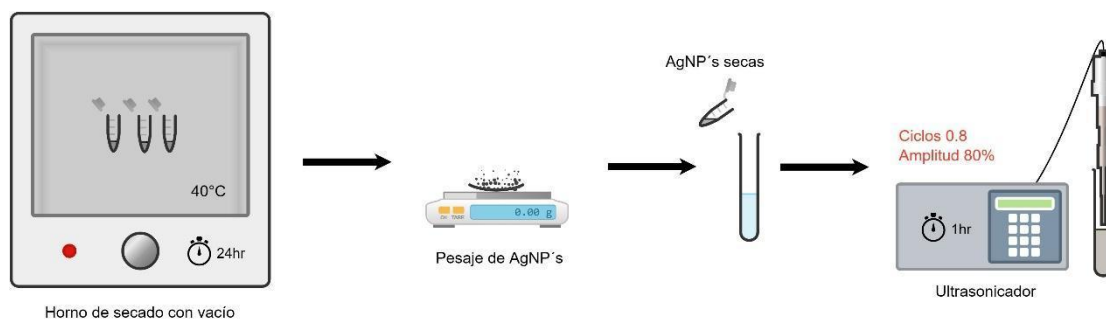


Figura 7. Representación esquemática del proceso de pesaje de AgNP's y preparación de soluciones homogéneas.

6.6 Caracterización de las nanopartículas de plata

La visualización del tamaño y forma de las AgNP's fue por medio del Microscopio electrónico de transmisión (*TEM*, por sus siglas en inglés) (Hitachi High-Tech, TEM H7500 series). Las rejillas de cobre fueron cargadas con 10 μL a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la solución de AgNP's.

El tamaño y potencial Z fue determinado por el método de dispersión dinámica de la luz (*DLS*, por sus siglas en inglés) (Malvern Panalytical, Malvern DTS 1070, folded capillary cell). Las celdas fueron cargadas con 1 mL de las soluciones de síntesis realizadas.

6.7 Pruebas de actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo por el método de Kirby-Bauer o también conocido como ensayo de difusión de disco, para ello se utilizaron cajas Petri de agar con Medio Mueller-Hinton (Tabla 6), y la bacteria *E. Coli*. La distribución de pruebas puede visualizarse en la tabla 7.

Tabla 6. Composición de Mueller Hinton Agar (MHA)

Medio Mueller-Hinton	
Compuesto	Concentración
Extracto de carne	2 g/L
Hidrolizado de caseína	17.5 g/L
Almidón	1.5 g/L
Agar	17 g/L

Tabla 7. Distribución de ensayos de la actividad antimicrobiana de las AgNP's.

Ensayo	Cultivo	Concentración	# de muestras
1	15 días	5%	6
2	15 días	10%	6
3	15 días	20%	6

Para ello, 5 discos de papel filtro con un diámetro de 6mm cargados con 10 μ L de solución de AgNP's a las distintas concentraciones fueron puestos en una caja Petri junto con los discos del control negativo (agua bidestilada) y el control positivo (kanamicina) (7 discos en total). Estos discos correspondientes a: Agua destilada, antibiótico kanamicina a 50 μ g/mL, AgNP a 15 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 150 μ g/mL y 200 μ g/mL, fueron esterilizados, cargados y puestos a secar en campana estéril un día antes de la realización de las pruebas.

De un cultivo de *E. coli* a una densidad óptica (OD) de entre 0.8 y 1 a los 600 nm, correspondiente 0.5 del estándar de McFarland y equivalente a una concentración celular de 1.5×10^8 CFU/mL, se realizó el sembrado en caja Petri con ayuda de hisopos estériles. Se sumergió el hisopo en el cultivo y se cubrió completamente la superficie del medio. Una vez sembrada la bacteria en la caja Petri, se dejaron secar por aproximadamente 30 min y posteriormente se colocaron los discos con los distintos tratamientos con ayuda de unas pinzas estériles. Las cajas fueron selladas con Parafilm y llevadas a la cámara de incubación a 37 °C durante 3 días con un monitorio cada 24 hrs.

7. Resultados y discusión

7.1 Tiempo de cultivo y rendimiento de síntesis

Varios estudios han empleado cultivos de *D. salina* con un periodo de incubación de 9 días para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas metálicas (Au y Ag) [46], [48], [49], [53]. Según la curva de crecimiento de esta microalga, en el día 9 el cultivo se encuentra a mitad de su fase exponencial de crecimiento [21]. Con el propósito de aprovechar al máximo la producción de compuestos intracelulares como el Beta-caroteno, el cual se presume está estrechamente relacionado en el proceso de síntesis [49], se prolongó el tiempo de incubación a 15 y 30 días. En la tabla 8 se detalla la cuantificación del extracto de biomasa (EB) obtenida a partir de 200 mL de cultivo en los distintos periodos de incubación mencionados.

Según lo reflejado en la tabla 8, se evidencia un rendimiento de biomasa de hasta 50% más en un cultivo de 15 días (C15) en comparación con un cultivo de 9 días (C9). A los 15 días de incubación, el cultivo de *D. salina* se encuentra dentro de su etapa estacionaria, es decir, se ha detenido la etapa de crecimiento activo exponencial de la microalga. Al mes, el alga se encuentra saliendo de su fase estacionaria, entrando a la fase de muerte. Debido a esto, el rendimiento del cultivo de 30 días (C30) fue de tan solo 16% mayor en comparación al cultivo C15.

Tabla 8. Cuantificación del rendimiento en peso de biomasa obtenido en gramos de los distintos cultivos.

Cultivo	Biomasa (g)
C9	1.2g
C15	1.8g
C30	2.1g

Se utilizó espectroscopia UV-Vis para cuantificar la síntesis verde de nanopartículas de plata. En la Fig. 8 se muestra el espectro UV-vis de las nanopartículas de plata producidas con EB de *Dunaliella salina* al 10% con los distintos cultivos y en la tabla 9 el rendimiento de síntesis obtenido en miligramos.

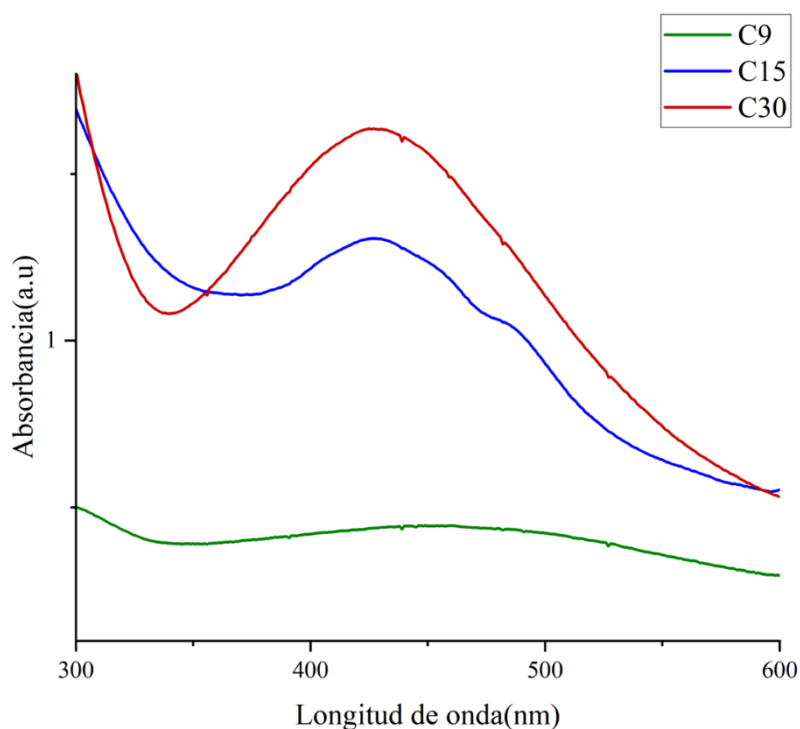


Figura 8. Espectro UV-Vis de AgNP's obtenidas mediante síntesis verde con cultivos a distintos tiempos de crecimiento. Refiriéndose a C9, C15 y C30 a 9, 15 y 30 días de crecimiento respectivamente. La síntesis se llevó a cabo durante 1 hora.

Tabla 9. Cuantificación en gramos del rendimiento de síntesis verde con el uso de EB de los 3 distintos cultivos (C9, C15 y C30).

Síntesis	AgNP's (mg)
EB-C9	3.9 mg
EB-C15	4.7 mg
EB-C30	5 mg

Dado a que los cultivos de 15 días (C15) y 30 días (C30) se encuentran a inicio y final de su etapa estacionaria, respectivamente, se registró una diferencia mínima en peso de AgNP's obtenidas entre ambos, incluso al duplicar el tiempo de cultivo. Por consiguiente, en términos de relación entre el tiempo de cultivo, biomasa y rendimiento de síntesis, se concluye que 15 días representa el periodo óptimo de incubación para *Dunaliella salina* y su uso en síntesis verde de AgNP's.

7.2 Tiempo de síntesis

En la figura 9 se encuentra representado el inicio y finalización de la síntesis de AgNP's bajo luz artificial y agitación magnética constante durante 60 minutos. La diferencia de color en la solución nos indica síntesis exitosa y presencia de AgNP's [54].



Figura 9. Proceso de síntesis de AgNP's. **a)** AgNO₃ 4mM sin biomasa añadida. **b)** Inicio de síntesis (0 min). AgNO₃ 4mM con biomasa de C15 al 10% con exposición a luz artificial y agitación magnética constante. **c)** Finalización de síntesis transcurridos 60 minutos.

La Fig. 10 muestra la síntesis de AgNP's bajo luz artificial (5-60 min) a intervalos con EB del cultivo C15. En la Fig. 10a el EB se mantuvo al nivel común del 5%, (v/v) en 40 mL de solución de nitrato de plata 4mM, mientras que en la Fig. 10b el EB se mantuvo a 20% (v/v). Se produjo un aumento continuo de la absorbancia con respecto al tiempo, alcanzando su máximo a los 40 minutos de exposición a luz artificial en el caso de EB al 5% (v/v); sin embargo, la prolongación de la duración hasta los 60 minutos no aumentó la absorbancia. En el caso de EB al 20% (v/v), si se mostró un aumento de la absorbancia al prolongar el tiempo, por lo que podemos inferir que un aumento de EB necesita una prolongación del tiempo de síntesis debido a una mayor concentración de agentes involucrados en la reacción. Esto indica claramente la síntesis verde de nanopartículas de plata con el paso del tiempo.

Curiosamente, en el caso de EB al 5% (v/v) los picos máximos de absorbancia durante la síntesis indicaron un desplazamiento hacia la región azul conforme al tiempo. La

absorbancia más baja se registró a 446 nm después de 5 minutos y el pico máximo se registró (a 421 nm) a los 40 y 60 minutos.

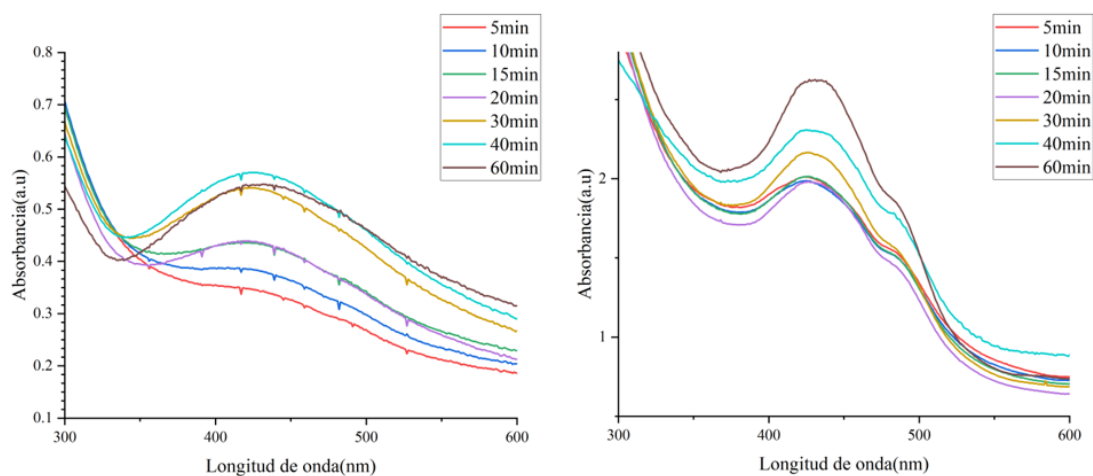


Figura 10. Espectros UV-Vis de la síntesis verde de AgNP's durante 1 hora. a) Síntesis realizada con EB-C15 al 5% durante 1 hora. b) Síntesis realizada con el EB-C15 al 20% durante 1 hora.

7.3 Concentración del extracto de biomasa

Con el análisis que se realizó del rendimiento en peso de la biomasa y síntesis con los distintos cultivos de *D. salina*, se prosiguió a la optimización de la concentración del extracto de biomasa (EB) con el cultivo C15, el cual fue determinado como óptimo. La variación de la concentración fue del 5% al 20% (v/v) para una exposición común de 60 min bajo luz artificial (Fig. 11).

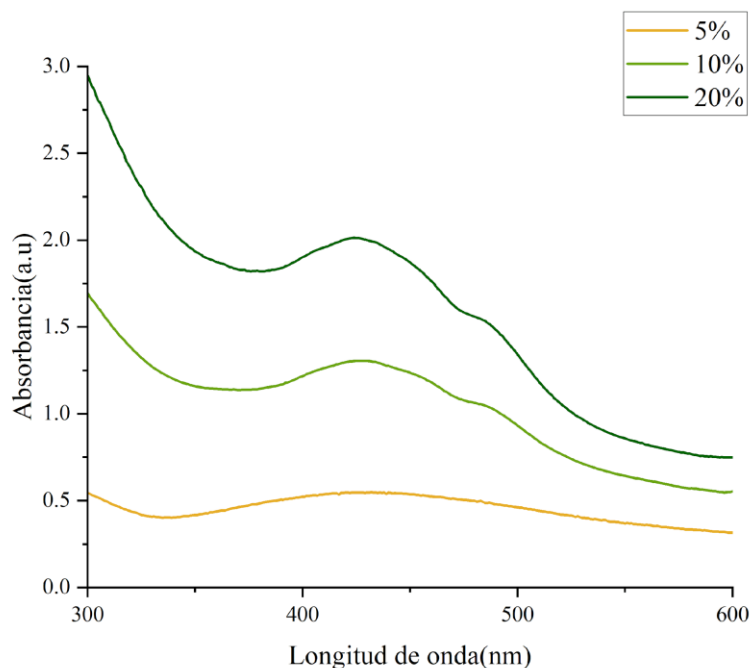


Figura 11. Espectro UV-Vis de las soluciones finales de síntesis verdes de AgNP's realizadas a las concentraciones de 5%, 10% y 20% de EB-C15 durante 1 hora.

Se observó un aumento en la absorbancia de las soluciones con el uso del 10% y 20% de EB, lo que sugiere una mayor concentración de AgNP's presentes. A diferencia del desplazamiento hacia la región azul que se obtuvo con EB al 5% (Fig. 10), las concentraciones al 10% y 20% de EB presentaron picos únicos máximos a 427 nm y 438 nm, respectivamente. Shantkriti et al., atribuye el desplazamiento del pico de absorción de las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde debido a un aumento en el tamaño de la partícula. A su vez, dicho aumento se relaciona con la cantidad de biomasa que rodea a nuestra partícula; biomasa que ayuda a la estabilización y evita la aglomeración [46]. Por lo que podemos inferir la obtención de AgNP's más pequeñas a la menor concentración de EB añadido, y un aumento de tamaño a concentraciones altas debido a la cantidad de biomasa disponible capaz de recubrir a la nanopartícula final.

7.4 Caracterización de AgNP's

7.4.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las imágenes TEM (Fig. 12) muestran las micrografías de nanopartículas de plata por síntesis verde al 10% de EB obtenidas con los cultivos C9, C15 y C30 días. Se confirma la existencia de AgNP's con distintas morfologías, entre ellas su mayoría casi esféricas. Con ayuda del software FIJI-ImageJ2 se analizó el tamaño promedio de partícula. A partir del EB-C9 se obtuvo un tamaño de partícula promedio de 21 nm, un tamaño promedio de 17 nm a partir del EB-C15, y un tamaño promedio de 27 nm con EB-C30. Las AgNP's obtenidas a partir del cultivo C30 (Fig. 12F) se muestran sin aglomeración; lo que sugiere una alta estabilidad de dispersión por parte de los fitoquímicos presentes a una mayor concentración en el extracto acuoso de *D. salina* debido a la extensión del tiempo de cultivo.

Las aglomeraciones observables en las Fig. 12A y 12C, así como la formación de partículas más grandes podría ser inducida por el secado al que fueron sometidas las AgNP's para su pesaje. Esto podría haber contribuido a la variación del tamaño de las partículas. Asimismo, una muestra de AgNP's saturada podría causar aglomeraciones al momento de su secado y visualización mediante esta técnica, como sucede en la Fig. 12E.

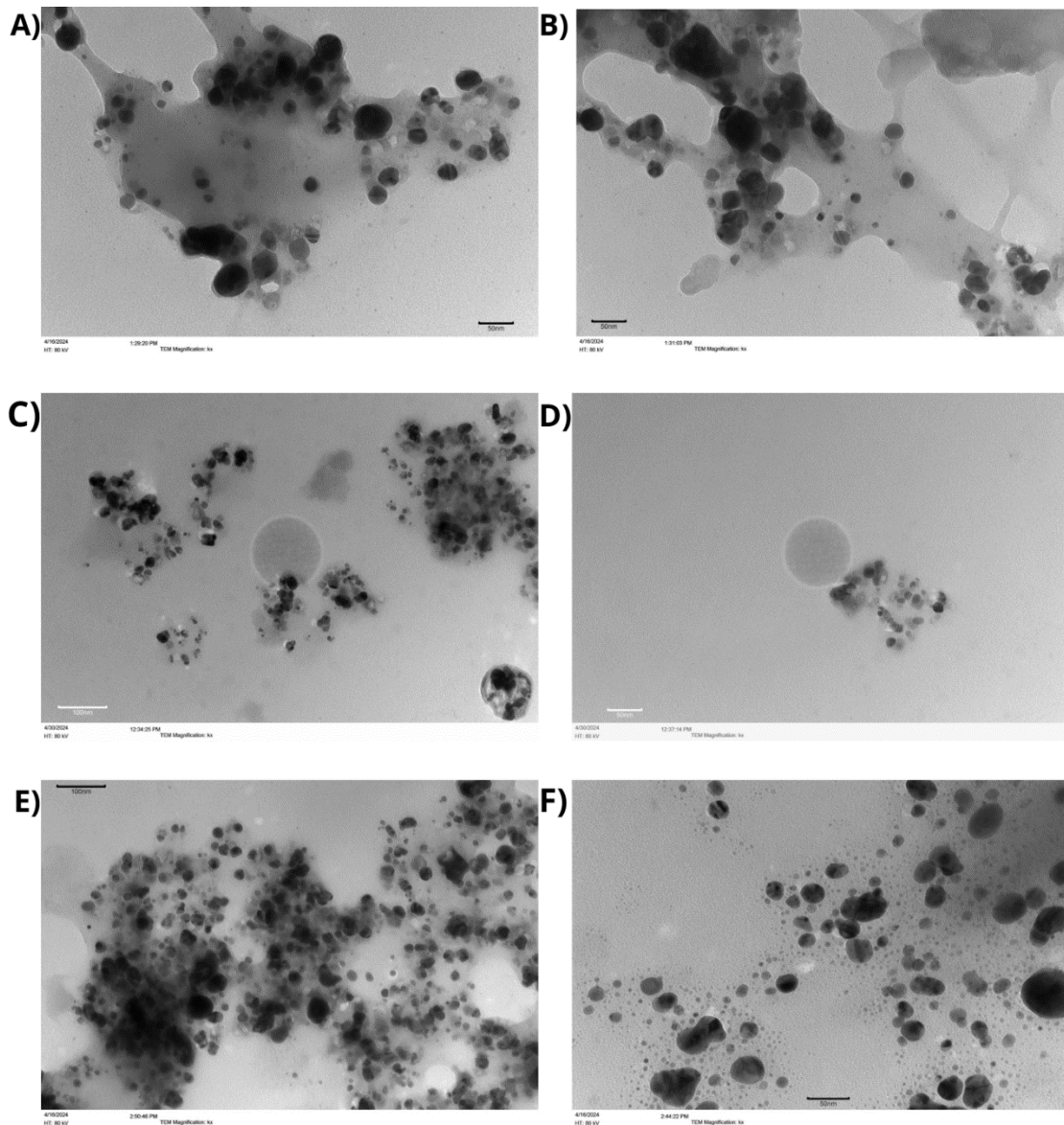


Figura 12. Imágenes TEM a distintas magnificaciones de las AgNP's. A,B) AgNP's obtenidas por síntesis verde con EB-C9 al 10%. C,D) AgNP's obtenidas por síntesis verde con EB-C15 al 10%. E,F) AgNP's obtenidas por síntesis verde con EB-C30 al 10%.

7.4.2 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

El tamaño y la distribución de las partículas también se determinaron mediante mediciones DLS. Las mediciones DLS indicaron que el tamaño de las AgNP's a partir del cultivo C9 presentan un tamaño medio de 56 nm y una polidispersidad de 0.434 (Fig. 13A). Las AgNP's a partir del cultivo C15 presentan un tamaño medio de 81 nm y una polidispersidad de 0.416 (Fig. 13B). Y, por último, las AgNP's a partir del cultivo C30 presentan un tamaño medio de 132 nm con una polidispersidad de 0.314 (Fig. 13C).

El tamaño de partícula obtenido a partir del DLS es comparativamente más amplio que el calculado a partir de las imágenes TEM. La diferencia en el tamaño de las partículas determinado por las dos técnicas puede atribuirse al hecho de que estas dos técnicas funcionan con principios y métodos de detección diferentes. Así mismo, según Singh et al., el aumento de tamaño de las nanopartículas a base de síntesis verde también se atribuye a la biomasa final que recubre a la nanopartícula [49]. Dicha biomasa resulta difícil de observar mediante el TEM debido a la forma en la que el haz de electrones interactúa con la materia orgánica [48], dicho esto, podríamos decir que el núcleo de plata tiene un tamaño pequeño (Fig. 12) y es el recubrimiento orgánico lo que aumenta el tamaño al momento de la medición por DLS (Fig. 13). Aunque es necesario la realización de un TGA para determinar la relación en peso de biomasa-partícula, podemos atribuir la diferencia del tamaño entre ambas técnicas debido al aumento del radio hidrodinámico medido por el DLS causado por la biomasa recubriendo la nanopartícula final.

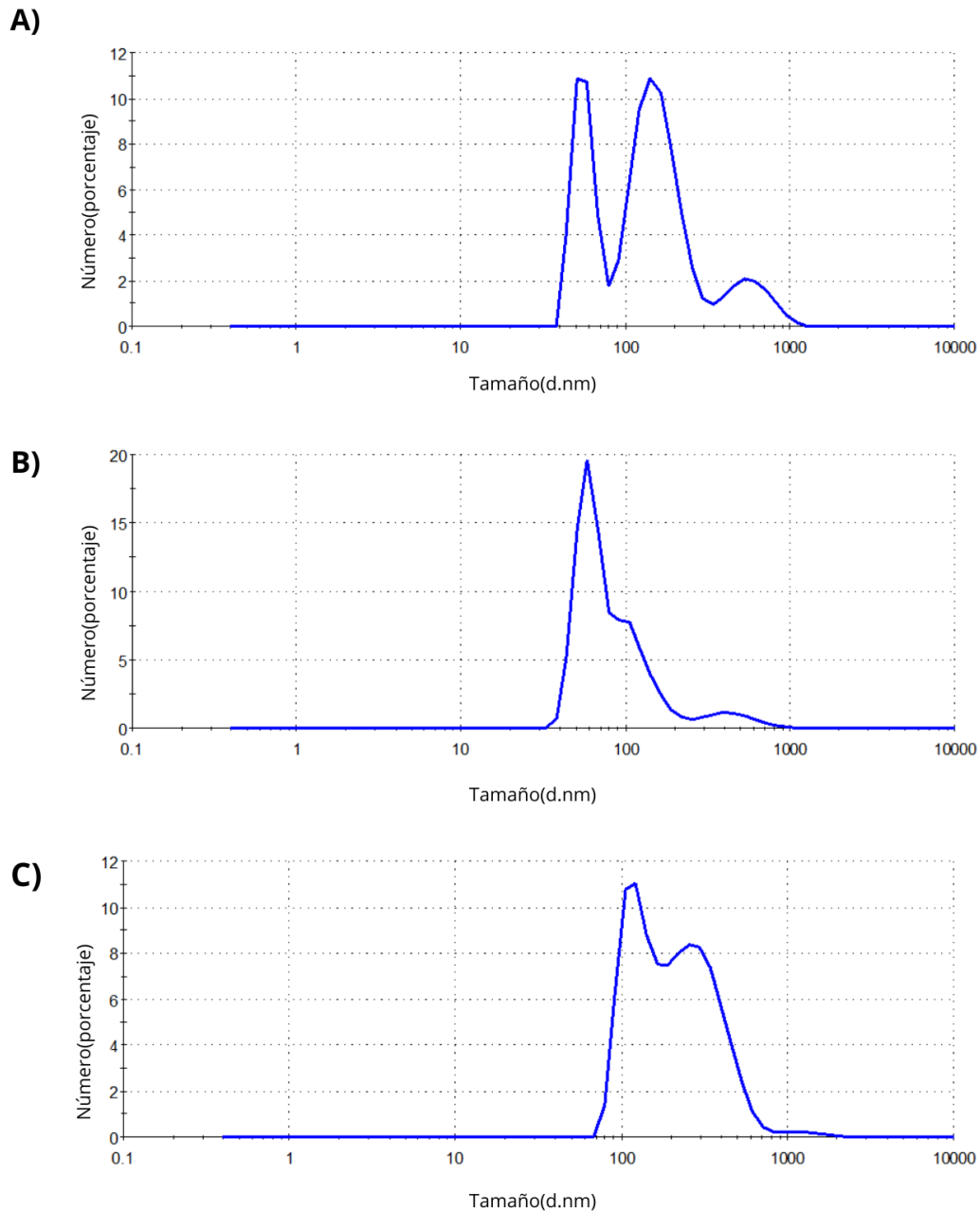


Figura 13. Espectro DLS de la distribución del tamaño por número de partículas a diferentes dimensiones. A) Espectro correspondiente a AgNP's obtenidas con EB-C9 al 10%. B) Espectro correspondiente a AgNP's obtenidas con EB-C15 al 10%. C) Espectro correspondiente a AgNP's obtenidas con EB-C30 al 10%.

Como podemos deducir de los resultados obtenidos de las técnicas TEM y DLS, la extensión del tiempo de cultivo de *Dunaliella salina* provocará la síntesis de partículas con un mayor tamaño, pero también, menor polidispersidad y una mejor distribución se obtendrá. Esto puede atribuirse a una mayor concentración de agentes reductores y estabilizantes presentes en el EB utilizado. Como se mencionó anteriormente, la materia orgánica presente en el EB que ayuda a la estabilización de las nanopartículas suele

quedarse recubriendo la nanopartícula final, por lo que podemos concluir que, a mayor tiempo de cultivo, mayor concentración de estos agentes, y mayor será el tamaño de las AgNP's finales obtenidas.

Dado el bajo rendimiento de biomasa obtenido del cultivo C9 en comparación con los cultivos C15 y C30, así como la similitud en el rendimiento de biomasa y síntesis entre los cultivos C15 y C30 (Fig. 8), y un aumento en el tamaño de nanopartícula superando los 100 nm al extender el tiempo de cultivo a 30 días, se consideró al cultivo C15 de *D. salina* como el óptimo para la síntesis verde de nanopartículas de plata.

Por consiguiente, mediante la técnica DLS se determinó el tamaño, polidispersidad y potencial zeta de partícula de las AgNP's obtenidas a tres distintas concentraciones de EB a partir del cultivo C15 (Fig. 14). En la Fig. 14A podemos observar la gráfica correspondiente a las AgNP's obtenidas a partir del cultivo C15 al 5% de EB. Los resultados arrojaron un tamaño medio de partícula de 86 nm, una polidispersidad de 0.330 y un potencial zeta de -24.3mV. Los resultados de las AgNP's al 10% de EB-C15 (Fig. 14B) arrojaron un tamaño medio de 81 nm, polidispersidad de 0.413 y un potencial zeta de -15.2mV.

AgNP's obtenidas al 20% de EB-C15 (Fig. 14C) arrojaron un tamaño medio de 41 nm. Este resultado difiere con lo visualizado en TEM (Fig. 12F) donde las AgNP's presentaron, en su mayoría, un tamaño arriba de los 50 nm. Tomando en cuenta que el tamaño debió verse aumentado en el DLS por el recubrimiento de biomasa, y no disminuido, estos datos no se tomaron en cuenta para su discusión por la incongruencia presentada.

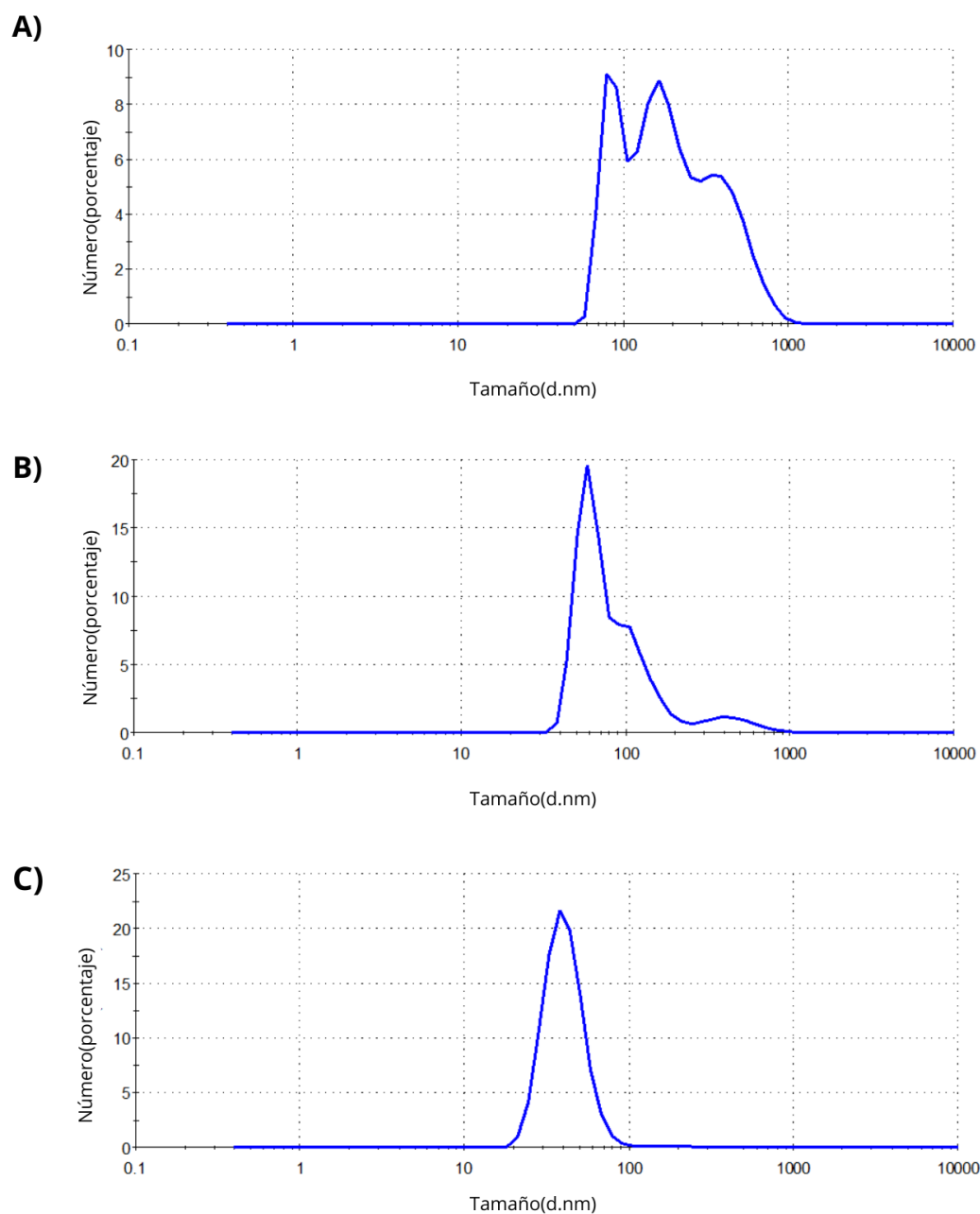


Figura 14. Espectro DLS de la distribución del tamaño de las AgNP's por número de partículas presentes en diferentes dimensiones sintetizadas con EB-C15 al A) 5%, B) 10% y C) 20%.

El potencial zeta mide la estabilidad de una suspensión coloidal. Los valores superiores a 30 mV o inferiores a -30 mV indican una gran estabilidad, que resiste la aglomeración o la agregación. En general, las nanopartículas con un potencial z superior a 30 mV o inferior a -30 mV se consideran coloides estables. Este valor puede variar en función del sistema estudiado, el tipo de partículas y las condiciones experimentales. Algunos

informes señalan un valor de -22 mV como criterio para la estabilidad de las nanopartículas de plata [55].

En este estudio, las AgNP's sintetizadas mediante EB de *Dunaliella salina* mostraron potenciales zeta que corresponden con una solución coloidal estable.

7.5 Actividad antimicrobiana

Se comprobó la actividad antimicrobiana de las AgNP's obtenidas por síntesis verde frente a *E. coli*. Las concentraciones de solución de AgNP's utilizadas para las pruebas variaron de 15 a 200 µg/mL. Se colocó como control negativo agua bidestilada (dH₂O), y como control positivo al antibiótico Kanamicina (K). Los resultados de la actividad antibacteriana se presentan en la Fig. 15.

Las AgNP's obtenidas por síntesis verde al 10% y 20% de EB-C15 mostraron nula actividad antibacteriana (Fig. 15B y 15C). Por otro lado, las AgNP's obtenidas al 5% de EB-C15 mostraron una zona de inhibición promedio de 15 ± 0.09 mm de diámetro (Fig. 15B), lo que indica una acción efectiva contra el microorganismo.

Podemos atribuir la efectiva acción antimicrobiana de las AgNP's obtenidas al 5% de EB-C15 (5EB-C15) a su alta estabilidad (potencial zeta: -24.3mV) en comparación de las preparadas a una mayor concentración de EB (10%) que mostraron una baja estabilidad (potencial zeta: -15.2mV). El aumento de tamaño debido a la biomasa que recubre a las AgNP's también podría explicar la diferencia de actividad antimicrobiana presentada al variar las concentraciones de EB. Un exceso de biomasa podría proporcionar una capa protectora alrededor de la AgNP, evitando la liberación rápida de iones de plata o limitando su interacción e internalización a la célula [56].

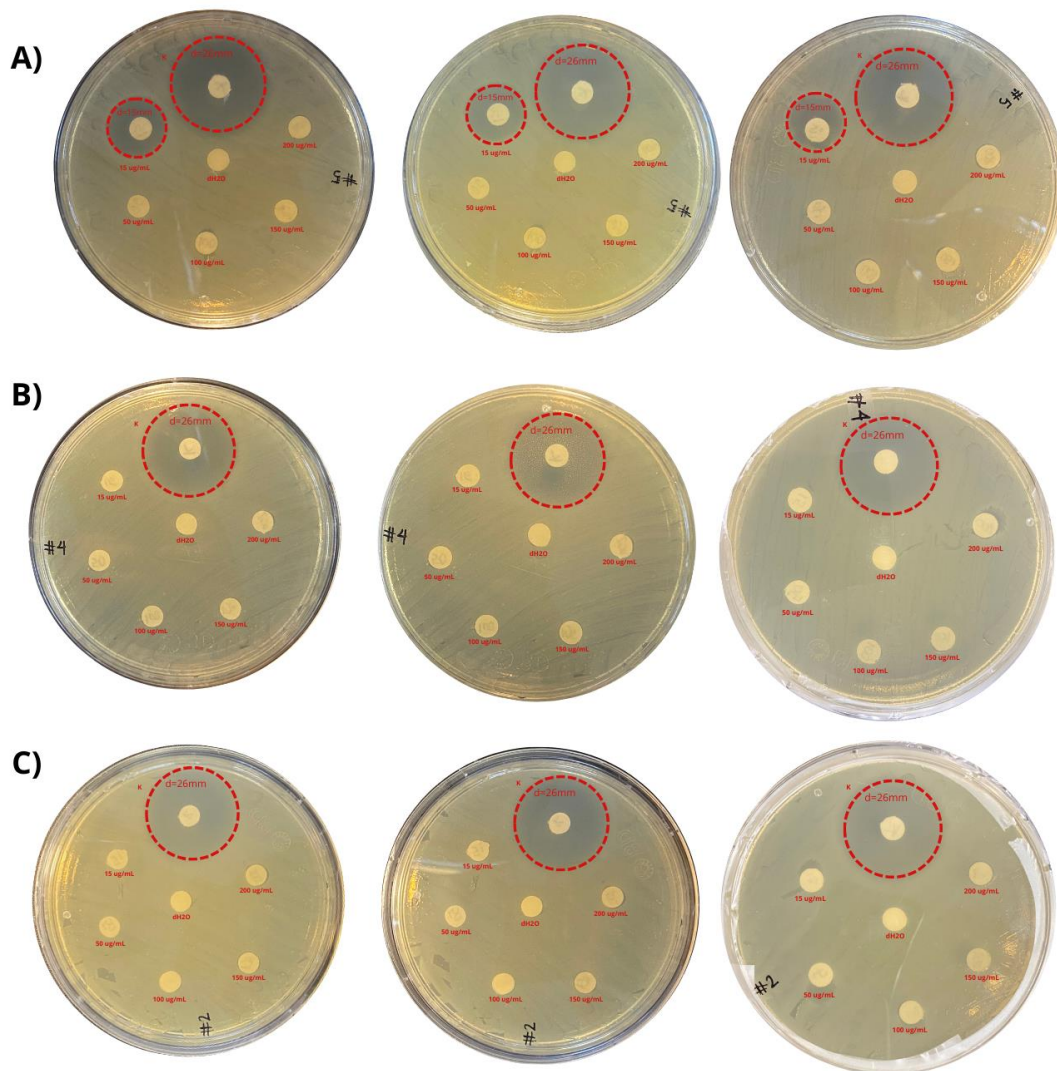


Figura 15. Actividad antibacteriana de AgNP's obtenidas por síntesis verde con EB-C15 de *Dunaliella salina* al A)5%, B)10% y C)20% contra *E. Coli*.

Además, esta zona de inhibición se correlaciona con la menor concentración de AgNP's utilizada (Fig. 15A). Al aumentar la concentración de AgNP's, la inhibición se anuló completamente. Esto sugiere que existe un efecto dosis-dependiente, donde las AgNP's son más efectivas a concentraciones más bajas. Las AgNP's pueden actuar mediante varios mecanismos, como la liberación de iones de plata, que interfieren con las funciones celulares de los microorganismos. Sin embargo, a concentraciones más altas, es posible que se alcance un punto de saturación haciendo que la bacteria sólo se encuentre afectada a bajas concentraciones [57].

Vanlalveni et al., en su revisión literaria, nos plasma los valores promedio de la zona de inhibición que logran las AgNP's sintetizadas por métodos verdes contra distintos microorganismos. Específicamente contra *E. coli*, menciona que las AgNP's suelen mostrar un halo de inhibición que va de 6 a 28 mm de diámetro [58]. Khalid et al., en su estudio realiza la comparación de la actividad antimicrobiana de AgNP's obtenidas a partir del extracto de tres cepas de microalgas contra 14 cepas bacterianas. Las tres cepas de microalgas presentaron un halo de inhibición aproximado de 10 mm contra *E. coli*, el cual consideraron como ligera inhibición. Para las demás cepas bacterianas, se consideró como ligera inhibición un halo de entre 10 mm y 13 mm, y de 13 mm a 17 mm se consideraba una fuerte inhibición [43]. Por lo que, tomando en cuenta que estos valores suelen ser encontrados en su mayoría a concentraciones superiores o igual a 100 µg/mL de AgNP's, podemos destacar el potencial uso de *Dunaliella salina* para la síntesis verde de AgNP's con un alta estabilidad, baja polidispersidad, y con una eficiente actividad antimicrobiana a bajas concentraciones.

8. Conclusiones

- Se realizó la síntesis verde exitosa de AgNP's con el extracto de *Dunaliella salina SQ*.
- Mediante las técnicas UV-Vis, TEM y DLS se determinó la morfología, tamaño y estabilidad de las AgNP's.
- La actividad antimicrobiana de las AgNP's frente a *E. Coli* fue analizada por el método Kirby-Bauer.
- La obtención de biomasa de un cultivo de *Dunaliella salina* en su etapa estacionaria, demostró un mayor rendimiento en masa (g).
- Síntesis verde de AgNP's a una menor concentración de extracto (5%) de *Dunaliella salina SQ*, nos proporcionará AgNP's, más pequeñas (86 nm) y estables (p. zeta: -24.3).
- Se demostró la eficiente propiedad antibacteriana de las AgNP's frente a *E. coli* a una concentración de 15 µg/mL de AgNP's al 5% de extracto.

En conclusión, el extracto de la planta *Dunaliella salina SQ* es capaz de sintetizar nanopartículas de Ag de forma ecológica, sencilla, rentable y eficiente.

9. Referencias

- [1] S. E. McNeil, “Nanotechnology for the biologist”, *J Leukoc Biol*, vol. 78, núm. 3, pp. 585–594, jul. 2005, doi: 10.1189/JLB.0205074.
- [2] B. Bhushan, “Introduction to nanotechnology”, *Springer Handbooks*, pp. 1–19, 2017, doi: 10.1007/978-3-662-54357-3_1/COVER.
- [3] V. J. Mohanraj y Y. Chen, “Nanoparticles - A review”, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 5, núm. 1, pp. 561–573, jul. 2006, doi: 10.4314/TJPR.V5I1.14634.
- [4] S. León Silva, “Prospectiva tecnológica de las nanopartículas de plata (AgNP) en México: I+D, usos e impactos ambientales”, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, 2017.
- [5] A. T. Koçer y D. Özçimen, “A Comprehensive Study on Extracellular Green Synthesis, Antibacterial Activity and Process Design of Metallic Nanoparticles from *Botryococcus braunii* Microalga”, *JOM*, pp. 1–15, may 2023, doi: 10.1007/S11837-023-05897-1/TABLES/4.
- [6] R. Mahendra y D. Nelson, *Metal Nanoparticles in Microbiology*. 2011.
- [7] N. Durán, M. Durán, M. B. de Jesus, A. B. Seabra, W. J. Fávaro, y G. Nakazato, “Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity”, *Nanomedicine*, vol. 12, núm. 3, pp. 789–799, abr. 2016, doi: 10.1016/J.NANO.2015.11.016.
- [8] M. Monge Oroz, “Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas”, *Anales de Química de la RSEQ, ISSN 1575-3417, ISSN-e 2792-5250, N.º. 1, 2009, págs. 33-41*, núm. 1, pp. 33–41, 2009,
- [9] E. M. Díaz Acosta y E. M. Díaz Acosta, “Nanopartículas de plata: síntesis y funcionalización. Una breve revisión”, *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, vol. 12, núm. 22, pp. 0–0, feb. 2019, doi: 10.22201/CEIICH.24485691E.2019.22.60758.
- [10] P. G. Jamkhande, N. W. Ghule, A. H. Bamer, y M. G. Kalaskar, “Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications”, *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 53, p. 101174, oct. 2019, doi: 10.1016/J.JDDST.2019.101174.
- [11] K. Mallick, M. J. Witcomb, y M. S. Scurrill, “Polymer stabilized silver nanoparticles: A photochemical synthesis route”, *J Mater Sci*, vol. 39, núm. 14, pp. 4459–4463, jul. 2004, doi: 10.1023/B:JMISC.0000034138.80116.50.
- [12] I. Biomédica Martha Elena Londoño López, “Síntesis de nanopartículas de plata usando extractos de plantas”. Universidad EIA, 2014.
- [13] E. Stela Dragan, G. Vilardi, F. Abdi, B. Andrei Miu, y A. Dinischiotu, “New Green Approaches in Nanoparticles Synthesis: An Overview”, *Molecules 2022, Vol.*

27, Page 6472, vol. 27, núm. 19, p. 6472, oct. 2022, doi: 10.3390/MOLECULES27196472.

[14] M. H. El-Rafie, M. E. El-Naggar, M. A. Ramadan, M. M. G. Fouda, S. S. Al-Deyab, y A. Hebeish, “Environmental synthesis of silver nanoparticles using hydroxypropyl starch and their characterization”, *Carbohydr Polym*, vol. 86, núm. 2, pp. 630–635, ago. 2011, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2011.04.088.

[15] K. Parveen, V. Banse, y L. Ledwani, “Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages”, *AIP Conf Proc*, vol. 1724, núm. 1, abr. 2016, doi: 10.1063/1.4945168/580977.

[16] H. M. Valenzuela-Amaro *et al.*, “Síntesis verde de nanopartículas de magnetita (NPs-Fe₃O₄): factores y limitaciones”, *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, vol. 16, núm. 30, pp. 1e–18e, oct. 2023, doi: 10.22201/CEIICH.24485691E.2023.30.69744.

[17] M. Balbuena Lidia, S. Muñoz Esteban, R. Monroy Armado, C. Vivas Blanca Martha, y A. Carranza Sandra Luz Maribel, “Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso de la hierbabuena (*Allium sativum*) como agente reductor”.

[18] P. Casal, R. Herrero, y J. L. Pereira, “SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CON PROPIEDADES ADSORBENTES MEDIANTE MÉTODOS DE QUÍMICA SOSTENIBLE”, Universidade Da Coruña, 2015.

[19] C. Mayorga y L. Manso, “Growth of the *Dunaliella salina* microalga in a Raceway cultivator in laboratory conditions”, *Journal of Undergraduate Research*, junio de 2017.

[20] E. A. Zepeda Lupio, “Crecimiento e inducción a la carotenogénesis de la microalga *Dunaliella* sp. en diferentes condiciones de cultivo”, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, 2017.

[21] “TECHNICAL RESOURCE PAPERS REGIONAL WORKSHOP ON THE CULTURE AND UTILIZATION OF SEAWEEDS VOLUME II”.

[22] M. Shariati, M. R. Hadi, M. Shariati, y M. R. Hadi, “Microalgal Biotechnology and Bioenergy in *Dunaliella*”, *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*, ago. 2011, doi: 10.5772/19046.

[23] L. M. Gómez Luna, “Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba”, Universidade Da Coruña, 1997.

[24] M. J. Hajipour *et al.*, “Antibacterial properties of nanoparticles”, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.06.004.

[25] S. Ying *et al.*, “Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations”, *Environ Technol Innov*, vol. 26, p. 102336, may 2022, doi: 10.1016/J.ETI.2022.102336.

- [26] H. Belattar, S. Himour, A. Yahia, H. Belattar, S. Himour, y A. Yahia, “Cribado fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Ficus carica*”, *Rev Mex De Cienc Agric*, vol. 12, núm. 1, pp. 1–9, ene. 2021, doi: 10.29312/REMEXCA.V12I1.2435.
- [27] V. K. Sharma, R. A. Yngard, y Y. Lin, “Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities”, *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 145, núm. 1–2, pp. 83–96, ene. 2009, doi: 10.1016/j.cis.2008.09.002.
- [28] M. V. D. Z. Park *et al.*, “The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles”, *Biomaterials*, vol. 32, núm. 36, pp. 9810–9817, dic. 2011, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.08.085.
- [29] J. R. Koduru, S. K. Kailasa, J. R. Bhamore, K. H. Kim, T. Dutta, y K. Vellingiri, “Phytochemical-assisted synthetic approaches for silver nanoparticles antimicrobial applications: A review”, *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 256, pp. 326–339, jun. 2018, doi: 10.1016/J.CIS.2018.03.001.
- [30] S. babu Maddinedi, B. K. Mandal, y S. K. Maddili, “Biofabrication of size controllable silver nanoparticles – A green approach”, *J Photochem Photobiol B*, vol. 167, pp. 236–241, feb. 2017, doi: 10.1016/J.JPHOTOBIOL.2017.01.003.
- [31] P. P. N. Vijay Kumar, S. V. N. Pammi, P. Kollu, K. V. V. Satyanarayana, y U. Shameem, “Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti bacterial activity”, *Ind Crops Prod*, vol. 52, pp. 562–566, ene. 2014, doi: 10.1016/J.INDCROP.2013.10.050.
- [32] R. de la C. Esquivel-Figueroa y S. M. Mas-Diego, “Síntesis biológica de nanopartículas de plata: revisión del uso potencial de la especie *Trichoderma*”, *Revista Cubana de Química*, vol. 33, núm. 2, pp. 23–45, 2021
- [33] A. Roy, O. Bulut, S. Some, A. K. Mandal, y M. D. Yilmaz, “Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity”, *RSC Adv*, vol. 9, núm. 5, pp. 2673–2702, ene. 2019, doi: 10.1039/C8RA08982E.
- [34] D. Bamal *et al.*, “Silver Nanoparticles Biosynthesis, Characterization, Antimicrobial Activities, Applications, Cytotoxicity and Safety Issues: An Updated Review”, *Nanomaterials 2021, Vol. 11, Page 2086*, vol. 11, núm. 8, p. 2086, ago. 2021, doi: 10.3390/NANO11082086.
- [35] R. Zanella. “Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño”. *Mundo nano* vol.5 no.1 Ciudad de México ene./jun. 2012 Epub 30-Ago-2021
- [36] Y. Sun y Y. Xia, “Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles”, *Science (1979)*, vol. 298, núm. 5601, pp. 2176–2179, dic. 2002, doi: 10.1126/SCIENCE.1077229.

- [37] L. Wei, J. Lu, H. Xu, A. Patel, Z. S. Chen, y G. Chen, “Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications”, *Drug Discov Today*, vol. 20, núm. 5, pp. 595–601, may 2015, doi: 10.1016/J.DRUDIS.2014.11.014.
- [38] E. M. Díaz Acosta y E. M. Díaz Acosta, “Nanopartículas de plata: síntesis y funcionalización. Una breve revisión”, *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, vol. 12, núm. 22, pp. 0–0, feb. 2019, doi: 10.22201/CEIICH.24485691E.2019.22.60758.
- [39] G. Princy, G. Geoprincy, B. N. Vidhya Srri, U. Poonguzhali, N. N. Gandhi, y S. Renganathan, “A REVIEW ON GREEN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES”, *Article in Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2012
- [40] S. Ahmed, M. Ahmad, B. L. Swami, y S. Ikram, “A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise”, *J Adv Res*, vol. 7, núm. 1, pp. 17–28, ene. 2016, doi: 10.1016/J.JARE.2015.02.007.
- [41] V. Patel, D. Berthold, P. Puranik, y M. Gantar, “Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity”, *Biotechnology Reports*, vol. 5, núm. 1, pp. 112–119, mar. 2015, doi: 10.1016/J.BTRE.2014.12.001.
- [42] L. C. Moraes *et al.*, “High diversity of microalgae as a tool for the synthesis of different silver nanoparticles: A species-specific green synthesis”, *Colloid Interface Sci Commun*, vol. 42, p. 100420, may 2021, doi: 10.1016/J.COLCOM.2021.100420.
- [43] M. Khalid, N. Khalid, I. Ahmed, R. Hanif, M. Ismail, y H. A. Janjua, “Comparative studies of three novel freshwater microalgae strains for synthesis of silver nanoparticles: insights of characterization, antibacterial, cytotoxicity and antiviral activities”, *J Appl Phycol*, vol. 29, núm. 4, pp. 1851–1863, ago. 2017, doi: 10.1007/S10811-017-1071-0/FIGURES/8.
- [44] G. Muthusamy, S. Thangasamy, M. Raja, S. Chinnappan, y S. Kandasamy, “Biosynthesis of silver nanoparticles from Spirulina microalgae and its antibacterial activity”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 24, núm. 23, pp. 19459–19464, ago. 2017, doi: 10.1007/S11356-017-9772-0/FIGURES/6.
- [45] G. de S. Celente, T. M. Rizzetti, Y. Sui, y R. de C. de S. Schneider, “Potential use of microalga *Dunaliella salina* for bioproducts with industrial relevance”, *Biomass Bioenergy*, vol. 167, p. 106647, dic. 2022, doi: 10.1016/J.BIOMBIOE.2022.106647.
- [46] S. S *et al.*, “Biosynthesis of silver nanoparticles using *Dunaliella salina* and its antibacterial applications”, *Applied Surface Science Advances*, vol. 13, p. 100377, feb. 2023, doi: 10.1016/J.APSADV.2023.100377.
- [47] L. Cepoi, I. Zinicovscaia, L. Rudi, T. Chiriac, y V. Turchenko, “Changes in the *Dunaliella salina* biomass composition during silver nanoparticles formation”, *Nanotechnology for Environmental Engineering*, vol. 7, núm. 1, pp. 235–243, mar. 2022, doi: 10.1007/S41204-022-00218-4/FIGURES/7.

- [48] A. K. Singh *et al.*, “Green synthesis of gold nanoparticles from *Dunaliella salina*, its characterization and in vitro anticancer activity on breast cancer cell line”, *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 51, pp. 164–176, jun. 2019, doi: 10.1016/J.JDDST.2019.02.023.
- [49] A. K. Singh *et al.*, “Photo-induced biosynthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of *Dunaliella salina* and their anticancer potential”, *J Photochem Photobiol B*, vol. 166, pp. 202–211, ene. 2017, doi: 10.1016/J.JPHOTOBIOL.2016.11.020.
- [50] A. Ahmad *et al.*, “The effects of bacteria-nanoparticles interface on the antibacterial activity of green synthesized silver nanoparticles”, *Microb Pathog*, vol. 102, pp. 133–142, ene. 2017, doi: 10.1016/J.MICPATH.2016.11.030.
- [51] P. P. Lamers, M. Janssen, R. C. H. De Vos, R. J. Bino, y R. H. Wijffels, “Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications”, *Trends Biotechnol*, vol. 26, núm. 11, pp. 631–638, nov. 2008, doi: 10.1016/j.tibtech.2008.07.002.
- [52] M. K. Johnson, E. J. Johnson, R. D. MacElroy, H. L. Speer, y B. S. Bruff, “Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*.”, *J Bacteriol*, vol. 95, núm. 4, pp. 1461–1468, 1968, doi: 10.1128/JB.95.4.1461-1468.1968.
- [53] H. Zamani y A. Moradshahi, “Synthesis and coating of nanosilver by vanillic acid and its effects on *Dunaliella salina* Teod”, *Mol Biol Res Commun*, vol. 2, núm. 3, pp. 47–55, 2013
- [54] A. Callegari, D. Tonti, y M. Chergui, “Photochemically Grown Silver Nanoparticles with Wavelength-Controlled Size and Shape”, *Nano Lett*, vol. 3, núm. 11, pp. 1565–1568, nov. 2003, doi: 10.1021/NL034757A/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NL034757AN00001.GIF.
- [55] E. Radzikowska-Büchner *et al.*, “Antimicrobial and Apoptotic Efficacy of Plant-Mediated Silver Nanoparticles”, *Molecules*, vol. 28, núm. 14, jul. 2023, doi: 10.3390/molecules28145519.
- [56] Smith A, et al. “Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond.” *Nano Lett*. 2012;12(11): 5614-5619.
- [57] E. Coutiño, L. Ávila, y O. Arroyo, “LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA: MECANISMOS DE ENTRADA, TOXICIDAD Y ESTRÉS OXIDATIVO”, *Revista de Educación Bioquímica*.
- [58] C. Vanlalveni, S. Lallianrawna, A. Biswas, M. Selvaraj, B. Changmai, y S. L. Rokhum, “Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: a review of recent literature”, *RSC Adv*, vol. 11, núm. 5, pp. 2804–2837, ene. 2021, doi: 10.1039/D0RA09941D.