

Evaluación de la toxicidad de las nanopartículas de plata sintetizadas empleando el modelo animal de *Artemia salina*.

Laura Natalia Camargo Merchán

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

William Fernando Hidalgo Bucheli

Químico, *Ph.D.*

Codirectora

Jane Angélica Neira Dulcey

Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Programa Académico

Bucaramanga

Año 2025

Dedicatoria

A mi motivación: Sandra, mi tía.

A mi ángel: Julia, mi abuela.

A mi todo: Joel y Yolanda, mis padres.

Tabla de contenido.

1.	Introducción.	11
1.	Marco de referencia	14
1.1.	Nanomateriales.	14
1.1.1	Nanopartículas de plata.	15
1.2	<i>Moringa oleífera</i>	16
1.3	Toxicidad.	18
1.3.1	<i>Artemia salina</i>	18
1.3.2	Evaluación de la toxicidad en <i>Artemia salina</i>	20
2.	Estado del arte.	21
2.1	Generalidades de la síntesis de nanopartículas metálicas empleando especies vegetales.	21
2.2	Uso de la <i>Artemia salina</i> en la evaluación de la toxicidad de extractos naturales....	23
2.3	Uso de <i>Artemia salina</i> para evaluar nanopartículas biosintetizadas.	24
3.	Objetivos.	24
3.1	Objetivo general.	25
3.2	Objetivos específicos.	25
4.	Metodología.	25
4.1	Preparación del extracto de <i>M. oleífera</i>	25
4.2	Síntesis de nanopartículas de plata.	26
4.3.	Caracterización de AgNPs.	26

4.3.1.	Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-vis).....	26
4.3.2.	Dispersión de la luz en modo dinámico (DLS).....	27
4.3.3.	Potencial zeta.	27
4.4	Pruebas de toxicidad empleando el modelo animal de <i>Artemia salina</i>	28
5.	Resultados y Discusión.	29
5.1	Síntesis y caracterización de AgNPs.....	29
5.1.1	Caracterización de partículas de AgNPs por UV-Vis.....	30
5.1.2.	Caracterización de partículas de AgNPs por DLS.....	32
5.2	Determinación de Potencial Zeta.....	37
5.3	Actividad biológica de las AgNPs evaluada en <i>Artemia salina</i>	39
5.3.1	Pruebas de viabilidad celular.	43
6.	Conclusiones.....	46
7.	Recomendaciones.	46
8.	Bibliografía.	47

Lista de Tablas

Tabla 1. Parámetros para la medición de AgNPs para el tamaño y potencial zeta.....	27
Tabla 2. Actividad biológica de las AgNPs en <i>Artemia salina</i>	40
Tabla 3. Actividad biológica de las AgNPs en LCM.....	43

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de la <i>Artemia salina</i> . Tomado de Neli Martín 2015.....	19
Figura 2. Anatomía de la <i>Artemia salina</i> . Tomado de Jaime Yockteng (2017).	20
Figura 3. <i>Moringa Oleífera</i> A). Material vegetal seco. B). Material vegetal molido.	26
Figura 4. Celdas para medición de tamaño y potencial zeta. A) celda para medir tamaño de partícula. B) celda para medir potencial zeta.	28
Figura 5. Solución de nanopartículas de plata	30
Figura 6. Espectro UV-Vis de las AgNPs sintetizadas.	31
Figura 7. Imagen de Microscopia Electrónica de Barrido de las AgNPs. A) AgNPs con objetivo de 20.000x; B) AgNPs con objetivo de 20.000x; C) AgNPs con objetivo de 50.000x, D) AgNPs con objetivo de 100.000x.....	33
Figura 8. Distribución de tamaño de partícula para AgNPs.	35
Figura 9. Gráfico del potencial zeta para las AgNPs	37
Figura 10. Gráfico de barras de la viabilidad biológica de las AgNPs en <i>Artemia salina</i>	41
Figura 11. Gráfico de barras de la viabilidad celular de las AgNPs en LCM.....	44

Resumen

Título: Evaluación de la toxicidad de las nanopartículas de plata sintetizadas empleando el modelo animal *Artemia salina*.

Autor: Laura Natalia Camargo Merchán, Jane Angelica Neira Dulcey, William Fernando Hidalgo Bucheli.

Palabras Clave: *Artemia Salina*, Nanopartículas e plata, Síntesis Verde, *Moringa oleífera*, Caracterización de nanopartículas.

Descripción: El estudio se centra en la síntesis y caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs) empleando extracto de *Moringa oleífera* como agente reductor y estabilizante, con el objetivo de evaluar su toxicidad en modelos biológicos como *Artemia salina* y células de Linfoma del Manto de colon (LCM).

Se realizaron diversas pruebas para determinar las propiedades físico-químicas de las AgNPs, incluyendo espectroscopia UV-Vis, dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial zeta, confirmando la formación de nanopartículas con tamaños entre 500nm y 2 μ m. No obstante, se observó una tendencia a la aglomeración, lo que podría afectar su estabilidad y bioactividad.

En los ensayos biológicos, la exposición de *Artemia salina* a concentraciones entre 0,04 μ g/mL y 1,4 μ g/mL mostró un aumento progresivo de la mortalidad, alcanzando hasta 45% a la concentración más alta. Esto indica una toxicidad dosis-dependiente, aunque no lo suficientemente alta para establecer una CL50. En las pruebas con células LCM, la viabilidad celular disminuyó significativamente a concentraciones superiores a 0,4 μ g/mL, sugiriendo un efecto citotóxico severo a dosis altas.

Los resultados destacan la necesidad de optimizar la síntesis de AgNPs para mejorar su estabilidad y reducir la formación de aglomeraciones. Además, se recomienda ampliar los estudios en otros modelos biológicos para evaluar su impacto ambiental y sus posibles aplicaciones en desinfección y biomedicina.

* Trabajo de Grado ** Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Codirectora: Jane Angelica Neira Dulcey.

Abstract

Title: Evaluation of the Toxicity of Silver Nanoparticles Synthesized Using the *Artemia salina* Animal Model

Author(s): Laura Natalia Camargo Merchán, Jane Angelica Neira Dulcey, William Fernando Hidalgo Bucheli.

Key Words: *Artemia salina*, Silver Nanoparticles, Green Synthesis, *Moringa oleifera*, Nanoparticle Characterization

Description: This study focuses on the synthesis and characterization of silver nanoparticles (AgNPs) using *Moringa oleifera* extract as a reducing and stabilizing agent, aiming to evaluate their toxicity in biological models such as *Artemia salina* and Mantle Cell Lymphoma (LCM) cells.

Various analyses were conducted to determine the physicochemical properties of AgNPs, including UV-Vis spectroscopy, dynamic light scattering (DLS), and zeta potential measurements. The results confirmed the formation of nanoparticles ranging from 500 nm to 2 μ m. However, a tendency for aggregation was observed, which may affect their stability and bioactivity.

In biological assays, exposure of *Artemia salina* to AgNP concentrations between 0.04 μ g/mL and 1.4 μ g/mL resulted in a progressive increase in mortality, reaching up to 45% at the highest concentration. This suggests a dose-dependent toxicity, though not high enough to establish an LC50 value. In LCM cell viability tests, a significant reduction was observed at concentrations above 0.4 μ g/mL, indicating a severe cytotoxic effect at higher doses.

These findings highlight the need to optimize the synthesis of AgNPs to enhance their stability and minimize aggregation. Additionally, further studies on other biological models are recommended to assess their environmental impact and potential applications in disinfection and biomedicine.

* Bachelor's degree Work ** Faculty of Science. School of Chemistry. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Codirectora: Jane Angelica Neira Dulcey.

1. Introducción.

La nanotecnología es una disciplina ampliamente utilizada a nivel mundial, enfocada en la manipulación de la materia en tamaños nanométricos de 1 a 100 nanómetros (nm). Dentro de esta área, las nanopartículas (NPs) juegan un papel crucial y se emplean en diversas áreas de la industria, incluyendo la fabricación de sensores biológicos y químicos, en aplicaciones biomédicas, detección de ADN, ingeniería de biomateriales, entre otros. La efectividad de las nanopartículas depende en gran medida de su forma, tamaño y estabilidad (Díaz, E. 2018).

En particular, las nanopartículas de plata (AgNPs) han ganado notoriedad en el ámbito médico debido a sus propiedades antibacteriana, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias y anticancerígenas. La actividad biológica depende de factores como química superficial, el tamaño y la morfología de la partícula, la composición, entre otros (Zhang et al. 2016).

Las AgNPs tienen actividad antimicrobiana sobre más de 650 patógenos entre los cuales están bacterias, hongos y virus; es por ello que su aplicación va más allá de la liberación de fármacos, su incorporación en productos textiles, implementación en productos de limpieza y demás (Ciobanu et al., 2011). Algunos estudios se han basado en la investigación sobre la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de las AgNPs pues a pesar de sus aplicaciones, los efectos adversos a su uso en la salud humana y medio ambiente son un limitante (Carlson et al., 2008). Un estudio realizado por Ema et al., (2017) sobre toxicidad reproductiva, encontraron que al emplear nanopartículas se generan efectos como genotoxicidad en testículos y espermatozoides, muerte de embriones y fetos, afectación en los niveles de hormonas sexuales, disminución en el número de células sexuales, alteración en la morfología de los espermatozoides y también se observó deterioro en el desarrollo cognitivo de las crías al suministrar las AgNPs en las madres.

La citotoxicidad depende de diversos factores tales como la concentración, dispersión, tamaño y funcionalización de la superficie de las AgNPs, algunos estudios demuestran que pueden penetrar y romper membranas de bacterias y que la exposición se puede dar mediante contacto dérmico, ingestión e inhalación. Asharani et al. (2017) demostraron mediante espectroscopia electrónica de transmisión (TEM) que las AgNPs penetran los endosomas, lisosomas y mitocondria, además las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen gran importancia en el efecto citotóxico que estas partículas generan pues se relaciona directamente (Durán et al. 2010).

A causa de esto, los científicos se han esforzado en el estudio y desarrollo de alternativas para sintetizar AgNPs de manera que no se tengan dichos efectos sobre la salud humana. La síntesis verde es una alternativa importante por su bajo costo y además es amigable con el medio ambiente ya que no requiere compuestos químicos tóxicos. Gardea-Torresdey et al. (2002) realizaron un estudio en donde lograron mostrar mediante espectroscopia de absorción de rayos x que la alfalfa es capaz de formar nanopartículas de oro (AuNPs), siendo este el primer estudio en donde se lograron obtener. Desde entonces se han reportado datos sobre la extracción de nanopartículas metálicas a partir de biomasa y es de gran interés ya que el manejo es relativamente sencillo y se puede usar para el desarrollo de diversos productos.

Para la síntesis de AgNPs es posible utilizar extractos de plantas como fuente de compuestos reductores de iones metálicos, como es el caso de la *Moringa oleifera* (*M. oleifera*) es un árbol originario del sur de la India que cuenta con capacidad para adaptarse a diversas condiciones de suelo y clima (Mallenakuppe et al., 2015). Tiene metabolitos secundarios como taninos, fenoles, terpenoides, diferentes compuestos lipídicos, los cuales tienen actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y antibacteriana (Berkovich et al. 2013). Sujitha et

al. (2015) emplearon semillas pulverizadas de *M. oleifera* en la síntesis de AgNPs en donde el extracto acuoso de esta planta actuó como agente reductor y estabilizante y demostró tener gran potencial en la lucha contra el dengue (serotipo DEN-2) y el vector primario *A. aegypti*.

Este proyecto se fundamenta en la necesidad de la empresa Zumotec S.A. de innovar en la fabricación de un agente con efecto biocida empleando nanopartículas de plata sintetizadas con el extracto de la *M. oleifera* como agente reductor y estabilizante por las propiedades antibacterianas que poseen evaluando la toxicidad de estas en el modelo animal *Artemia salina* y en células Linfoma del Manto de colon (LCM).

Las enfermedades infecciosas representan un problema de salud pública a nivel mundial, solo en África más del 50% de las personas mueren a causa de esto, por ello el uso de desinfectantes ha sido una pieza clave pues no representan riesgo para la salud, pero algunos productos tienen como limitante la resistencia bacteriana y terminan siendo nocivos para el medio ambiente en general. Los nanomateriales empleados para la eliminación de microorganismos son producidos no solo para productos desinfectantes de agua sino también de superficies hospitalarias (Palombo et al., 2014).

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo se enfocó en determinar si las AgNPs producidas con extracto acuoso de *M. oleifera* son tóxicas para la vida acuática y si es posible emplearse en la fabricación de un producto de limpieza y desinfección que no sea tóxico para los seres humanos de manera que la empresa Zumotec S. A pueda llevar al mercado en un futuro.

1. Marco de referencia

1.1. Nanomateriales.

Desde la década de los 80's se empezaron a desarrollar nuevas técnicas y procedimientos para la síntesis de materiales novedosos con propiedades aprovechables potencialmente en diversas áreas según sus necesidades. En este tipo de materiales las propiedades son diferentes según las características de los átomos, moléculas y del material macroscópico. Las dimensiones físicas están relacionadas con el tamaño de los clústeres de los átomos que lo forman entre 1 a 100 nm (Diaz, E. 2018). Los nanomateriales tienen composición única y se observa su estructura con técnicas de alta resolución (Dispersión dinámica de la Luz y Microscopía electrónica de barrido). El estudio de estos ha permitido su incorporación en el área médica, farmacológica, tecnológica, entre otros.

La síntesis de las NPs puede producirse por métodos físicos conocidos, por métodos químicos o biológicos y algunos de ellos implican un consumo alto de energía o mucho tiempo (Esquivel et al. 2021). El tamaño y forma de las NPs ha llevado a investigar métodos de obtención que incluyen la síntesis química, electroquímica, la reducción de compuestos organometálicos, métodos de descomposición y la síntesis por microemulsión, todos enfocados en sintetizar NPs con características muy específicas. La síntesis de las NPs metálicas se realiza a partir de diferentes metales, pero una de las más usadas y caracterizadas son las nanopartículas de plata (AgNPs) por sus propiedades físicas, químicas y biológicas entre las que destacan la actividad antioxidante (Chernousova et al. 2013).

1.1.1 Nanopartículas de plata.

Las propiedades físicas, como conductividad, las propiedades químicas, como la estabilidad, y las propiedades biológicas, como la actividad catalítica y antibacteriana, constituyen elementos fundamentales que amplían las potenciales aplicaciones de las NPs (Abdussalam-Mohammed, 2020). Desde el siglo XIX, se ha reconocido que la liberación de iones plata, debido a su corrosión lenta y gradual, tiene un efecto antibacteriano. Dado el incremento de la resistencia a antibióticos por parte de varias especies bacterianas de interés clínico, ha surgido el uso de este metal en forma de recubrimientos o nanopartículas para el desarrollo de agentes de desinfección (Baumbach et al., 1995). Las AgNPs, en virtud de su tamaño, forma y estabilidad, poseen un amplio espectro de potenciales aplicaciones, abarcando campos como bioingeniería, la medicina, la industria textil, el tratamiento de aguas, entre otros. Además, se ha documentado su capacidad de bactericida frente a patógenos como *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella dysenteriae*; (A. Beyene et al., 2021; Chernousova et al. 2013).

La síntesis de AgNPs puede realizarse mediante la reducción de sales de plata con un agente químico. Durante este proceso, es posible que estas sustancias se absorban en la superficie de la NPs, y si se eliminan por completo, pueden causar efectos tóxicos. Las AgNPs tienen efectos tóxicos en diversos organismos, incluyendo vertebrados, invertebrados, plantas, algas y microorganismos, puesto que estos participan en procesos ecológicamente importantes como la descomposición y el ciclo biogeoquímico de nutrientes (Tortella et al., 2020). En los ambientes acuáticos, las nanopartículas pueden ser ingeridas o entrar en contacto con los organismos a través de la sorción a fitoplancton/zooplancton y la transferencia del agua al sedimento (Hlongwane et al., 2019; Mukherjee et al., 2017; Zhang et al., 2016). Además, las AgNPs también tienen efectos tóxicos en plantas y comunidades microbianas del suelo, interactuando con animales, plantas y

microorganismos debido a su uso en tecnologías médicas, biorremediación, agricultura y producción de alimentos (He et al., 2019; Yang et al., 2019) . Es por ello que, la síntesis verde es una alternativa importante al ser ecológicamente sustentable (H. D. Beyene et al., 2017).

La química verde emplea hongos, bacterias, plantas o extractos para sinterizar a bajo costo y de manera amigable con el medio ambiente las NPs. Sreelakshmy et al. (2016) describe la formulación de AgNPs a partir de la reducción de soluciones de AgNO₃ empleando como agente reductor el extracto de la raíz de *Glycyrrhiza glabra* (Regaliz) las cuales representaron un avance en el tratamiento contra úlceras gástricas.

Este método, es posible gracias a la alta capacidad reductora de ciertos extractos, los cuales facilitan la reducción del ion metálico, provocando la formación de centros de nucleación. Estos centros de nucleación atrapan iones metálicos adicionales y se agrupan con otros centros cercanos, lo que resulta en la formación de las NPs (Esquivel et al. 2021).

El-Deeb et al. (2015) realizaron una investigación en la cual las AgNPs sintetizadas empleando el extracto de miel de abeja, limita la proliferación de las células cancerígenas en el cáncer de colon, esto es de gran importancia pues es posible emplearlas como agentes de liberación en el blanco biológico canceroso a diferentes concentraciones sin destruir células sanas para reducir el crecimiento de las células cancerígenas y además reducir costos en los tratamientos (Jain et al., 2021).

1.2 *Moringa oleífera.*

La moringa pertenece a la familia *Moringaceae*, un grupo pequeño de plantas dentro del inmenso orden *Brassicales* que incluye la familia de la col y del rábano, junto con la familia del mastuerzo y de las alcaparras (GBIF, 2017). La moringa es un árbol originario de Asia que posee una buena adaptabilidad a clima y suelo, resistente a la sequía y a temperaturas entre los 24 y 32°C,

crece en las estribaciones del Himalaya, pero se cultiva extensamente en los trópicos (Holguin, N. 2016). Pueden encontrarse hasta nueve especies al este de Etiopía, al norte de Kenia y en Somalia, siendo ocho de ellas endémicas en África. Las hojas son comestibles y ricas en proteínas y en aminoácidos esenciales, vitaminas (A, C y E), β -caroteno, ácidos fenólicos antioxidantes (ácidos gálicos, cafeico y clorogénico, entre otros), flavonoides (miricetina, quercetina y kaempferol), taninos, triterpenos, glucosinolatos y minerales como calcio, zinc y hierro. Los frutos jóvenes son comestibles y las semillas producen un aceite comestible y lubricante de altísima calidad (Yaméogo et al., 2011).

Moringaceae comprende únicamente un género, *Moringa*. Dentro de *moringa* hay 13 especies las cuales abarcan una gama muy diversa de hábitos o formas de crecimiento, desde hierbitas y arbustos hasta árboles grandes (Olson, 2015). La *Moringa oleifera* ha recibido mucha atención por sus múltiples usos ornamentales, alimenticios, forrajeros, medicinales e industriales, las hojas y sus frutos se consumen como verdura ya sea fresca o molida como harina de moringa (Yaméogo et al., 2011). Sus semillas se han utilizado en algunas comunidades rurales como agente para tratar la turbidez del agua y la contaminación por bacterias, después de tratamiento de secado y proceso artesanal actúa como coagulante sin importar el pH del agua (Falasca et al. 2008).

En el 2011 en Nigeria, Stevens et al. (2015) realizaron un estudio acerca del uso de la *M. oleifera* en este territorio y encontraron que más del 50% de la población la emplea como tratamiento para diferentes condiciones médicas como la fiebre con un 78,7% de índice y cerca del 64,7 % de la población la emplea en el tratamiento para la tensión arterial. La *M. oleifera* produce metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana como glucosinolatos e isotiocianatos, además, Monteagudo et al. (2022) demostraron que la *M. oleifera* tiene propiedades antimicrobianas con efectos inhibitorios frente a bacterias gram positivas y gram negativas lo que

resulta un aporte útil para futuras investigaciones sobre el desarrollo de tratamientos contra enfermedades infecciosas, además esto representa un método económico y sostenible para algunas comunidades de escasos recursos.

1.3 Toxicidad.

1.3.1 *Artemia salina*.

La *Artemia salina* es un artrópodo de la familia *Artemiidae*, especie de crustáceo braquiópodo, propio de aguas saladas. Es de aproximadamente 1 milímetro (mm) de tamaño. Tiene dimorfia sexual, la longitud del cuerpo de los machos esta entre 8 y 10 mm y el de las hembras entre 10 y 12 mm. En su etapa adulta tienen entre 3 ojos y 11 pares de patas y la coloración corporal depende de la salinidad del agua (Munteanu et al., 2011). Tienen la capacidad de sobrevivir a largos periodos de sequía y la reproducción depende de las condiciones del medio. Los ovíparos se reproducen en condiciones de alta salinidad que implica bajos niveles de oxígeno y alimentos ricos en Hierro (Fe), los huevos en estas condiciones flotan en el agua y quedan en un estado de vida latente conocido como quiste así sobreviven a largos periodos de sequía en la etapa de gástrula donde tienen una cubierta compuesta de quitina y lipoproteínas y eclosiona hasta el nauplio cuando las condiciones ambientales son mejores (Munteanu et al., 2011). La reproducción será ovovivípara en buenas condiciones ambientales, pero aquí, después de la fase gástrula se convierten en larvas o nauplios (Dumitrascu 2011).

En el ciclo de vida de la *Artemia salina*, los quistes, que tienen forma bicóncava como los glóbulos rojos, al hidratarse pasan a tener forma esférica (**Figura 1**) de manera que el metabolismo del embrión se reactiva e inician la respiración, la síntesis de RNA y proteínas y la degradación del vitelo. Pasadas entre 15 y 20 horas aproximadamente, la membrana externa del quiste se rompe y queda el embrión cubierto por la membrana de eclosión. Ahí inicia la síntesis del ADN y la

división celular. Finalmente termina el desarrollo del nauplio al cabo de 24 horas, se rompe la membrana y sale (Munteanu et al., 2011).

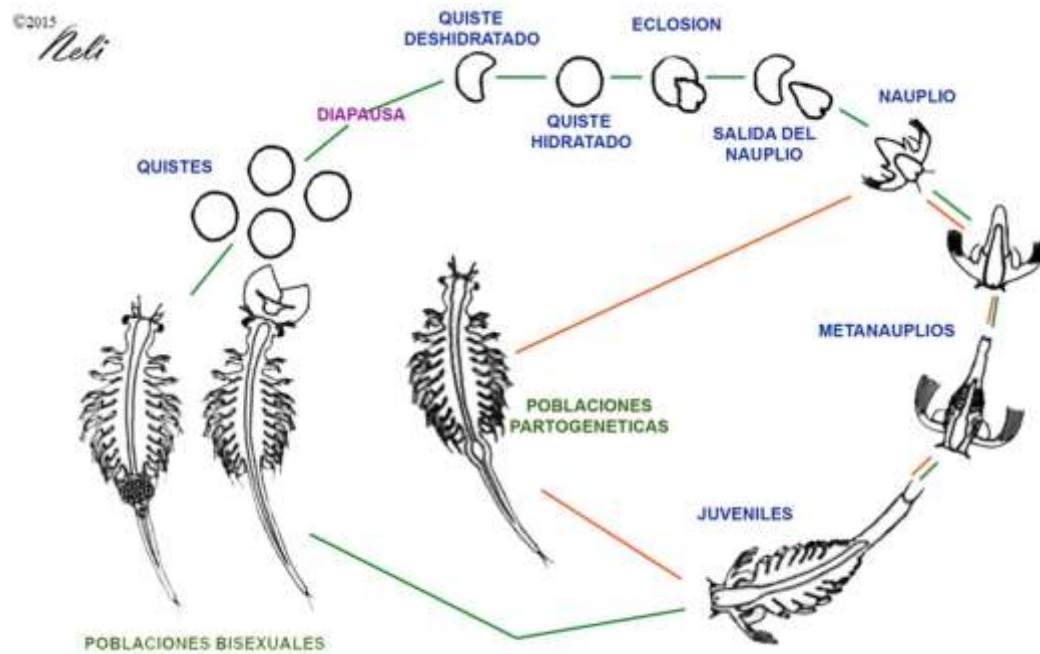


Figura 1. Ciclo de vida de la *Artemia salina*. Tomado de Neli Martín 2015

En este estado, el nauplio mide entre 400 y 500 micras, tiene tres antenas y es de color naranjado por las capas de vitelo de las cuales se está alimentando aun en esta etapa ya que no tiene el sistema digestivo en funcionamiento. En la etapa de metanauplio, el aparato digestivo se desarrolla completamente y su alimentación cambia a algas microscópicas. Tras 15 mudas pasa a ser adulto y las características son como se observan en la **Figura 2**, tiene ojos laterales a ambos lados del ojo naupliar y tiene apéndices lobulares pares en la región del tórax que con el tiempo se diferencian en toracópodos (Munteanu et al., 2011).

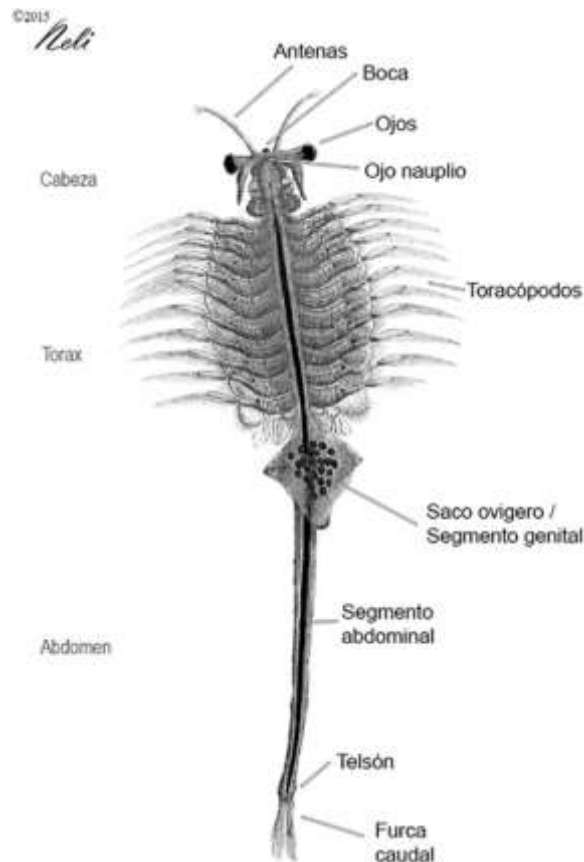


Figura 2. Anatomía de la *Artemia salina*. Tomado de Jaime Yockteng (2017).

Además, tiene un sistema osmorregulador que le permite sobrevivir a salinidades inferiores al 5% y superiores a 200%, sin embargo, su crecimiento óptimo se da en rangos de salinidad entre 15 y 40 %. La *Artemia salina* es un animal euritermo, soporta entre 5 y 40°C, pero se adapta mejor en temperaturas entre los 24 y 28°C, cuentan con la capacidad de adaptarse a ambientes con poco oxígeno disuelto como los ambientes hipersalinizados (Fernanda, 2021).

1.3.2 Evaluación de la toxicidad en *Artemia salina*.

La *Artemia salina* es el único género animal disponible como quistes (estado criptobiótico), para utilizarse en ensayos biológicos, pues ofrece ventajas prácticas como disponer siempre de los individuos en la misma edad y condición física, la disponibilidad para realizar pruebas y no es

necesario mantener una colonia viva permanentemente (Munteanu et al., 2011). Se han empleado por aproximadamente 40 años en estudios de toxicidad y ecotoxicidad por practicidad y bajo costo para el estudio de bioactividad de productos naturales (Pino et al. 2010).

Los ensayos de letalidad se basan en la búsqueda de causar la muerte a las larvas de este crustáceo fue desarrollado por Vanhaecke & Persoone, (1984) tal como una herramienta sencilla para determinar toxicidad de sustancias y extractos en medio salino, se ha empleado en la determinación de toxinas de hongos y cianobacterias, toxicidad de extractos de plantas, metales pesados y compuestos puros (Lopes et al., 2010; Parra et al., 2001; Reddy & Osborne, 2020).

2. Estado del arte.

2.1 Generalidades de la síntesis de nanopartículas metálicas empleando especies vegetales.

En la síntesis de nanopartículas se emplean materiales que son tóxicos con el medio ambiente, por ello la síntesis verde representa una alternativa en donde se puede llevar a cabo esta síntesis en plantas de manera intra o extracelular ya que estas pueden reducir los iones inorgánicos en NPs a nivel superficial o en algunos tejidos, una vez han crecido las plantas, se extraen después de secarlas o se producen a partir del extracto acuoso el cual representa el método más rápido y práctico para esto (Berenice et al. 2016).

Muñoz et al. (2021) realizaron la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) empleando extractos de *Azadirachta indica*, *Aloe vera* para probar su aplicación como agente antibacteriano para sustratos textiles. Se confirmó la síntesis con espectrofotometría UV-Vis, espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de barrido. La actividad antibacteriana se probó empleando la norma ISO 207423:2007 contra la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y concluyeron que las NPs de

ZnO se pueden emplear como agentes antibacterianos en textiles ya que la síntesis verde es sencilla y el material vegetal es de fácil acceso.

Por otra parte, Aswathi et al. (2022) realizaron una revisión detallada acerca de la síntesis verde de NPs a partir de extractos de residuos biodegradables como cáscaras de plátano, patilla, mandarina, mango, cebolla, granada, zapote, tamarindo y huevo. La síntesis de AgNPs empleando el extracto de *Tamarindus indica* actúan como agente terapéutico en el tratamiento de cáncer de mama y el extracto de la cascara de plátano es un agente reductor natural que se puede emplear para la síntesis de las AgNPs. El extracto de cáscara de granada también se puede emplear como agente reductor para la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs). También emplearon la técnica de sensibilidad de Kirby-Bauer para evaluar actividad antibacteriana contra *E. coli* y *Staphylococcus epidermidis*, las NPs metálicas demostraron gran potencial inhibitorio de crecimiento bacteriano. También se reportó que la síntesis de ZnONPs empleando extractos de residuos del tallo de *Musa balbisiana* Colla tiene efectividad antibacteriana contra bacterias gram positivas y gram negativas entre ellas *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* y *P. aeruginosa* debido a que los iones Zn^{2+} se unen a las membranas celulares de las bacterias y producen especies reactivas de oxígeno lo que causa la inhibición de la transcripción, la traducción, la actividad enzimática, la cadena de transporte de electrones, inactiva las proteínas y destruye el ADN lo que conduce a la destrucción de las células bacterianas (Aswathi et al. 2022).

En el tratamiento de aguas residuales domésticas, también es posible emplear NPs sintetizadas a partir de extractos de plantas como la *Physalis Peruvuana L* (uvilla), el cual en un estudio reportado por Moreno et al demostraron que estas NPs tuvieron actividad antibacteriana

frente a *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klesbsiella pneumoniae*, *Salmonella parathypi*, *Pseudomona oryzihabitans*, *Edwardsiella tarda* y *Shigella flexnery* (Moreno et al. 2022).

2.2 Uso de la *Artemia salina* en la evaluación de la toxicidad de extractos naturales.

En Bélgica, existe el centro de referencia de *Artemia*, investigadores desarrollaron un ensayo para estudiar la toxicidad aguda a corto plazo conocido como Ensayo del Centro de Referencia de *Artemia* o ARC-TEST basado en la determinación de la LC50 de unas larvas específicas de *Artemia* y como resultado se obtuvo que la repetibilidad y reproducibilidad son similares al usar *Daphnia spp* y *Brachydanio spp*, concluyendo que el ensayo es valioso para evaluar toxicidad para el ambiente marino, se emplea esta especie por la alta disponibilidad en forma de quistes los cuales eclosionan fácilmente.

El uso de este modelo animal ha permitido evaluar actividad plaguicida y farmacológica empleando una gran cantidad de compuestos químicos y naturales. Meyer et al. (1982) realizaron ensayos para evaluar la actividad antitumoral de 41 especies de *Euphorbiaceae*, utilizando larvas de *Artemia spp* como pioneros, donde encontraron una buena relación entre la mortalidad de las larvas y la citotoxicidad con células 9KB y 9PS.

Pino et al. (2010) realizaron un ensayo empleando 123 extractos obtenidos de diferentes plantas y evaluó la toxicidad frente a *Artemia salina* con la intención de obtener nuevas fuentes de plaguicidas aportando alternativas eficaces en el desarrollo en donde *Artemia salina* representó un valioso instrumento en la investigación. En la búsqueda de plaguicidas de origen natural, se lograron aislar derivados de la acetogenina, provenientes de plantas de la familia *annonaceae* como la guanábana, con actividad insecticida, los cuales pueden actuar como veneno para especies de lepidópteros y *leptinotarsa decemlineara say* (escarabajo de la patata). Además, se encontró que el extracto de *Annona squamosa L* tiene efecto plaguicida frente a *Plutella xylostella L* y la

annonacina, el cual es un compuesto químico con efectos bastante tóxicos, tuvo un efecto citotóxico elevado frente a la *Artemia salina*.

2.3 Uso de *Artemia salina* para evaluar nanopartículas biosintetizadas.

Las AgNPs provocan un aumento de mortalidad en las células apoptóticas generando daños en el ADN. En un estudio realizado por Alam (2022) la *Artemia salina* se empleó para estudiar la ecotoxicidad de las AgNPs sintetizadas a partir de extracto de orujo de fresa, las cuales a una alta concentración mostraron ser ecotóxicas, además, se emplearon las AgNPs para analizar la degradación del colorante rojo de metilo y se concluyó que se pueden emplear estas NPs como fotocatalizadores para la remediación del medio ambiente y en aplicaciones biológicas.

Faisal et al. (2021) sintetizaron ZnONPs a partir de extractos de *Myristica fragrans* (nuez moscada) las cuales se caracterización por técnicas como DRX, FTIR, UV-vis, SEM, TEM, DLS y TGA. Observaron una alta capacidad antioxidante y fotocatalítica, además realizaron estudios de letalidad empleando el modelo animal de *Artemia salina* y encontraron que la toxicidad de las NPs depende de la concentración empleada, entre más concentrado este, más tóxicas serán para el medio ambiente. Actualmente la síntesis verde es el procedimiento más empleado en la síntesis de nanopartículas para evitar los daños al medio ambiente, por ello se han empleados también extractos de *Anchusa arvensis* para sintetizar AgNPs y estas demostraron tener actividad antileishmania y en el modelo animal de *Artemia salina* las AgNPs tuvieron una letalidad a altas concentraciones (Jamshed et al. 2022).

3. Objetivos.

3.1 Objetivo general.

Evaluar la toxicidad de las nanopartículas de plata sintetizadas en conjunto con el extracto vegetal de *M. oleifera* en el modelo animal de *Artemia salina*

3.2 Objetivos específicos.

- Sintetizar nanopartículas de plata empleando como agente reductor el extracto de *M. oleifera*
- Caracterizar las nanopartículas de plata sintetizadas mediante las técnicas UV-Vis, DLS y SEM.
- Evaluar la toxicidad de las AgNPs sintetizadas sobre el modelo biológico Artemia Salina y células Linfoma del Manto de colon (LCM).

4. Metodología.

4.1 Preparación del extracto de *M. oleifera*

Las AgNPs se prepararon siguiendo la metodología empleada por (Romero, M. 2021.) en donde se utilizará el extracto de la *M. oleifera* como agente reductor y estabilizante. El extracto se preparó pesando y secando el material en un horno convectivo marca Lem a 54°C durante 12 h, después se molió para reducir el tamaño de las partículas y se clasificó granulométricamente con tamices para conservar las partículas entre 30 y 40 mesh (diámetro de partícula entre 0,5 y 0,6mm). El material vegetal se conservó a temperatura ambiente para las posteriores preparaciones.

El extracto se preparó añadiendo el material vegetal seco con agua desionizada como solvente en un envase de vidrio, a temperatura ambiente, pH de 4 y una relación de solido/solvente de 30%p/v y se dejó almacenado por 24 h. Después, se separó el sobrenadante empleando un

tamiz y se centrifugo en una centrifugadora marca Tangkula 800-1 a 3000 rpm durante 10 minutos y se almaceno el sobrenadante a 5 °C hasta la preparación de las AgNPs.

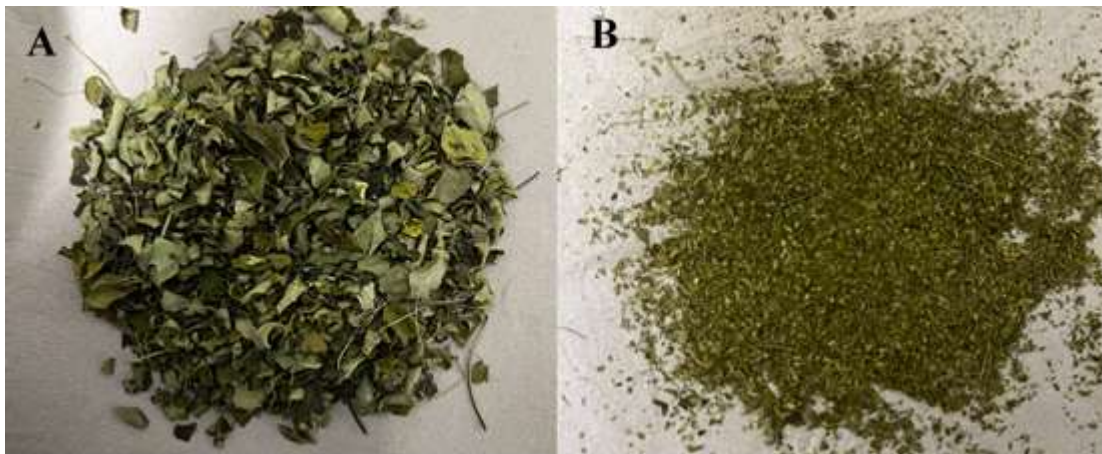


Figura 3. *Moringa Oleifera* A). Material vegetal seco. B). Material vegetal molido.

4.2 Síntesis de nanopartículas de plata.

Las AgNPs se sintetizaron empleando el método reportado por Romero, M. (2021). Para esta síntesis, se utilizó una temperatura de 80°C, una concentración de NaOH de 5mM y una concentración de Ag₂SO₄ de 9mM. La síntesis de las AgNPs se realizó preparando una solución de 100 mL de Ag₂SO₄ 9 mM, que se agitó (1600 rpm) constantemente a una temperatura de 80°C, después se le añadió 25 mL del extracto de *M. oleifera* y seguido 100 µL de NaOH 5 mM y al cabo de 20 minutos se retiró y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 1 hora.

4.3. Caracterización de AgNPs.

4.3.1. Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-vis).

Se obtuvieron espectros UV-Vis mediante la adición de 3mL de la solución de AgNPs en una cubeta de cuarzo (serie 104-QS). El equipo de ultravioleta empleado fue el espectrofotómetro marca Drawell modelo DU-8200, con lámpara de deuterio y tungsteno, la medición se realizó entre el rango de 200 a 700nm con un ancho de banda espectral de 1.0 slit. La absorbancia máxima fue

de 423 nm con lo cual fue posible conocer la longitud de onda máxima de la resonancia del plasmón superficial que es característico de las AgNPs.

4.3.2. *Dispersión de la luz en modo dinámico (DLS).*

Las medidas del tamaño de las nanopartículas se realizaron en un equipo Zetasizer Nano S90 Malvern en donde se agregó 1mL de muestra en una cubeta 4 caras de vidrio transparente. Se realizaron 3 mediciones en donde cada una tiene 10 scans, de manera que se promediaron las medidas para obtener un dato más confiable. Se tomaron los datos de diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersidad (ver parámetros en la **Tabla 1.**)

Número de Mediciones	Temperatura °C	Dispersante	Índice e refracción del dispersante
3	25	Agua	1.33

Tabla 1. Parámetros para la medición de AgNPs para el tamaño y potencial zeta.

4.3.3. *Potencial zeta.*

La potencial zeta de las AgNPs se midió en el equipo Zetasizer Nano S90 Malvern en una celda capilar (referencia: DTS1070) para potencial zeta a la cual se le añadió 1mL de muestra como se muestra en la **Figura 4B** siguiendo los parámetros presentados en la tabla 1.

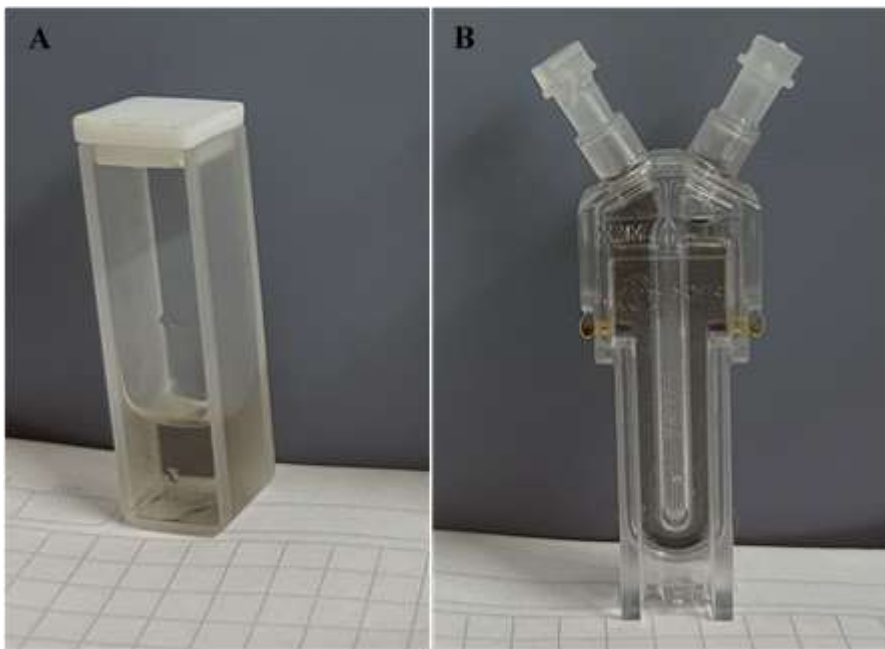


Figura 4. Celdas para medición de tamaño y potencial zeta. A) celda para medir tamaño de partícula. B) celda para medir potencial zeta.

4.4 Pruebas de toxicidad empleando el modelo animal de *Artemia salina*.

Para la evaluación de la toxicidad de las AgNPs se empleó el modelo animal de *Artemia salina* por su disponibilidad en forma de quistes secos y a su fácil manejo. La *Artemia salina* se adquirió del proveedor Brine Shrimp Direct de Estados Unidos.

Para la eclosión se requiere retirar el corion de los quistes, por ello primero se hidrataron en un recipiente con agua marina con ayuda de un aireador para que adquirieran forma esférica, esto durante una hora. Los quistes se tornaron de color naranja lo cual fue indicativo de que se eliminó correctamente el corion (Sorgeloos et al. 1977)

Para esta prueba de toxicidad se empleó el procedimiento planteado por (Vanhaecke et al. 1981) en donde para la eclosión y preparación de los nauplios se incubaron 100 mg de quistes en 100mL de agua de mar de concentración 35%p/v, en un frasco de vidrio a 25°C, con iluminación lateral por una bombilla con intensidad de 500 lux.

Seguido, se mantuvieron en suspensión constante mediante aireación suave proporcionada por un tubo de aire que se extendió hasta el fondo del dispositivo de incubación. Al pasar entre 24 horas, se detuvo la aireación y los nauplios se extrajeron con una pipeta Pasteur suavizada y se pasaron a un matraz con 200mL de agua de mar que se aireara suavemente. Los nauplios se conservaron 24 horas a 25°C. Seguido, se tomó una alícuota de nauplios en una caja Petri para distribuirlos manualmente a los pozos con las soluciones correspondientes.

Para la realización de la prueba de toxicidad, que se llevó a cabo en placas de 6 pozos, se transfirieron 20 nauplios con una pipeta Pasteur a cada uno, los cuales contiene un máximo de agua de mar de 4mL. Se mantuvieron en incubación a una temperatura de 25°C y a la oscuridad. Después de 24 horas, se contaron el número de especies muertas en cada pozo para conocer la mortalidad de las soluciones. Se consideraron muertos aquellos que después de 10 segundos no presentaran movimiento.

Para la prueba preliminar, se prepararon soluciones de AgNPs de concentración de 1,4; 2,8; 24,6; 49,1 y 73,67µg/mL (Fernanda, 2021).

5. Resultados y Discusión.

5.1 Síntesis y caracterización de AgNPs.

Siguiendo el diseño experimental, se utilizaron variables de entrada como la concentración de NaOH (5mM); concentración de Ag₂SO₄ (9mM) y temperatura de síntesis (80°C). Como se observa en la **Figura 5**, se logró la síntesis de nanopartículas con una coloración marrón oscura como lo reportó Romero, M. (2021) lo que indica, que la formación de nanopartículas de plata (AgNPs) se debe a la biorreducción de iones plata de Ag⁺ a Ag por los compuestos reductores de la moringa (Huong & Nguyen, 2021). Asimismo, las AgNPs obtenidas fueron sometidas a análisis mediante espectroscopia UV-Vis con el propósito de determinar su banda característica; un

análisis con Microscopía electrónica de Barrido (SEM) y Dispersión de Luz Dinámica (DLS) para determinar la morfología y distribución del tamaño de partícula. Finalmente, se procedió a determinar la carga superficial de las AgNPs mediante mediciones del potencial zeta.



Figura 5. Solución de nanopartículas de plata

5.1.1 *Caracterización de partículas de AgNPs por UV-Vis.*

Una vez concluida la síntesis de las nanopartículas de plata (AgNPs), se procedió a tomar espectros de UV-Vis de más de 10 réplicas distintas de AgNPs sintetizadas, con el propósito de evaluar la formación y estabilidad de las mismas, fenómenos que están intrínsecamente ligados a la resonancia del plasmón superficial (SPR) (Edison & Sethuraman, 2017; Gopinath et al., 2012; Iravani et al., 2014). La resonancia del plasmón superficial es un fenómeno óptico que ocurre cuando la luz incide sobre una nanopartícula metálica, generando oscilaciones colectivas de los electrones de la superficie, lo que resulta en una absorción y dispersión características de la luz.

Sin embargo, por razones de claridad en la presentación de los resultados se presenta únicamente el espectro correspondiente al plasmón de mayor intensidad en este documento, mientras que los demás están disponibles en la sección de anexos.

En la **Figura 6**, se observa el espectro UV-Vis de las AgNPs sintetizadas, abarcando un intervalo de longitud de onda de 200 a 700nm. En dicho espectro, se distingue un pico de absorbancia máximo ubicado aproximadamente en 423nm asociado al efecto de resonancia del plasmón superficial de las AgNPs (Fernanda, 2021; Iravani et al., 2014; Kannan et al., 2010; Ovais et al., 2016).

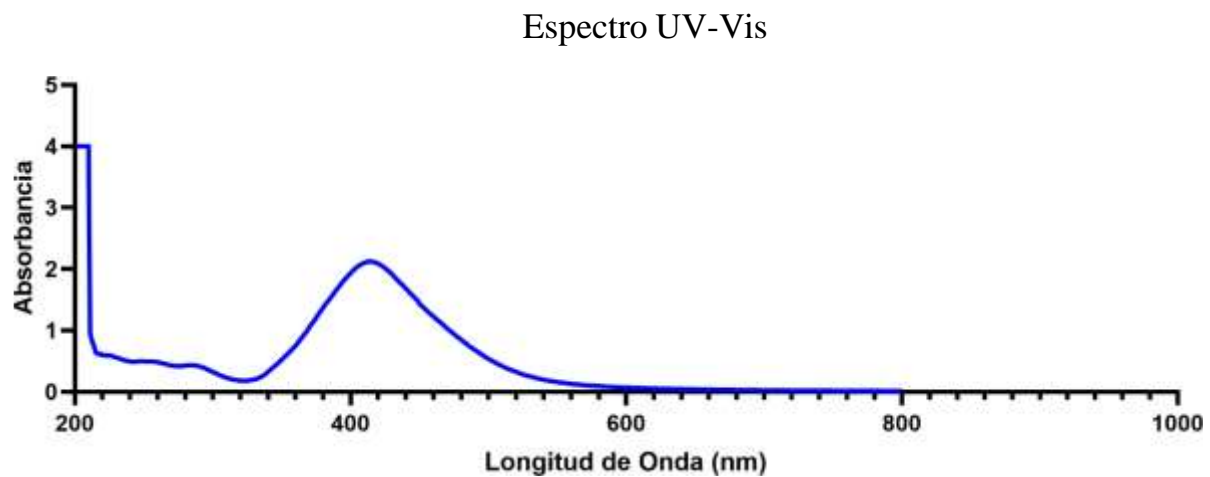


Figura 6. Espectro UV-Vis de las AgNPs sintetizadas.

De acuerdo con la literatura, Chen & Yeh, (2002), afirman que la desviación de la banda plasmónica de Ag coloidal hacia longitudes de onda mayores o la falta de definición aguda en la banda plasmónica de la plata coloidal, indica la posible formación de las AgNPs con un tamaño promedio mayor a 200nm o la presencia de aglomeraciones, sugiriendo un tiempo de reducción insuficiente durante la síntesis anterior. Por consiguiente, en el espectro UV-Vis se evidencia una banda de absorción ancha, indicativa de una probable aglomeración o un tamaño considerable de las AgNPs.

Para validar estos resultados, se realizó una caracterización del tamaño de las partículas utilizando técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de barrido (SEM), con el fin de proporcionar una evaluación más detallada de las propiedades morfológicas y dimensionales de las nanopartículas, corroborando así la posible aglomeración o el tamaño aumentado de las AgNPs según los resultados obtenidos por el espectro UV-Vis.

5.1.2. Caracterización de partículas de AgNPs por DLS.

Para profundizar en el estudio de la morfología de las AgNPs y verificar los resultados del análisis de UV-Vis, se obtuvieron imágenes visuales con mediciones de SEM. Estas revelaron que el tamaño de las AgNPs varía entre 500nm y 2 μ m. Asimismo, se pudo observar la presencia de aglomeraciones claramente visibles en la muestra de AgNPs (**Figura 7**). Este fenómeno puede

atribuirse a diversas causas, como condiciones de síntesis subóptimas, tiempo de reducción inadecuado o variaciones en las concentraciones de los reactivos (Bae et al., 2013).

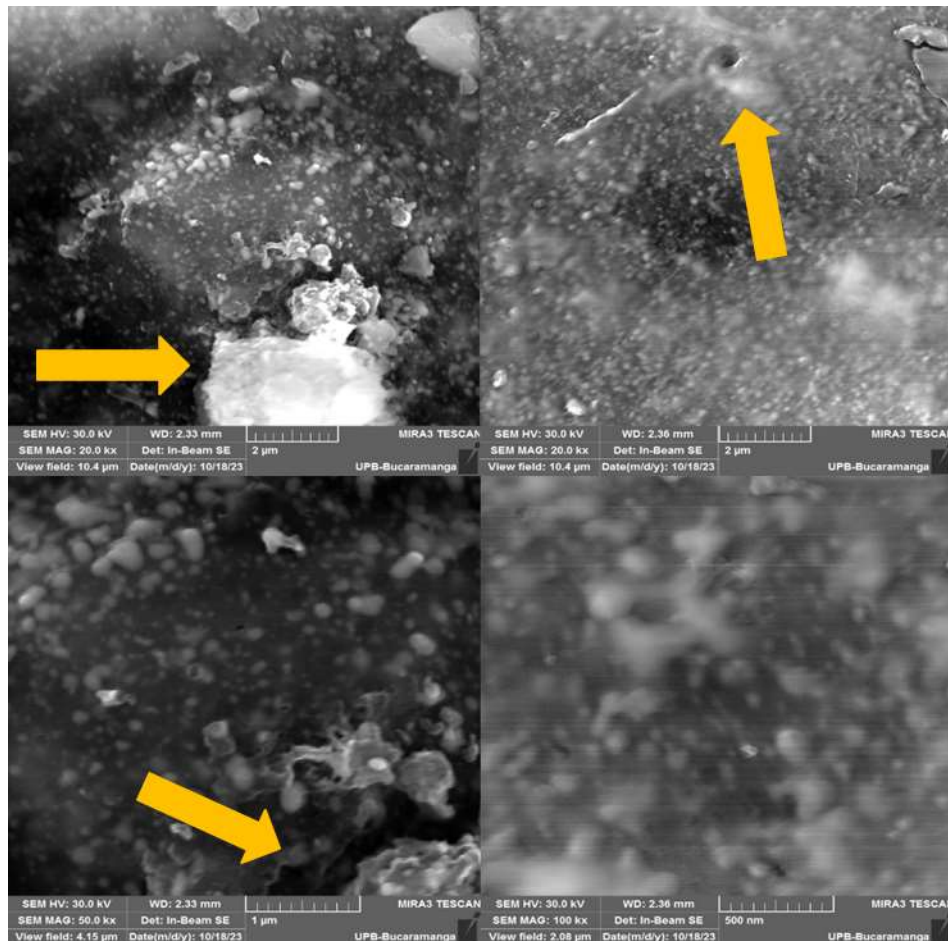


Figura 7. Imagen de Microscopía Electrónica de Barrido de las AgNPs. A) AgNPs con objetivo de 20.000x; B) AgNPs con objetivo de 20.000x; C) AgNPs con objetivo de 50.000x, D) AgNPs con objetivo de 100.000x.

Nota: Las flechas en amarillo resaltan la presencia de aglomeraciones en las AgNPs sintetizadas

Es importante destacar que los resultados obtenidos en este estudio difieren de los hallazgos previamente publicados por Fernanda, 2021. Fernanda reportó que las AgNPs sintetizadas presentaban una morfología uniforme con tamaños que varían entre 70 y 105nm, sin evidencia significativa de aglomeraciones. La presencia de aglomeraciones significativas observadas en las imágenes SEM sugiere que las condiciones de síntesis pueden haber variado entre los dos estudios, posiblemente debido a fluctuaciones en la temperatura, el pH, o la concentración de reactivos durante el proceso de síntesis (Ovais et al., 2016). Además, otros factores, como la pureza de los

reactivos o la calidad del agua utilizada en la síntesis pueden haber contribuido a estas disparidades (Bae et al., 2013). Estas diferencias podrían explicar la variación en la morfología y tamaño de las AgNPs entre los dos estudios. Por lo tanto, se requieren investigaciones adicionales para identificar con precisión las causas subyacentes de estas diferencias y optimizar las condiciones de síntesis para obtener resultados consistentes y reproducibles.

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante DLS proporcionaron información adicional sobre la distribución del tamaño de partícula. Se observó una tendencia hacia la presencia de partículas de un tamaño considerable, en un intervalo aproximado de 1,161 μm y 2,2623 μm con un índice de polidispersidad de 0,3 y 0,559 respectivamente (**Figura 8**). Esto también sugiere,

la posible presencia de aglomeraciones o contaminantes en la posible formación de AgNPs durante el proceso de síntesis (Bae et al., 2013; Ovais et al., 2016).

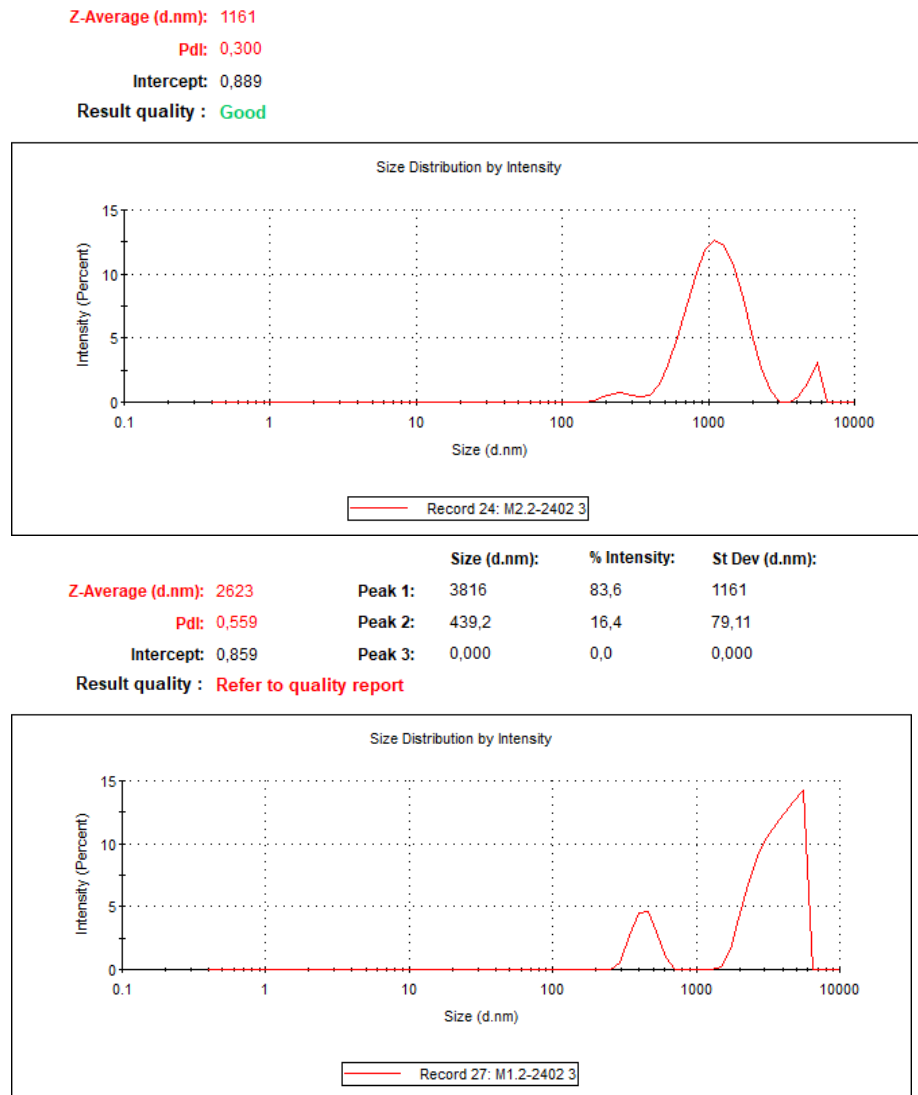


Figura 8. Distribución de tamaño de partícula para AgNPs.

Nota: La imagen A muestra la distribución de tamaño de las nanopartículas de plata (AgNPs) con el tamaño de partícula más pequeño observado. la imagen B revela la distribución de tamaño de las AgNPs con el tamaño de partícula más grande observado. Estas distribuciones reflejan la variabilidad en el tamaño de las partículas sintetizadas en este estudio.

Es fundamental resaltar que la presencia de aglomeraciones en las AgNPs puede tener ramificaciones significativas en sus propiedades y aplicaciones. En primer lugar, la estabilidad de

las AgNPs se ve comprometida cuando se forman aglomeraciones, puesto que, se puede aumentar la probabilidad de sedimentación o precipitación de las partículas en suspensiones o dispersiones coloidales. Esta falta de estabilidad puede limitar la vida útil de las AgNPs en sistemas de liberación controlada de fármacos (Bae et al., 2013).

Además, la capacidad de dispersión de las AgNPs, también se ve afectada. En sistemas dispersos, como recubrimientos o dispersiones en medios acuosos, es crucial que las AgNPs estén bien dispersas para garantizar una distribución uniforme y una interacción efectiva con otros componentes. Las aglomeraciones pueden dificultar esta dispersión uniforme, lo que a su vez puede reducir la efectividad de las AgNPs en aplicaciones como recubrimientos antibacterianos (Bae et al., 2013).

Adicionalmente, las aglomeraciones pueden influir en la reactividad química de las AgNPs. La superficie de las partículas es crucial para muchas de sus propiedades y aplicaciones, puesto que, es donde ocurren las interacciones con otras especies químicas. Cuando las AgNPs están aglomeradas, la accesibilidad de su superficie se ve comprometida, lo que puede disminuir su capacidad para interactuar con biomoléculas (Bae et al., 2013).

Por lo tanto, estos resultados, subrayan la necesidad de optimizar los parámetros de síntesis para obtener AgNPs con propiedades morfológicas y dimensionales deseables, así como para maximizar su eficiencia y aplicabilidad en diversas áreas, como la nanomedicina. Además, este estudio subraya la relevancia de utilizar una combinación de técnicas de caracterización avanzadas para obtener una comprensión completa de las propiedades de las nanopartículas sintetizadas y orientar futuras investigaciones hacia la mejora de los procesos de síntesis y la optimización de las propiedades de las AgNPs.

Por último, se realizó un cálculo del potencial zeta para determinar la estabilidad y capacidad de dispersión de las AgNPs, lo cual proporciona información adicional sobre su comportamiento coloidal y su viabilidad.

5.2 Determinación de Potencial Zeta.

La determinación potencial zeta es un parámetro fundamental en la caracterización de nanopartículas, puesto que, proporciona información sobre la estabilidad de la carga superficial en suspensiones acuosas (Clogston & Patri, 2011). En este estudio, se llevó a cabo la determinación del potencial zeta de las nanopartículas de plata (AgNPs). Se observó un valor de carga de -16,8 mV, una cifra cercana a la reportada por Fernanda, 2021 (**Figura 9**).

Zeta Potential (mV): -16,8
Zeta Deviation (mV): 3,95
Conductivity (mS/cm): 1,15
Result quality : Good

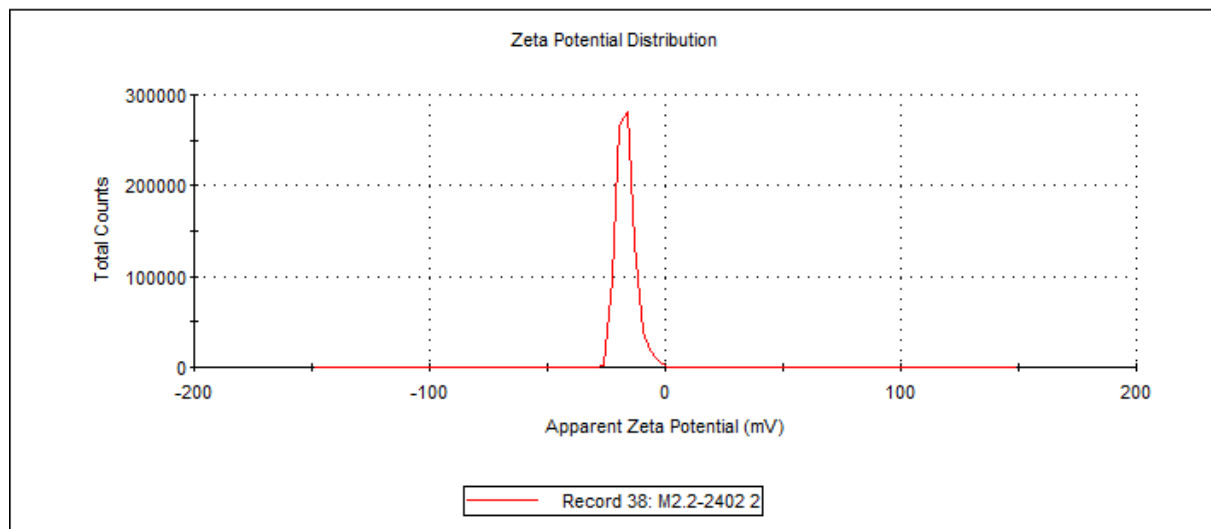


Figura 9. Gráfico del potencial zeta para las AgNPs

Los resultados del potencial zeta para las AgNPs revelan valores negativos, lo que sugiere que el agente de recubrimiento utilizado es eficaz en la estabilización de estas nanopartículas. Esta estabilización se logra mediante la introducción de cargas negativas en la superficie de las

partículas, lo que genera una repulsión electrostática que mantiene las nanopartículas separadas y previene su aglomeración (Ovais et al., 2016). En este caso, la carga negativa refleja la adsorción de iones hidroxilo (OH⁻) provenientes del agua y del reactivo NaOH en la superficie de las nanopartículas de plata, contribuyendo al aumento del potencial zeta y fortaleciendo la repulsión electrostática entre las partículas.

Este mecanismo es esencial para evitar la aglomeración y, por consiguiente, mantener la estabilidad de las nanopartículas en suspensión. Es relevante destacar que los iones hidroxilo desempeñan un papel importante en la prevención de la formación de agregados, lo que facilita el mantenimiento del tamaño y la dispersión de las nanopartículas de plata dentro del medio coloidal (Sholikhah et al., 2018).

No obstante, se establece convencionalmente para suspensiones un umbral de estabilidad en 30mV. Las partículas con potenciales zeta más positivos o negativos que este valor se consideran generalmente estables, aunque un potencial superior a 15mV indica una suspensión próxima al punto de aglomeración (Bae et al., 2013).

En este contexto, se observa que el potencial de las AgNPs se sitúa cercano al umbral de la aglomeración, lo que sugiere que la reacción de reducción de los iones Ag⁺ demanda un tiempo prolongado para su finalización, probablemente debido al bajo potencial de reducción del NaOH (Krüger et al., 1968). Por ende, la falta de conclusión en esta reducción podría resultar en la formación de nanopartículas aglomeradas (Figura 9).

A pesar de que el mecanismo de estabilización con iones hidroxilo es crucial, las condiciones experimentales subóptimas, como fluctuaciones en la temperatura, pH inadecuado o la pureza de los reactivos, pueden haber comprometido su eficacia, resultando en la formación de aglomeraciones. Estas observaciones nos permiten resaltar la necesidad de optimizar los

parámetros de síntesis para obtener las nanopartículas con mayor estabilidad y evitar las aglomeraciones observadas.

5.3 Actividad biológica de las AgNPs evaluada en *Artemia salina*.

La presente sección tiene como objetivo analizar los resultados obtenidos de la evaluación del potencial biológico de las nanopartículas de plata sintetizadas cuando fueren expuestas al modelo *Artemia salina*. Las AgNPs han demostrado potencial en diversas aplicaciones biológicas debido a sus propiedades de permeación de membranas, lo que sugiere su capacidad para interactuar efectivamente con organismos vivos como *Artemia salina* y potencialmente influir en su viabilidad.

En primera instancia se evaluó la toxicidad de las AgNPs sintetizadas en los nauplios modelo animal *Artemia salina* mediante la exposición a cinco concentraciones iniciales 1,4µg/mL; 2,8µg/mL; 24,6µg/mL; 49,1µg/mL y 73,67µg/mL. Estas concentraciones se seleccionaron en base a estudios previos realizados por Fernanda, (2021) en Zumotec S.A. determinando su relevancia para la evaluación de toxicidad en sistemas biológicos.

La mortalidad registrada en los ensayos alcanzó valores cercanos al 90% en todas las concentraciones evaluadas. Estos resultados sugieren que las dosis iniciales fueron excesivamente altas, por lo cual, fue necesario ajustar las condiciones experimentales. Por ende, se procedió a reducir las concentraciones con el fin de obtener una viabilidad óptima del ensayo.

En este sentido, en la **Tabla 2** se observan las concentraciones evaluadas.

	Concentración
Control positivo (C+)	20000 ppm
Control Negativo (C-)	35% p/v

Blanco 1 (B1)	1,4 µg/mL
Blanco 2 (B2)	0,8 µg/mL
Blanco 3 (B3)	0,4 µg/mL
Blanco 4 (B4)	0,1 µg/mL
Blanco 5 (B5)	0,04 µg/mL
Concentración 1 (C1)	0,04 µg/mL
Concentración 2 (C2)	0,1 µg/mL
Concentración 3 (C3)	0,4 µg/mL
Concentración 4 (C4)	0,8 µg/mL
Concentración 5 (C5)	1,4 µg/mL

Tabla 2. Actividad biológica de las AgNPs en *Artemia salina*.

En el estudio se evaluaron distintos tratamientos organizados en función de su composición y concentración. En primer lugar, el control positivo consistió en glutaraldehído, empleado para validar la sensibilidad del sistema biológico frente a un agente tóxico conocido (Fernanda, 2021). Para el control negativo se utilizó agua de mar al 35% p/v, representando condiciones naturales sin presencia de agentes tóxicos. Los tratamientos denominados B1, B2, B3, B4 y B5 son blancos que corresponden a distintas concentraciones del extracto *Moringa oleifera* diseñados para evaluar la toxicidad intrínseca del extracto. diseñados para evaluar la toxicidad intrínseca del extracto. Finalmente, los tratamientos C1, C2, C3, C4 y C5 representan las mismas concentraciones evaluadas para las nanopartículas de plata (AgNPs) sintetizadas, con el objetivo de determinar su impacto tóxico

La **Figura 10** presenta el porcentaje de mortalidad de los nauplios de *Artemia salina* en función de las concentraciones evaluadas.

Evaluación Toxicidad de AgNPs en *Artemia salina*.

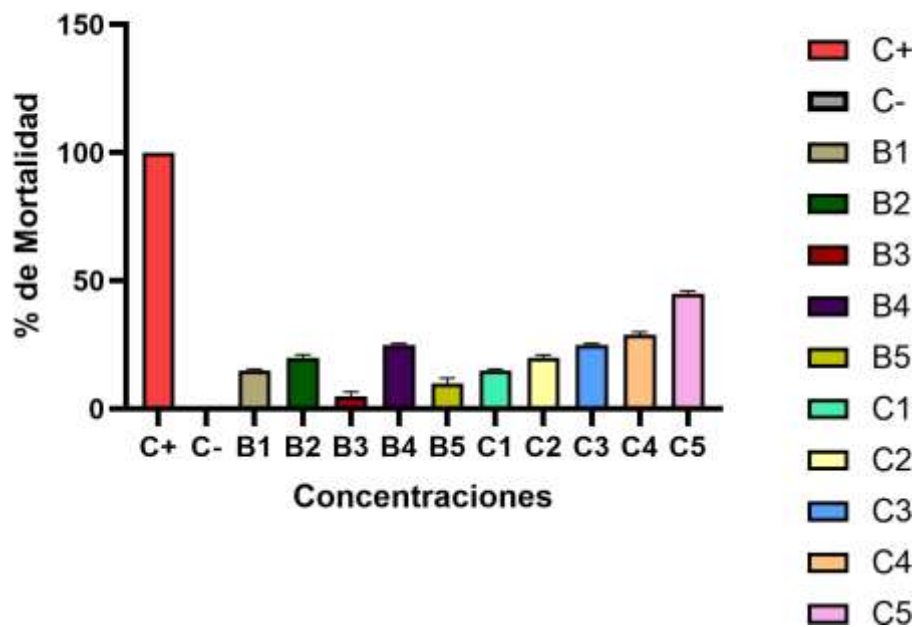


Figura 10. Gráfico de barras de la viabilidad biológica de las AgNPs en *Artemia salina*.

En el análisis de los resultados, se observó que el extracto de *Moringa oleifera* en sí mismo presenta un efecto tóxico moderado sobre *Artemia salina*, evidenciado por una mortalidad del 5 % al 15 % en las concentraciones evaluadas.

Por otro lado, los tratamientos con AgNPs mostraron un incremento progresivo en la mortalidad de *Artemia salina* en función de la concentración, evidenciando una toxicidad dependiente de la dosis. A la concentración más baja (0,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se observó una mortalidad leve (~10%), mientras que, a concentraciones intermedias, como 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las mortalidades alcanzaron valores de aproximadamente 25% y 40%, respectivamente. Las concentraciones más altas, 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, resultaron en mortalidades en valores cercanos al 45%.

De lo anterior, podemos inferir que al evaluar las AgNPs sintetizadas con el extracto como agente reductor y estabilizante, no presenta un incremento sustancial en la toxicidad. Este

comportamiento podría atribuirse a varios factores. En primer lugar, es posible que no exista una interacción sinérgica efectiva entre las nanopartículas de plata y los compuestos activos del extracto, lo que limita el efecto combinado de ambos. Adicionalmente, la reducción de los iones de plata por parte del extracto podría no haber sido óptima, afectando tanto la estabilidad como la actividad biológica de las nanopartículas generadas (Ovais et al., 2016). Otro factor a considerar es la formación de aglomeraciones en las AgNPs, lo que podría haber disminuido su área superficial efectiva y, por ende, su capacidad para inducir toxicidad (Bae et al., 2013).

El análisis de los datos indica que el valor más alto registrado para las AgNPs fue del 45%. Este porcentaje, aunque indica una toxicidad superior al extracto por sí solo, no es suficiente para determinar parámetros como la CL50 o CL90, que requieren mortalidades del 50% y 90%, respectivamente. La ausencia de una mortalidad suficientemente elevada resalta las limitaciones actuales en la formulación de las nanopartículas y respalda la hipótesis de que factores como la falta de sinergia, una reducción incompleta de los iones de plata o la presencia de aglomeraciones pueden estar comprometiendo su efectividad (Bae et al., 2013; Ovais et al., 2016). Por tanto, es fundamental optimizar las condiciones de síntesis y caracterización para mejorar las propiedades funcionales de las AgNPs.

Es importante destacar que estudios previos han reportado resultados donde se han observado efectos citotóxicos en el modelo biológico *Artemia salina* con concentraciones entre 0,01mg/L y 1mg/L de AgNPs, lo que correlaciona con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a las 48 horas de exposición (An et al., 2019). Sin embargo, el uso de extractos naturales como el de *Moringa oleifera* podría interferir en estos efectos, reduciendo su potencial citotóxico debido a mecanismos como las interacciones mencionadas anteriormente.

En conjunto, estos hallazgos subrayan la importancia de investigar las condiciones de formulación, los mecanismos de interacción y la optimización de las AgNPs para comprender mejor sus propiedades y su efecto biológico en modelos relevantes.

5.3.1 Pruebas de viabilidad celular.

Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular utilizando el método de sales de tetrazolio (MTT) para evaluar la actividad biológica de las nanopartículas de plata sintetizadas en células Linfoma del Manto de Colon (LCM). Las concentraciones iniciales evaluadas fueron 0,04µg /mL; 0,1µg/mL; 0,4µg/mL; 0,8µg/mL y 1,4µg/mL (Tabla 3), que fueron previamente evaluadas en el modelo animal de *Artemia Salina*.

En este sentido, en la **Tabla 3** se observan las concentraciones evaluadas con su respectivo porcentaje de viabilidad celular.

Concentración de AgNPs (µg/ml)	Porcentaje de viabilidad celular
0	100
0,04	85
0,1	73
0,4	46
0,8	12
1,4	3

Tabla 3. Actividad biológica de las AgNPs en LCM.

De igual manera, la **Figura 11** establece la relación entre la concentración de AgNPs y la viabilidad celular en el modelo de células Linfoma del Manto de colon (LCM).

Evaluación de Toxicidad de AgNPs en LCM

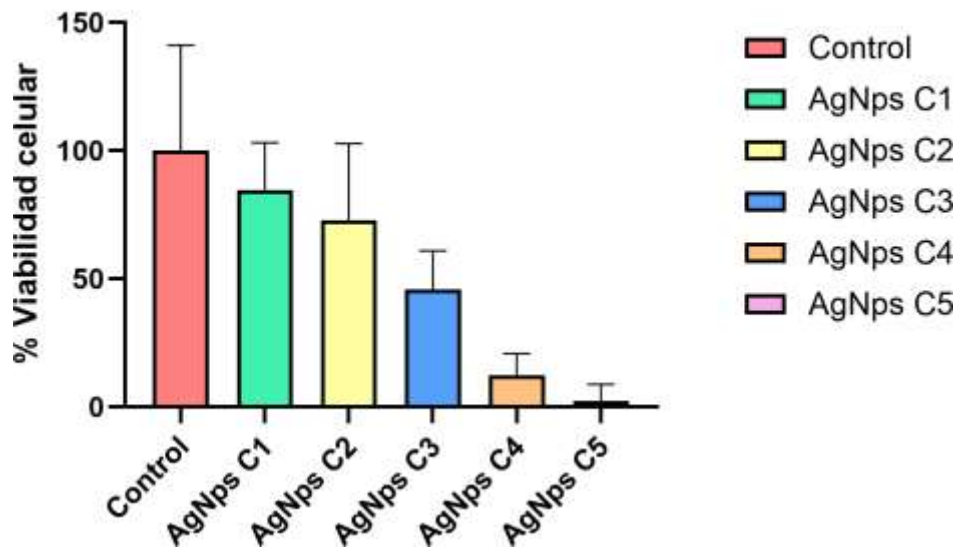


Figura 11. Gráfico de barras de la viabilidad celular de las AgNPs en LCM.

A diferentes concentraciones de AgNPs, se observaron variaciones significativas en el porcentaje de viabilidad celular en el modelo de células LCM. A una concentración 0,04 $\mu\text{g/ml}$, se observó que la de la viabilidad celular fue del 86%. Estos sugieren que las AgNPs interactúan con el sistema biológico, mostrando una viabilidad celular del 86%, con una reducción del 15% en comparación con el control. Este resultado indica una respuesta biológica a las AgNPs a esta concentración sin afirmar efectos adversos significativos sobre la viabilidad celular (Kwak & An, 2015).

Sin embargo, a concentraciones más elevadas de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y 0,4 $\mu\text{g/ml}$, se observó una reducción progresiva en el porcentaje de viabilidad celular, alcanzado valores del 73% y 46% respectivamente. Estas reducciones están próximas al 50%, lo que sugiere una respuesta dosis-dependiente (Kwak & An, 2015). Esta disminución gradual en la viabilidad celular refleja un efecto citotóxico moderado de las AgNPs en las células del modelo biológico, lo que podría

asociarse con una interferencia en la homeostasis celular (del Rocío Coutiño et al., 2017). Por consiguiente, se puede inferir que la concentración letal para el 50% (LC50) está en este rango de concentraciones (0,1-0,4 μ g/ml).

Al considerar concentraciones elevadas de AgNPs, como 0,8 μ g/ml y 1,4 μ g/ml, se observó una disminución drástica en el porcentaje de viabilidad celular alcanzando valores del 12% y 3% respectivamente. Estas reducciones en la viabilidad indican un efecto citotóxico sustancial y severo de las AgNPs a estas concentraciones lo que sugiere una respuesta celular altamente comprometida y una interferencia en la función celular normal (Kwak & An, 2015). Por consiguiente, se puede inferir que la concentración letal para el 90% (LC90) está en el intervalo entre 1,4 μ g/ml y 0,8 μ g/ml.

Es importante destacar que estudios previos han reportado que las nanopartículas de plata inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales promueven la peroxidación lipídica y el estrés proteotóxico, alterando así la integridad celular (Wang et al., 2022). En las células LCM, la peroxidación lipídica podría comprometer las membranas celulares debido al daño en los componentes lipídicos, reduciendo su funcionalidad y aumentando su susceptibilidad a disfunciones metabólicas. Además, el estrés proteotóxico, generado por el desequilibrio entre la acumulación de proteínas dañadas y la capacidad de la célula para repararlas, también podría desempeñar un papel crítico en la citotoxicidad observada. Estos mecanismos sugieren que las AgNPs afectan la homeostasis redox en células LCM, proponiendo su potencial como agentes con propiedades citotóxicas, pero resaltando la necesidad de optimizar su formulación para controlar sus efectos adversos (Snyder et al., 2021).

En síntesis, los resultados obtenidos en este proyecto brindan una visión preliminar sobre los posibles mecanismos de acción de las AgNPs, aunque se requiere un estudio con mayor

profundidad para validar estas hipótesis y comprender completamente su impacto en los ecosistemas acuáticos. En última instancia, este estudio proporciona una base preliminar para futuras investigaciones que profundicen en la comprensión de los efectos de las AgNPs en los organismos acuáticos y en el medio ambiente en general.

6. Conclusiones.

El presente estudio ha permitido la síntesis y caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs) con un rango de tamaño comprendido entre 500nm y 2 μ m. La presencia de partículas aglomeradas sugiere un proceso de síntesis que posiblemente condujo a una reducción rápida de los iones Ag⁺ en un corto período de tiempo. A pesar de la aglomeración observada, las AgNPs exhibieron actividad biológica en los modelos utilizados, destacando su capacidad para afectar la viabilidad celular en el ensayo con células Linfoma del Manto de colon. Estos resultados resaltan la importancia de profundizar en la comprensión de los mecanismos subyacentes a la actividad biológica de las AgNPs, así como de optimizar los métodos de síntesis para mejorar su dispersión y estabilidad. Además, se abre la puerta a futuras investigaciones orientadas a explorar los posibles efectos adversos y beneficios potenciales de estas nanopartículas en diversos contextos biológicos y aplicaciones tecnológicas.

7. Recomendaciones.

Basándose en los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere una serie de recomendaciones que podrían enriquecer investigaciones futuras en el ámbito de las nanopartículas de plata (AgNPs). En primer lugar, se propone la optimización del proceso de síntesis de las AgNPs. Esto podría lograrse mediante la modulación del tiempo de reducción de los iones de plata (Ag⁺) o la exploración de agentes reductores más eficientes. La finalidad es asegurar una reacción completa y, por ende, la obtención de partículas más homogéneas y estables en términos de tamaño

y dispersión. Tal refinamiento en la síntesis podría incidir positivamente en la actividad biológica de las AgNPs y en sus posibles aplicaciones prácticas.

Además, se propone extender la evaluación de las AgNPs a otros modelos biológicos, con el fin de dilucidar su impacto en diversos sistemas biológicos y desentrañar posibles mecanismos de acción adicionales. Este enfoque permitiría una comprensión más holística de la actividad biológica de las nanopartículas y su potencial aplicación en campos como la terapia antimicrobiana, la ingeniería de tejidos o la detección de biomarcadores, entre otros.

Por último, se recomienda llevar a cabo estudios longitudinales para evaluar la persistencia y el comportamiento a largo plazo de las concentraciones de AgNPs encontradas en este estudio. Esta investigación prolongada sería esencial para comprender mejor la estabilidad y los posibles efectos acumulativos de las AgNPs en entornos biológicos, así como su impacto potencial en la salud humana y el medio ambiente. En conjunto, estas recomendaciones podrían contribuir significativamente al avance del conocimiento en el campo de las nanopartículas de plata y sus aplicaciones en biomedicina y nanotecnología.

8. Bibliografía.

Alam, Mahboob. 2022. "Analyses of Biosynthesized Silver Nanoparticles Produced from Strawberry Fruit Pomace Extracts in Terms of Biocompatibility, Cytotoxicity,

Alarcon, C. 2022. "Análisis de La Síntesis Química y Verde de Nanopartículas de Óxidos Metálicos: Ventajas y Desventajas."

An, H. J., Sarkheil, M., Park, H. S., Yu, I. J., & Johari, S. A. (2019). Comparative toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nanowires (AgNWs) on saltwater microcrustacean, *Artemia salina*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 218, 62-69.

Antioxidant Ability, Photodegradation, and in-Silico Studies.” Journal of King Saud University - Science 34(8).

Asharani, I., Thirumalai, D., & Sivakumar, A. (2017). Dendrimer encapsulated Silver nanoparticles as novel catalysts for reduction of aromatic nitro compounds. 263(2), 022010.

Aswathi, V. P., S. Meera, C. G. Ann Maria, and M. Nidhin. 2022. “Green Synthesis of Nanoparticles from Biodegradable Waste Extracts and Their Applications: A Critical Review.” Nanotechnology for Environmental Engineering. }

Bae, E., Lee, B.-C., Kim, Y., Choi, K., & Yi, J. (2013). Effect of agglomeration of silver nanoparticle on nanotoxicity depression. Korean Journal of Chemical Engineering, 30, 364-368.

Baumbach, P., Bilinski, M., Whitmarsh, J., Lorenz, J., Bless, P., & Stein, M. (1995). Evaluating a Thick Film System for All Ag and for Pd/Ag, Au ‘Mixed Metallurgy’ Multilayer Applications. Microelectronics International, 12(2), 18-21.

Berenice Morales-Díaz, América et al. 2016. 7 Rev. Mex. Cienc. Agríc Biomanufacturing of Metal Nanoparticles Using Plant Cells or Plant Extracts.

Berkovich, Liron et al. 2013. *Moringa Oleifera* Aqueous Leaf Extract Down-Regulates Nuclear Factor-KappaB and Increases Cytotoxic Effect of Chemotherapy in Pancreatic Cancer Cells. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/212>.

Beyene, A., Moniruzzaman, M., Karthikeyan, A., & Min, T. (2021). Curcumin Nano-Formulations with Metal Oxide Nanomaterials for Biomedical Applications. Nanomaterials 2021, 11, 460.

Beyene, H. D., Werkneh, A. A., Bezabh, H. K., & Ambaye, T. G. (2017). Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. Sustainable materials and technologies, 13, 18-23.

Carlson, C. et al. 2008. "Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species." *Journal of Physical Chemistry B* 112(43): 13608–19.

Chacón, L, and K Rojas. 2020. Resistance to Disinfectants and Their Relationship with Antibiotic Resistance.

Chen, Y.-H., & Yeh, C.-S. (2002). Laser ablation method: Use of surfactants to form the dispersed Ag nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 197(1-3), 133-139

Chernousova, Svitlana, and Matthias Epple. 2013. "Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal." *Angewandte Chemie - International Edition* 52(6): 1636– 53.

Ciobanu, C. S., Massuyeau, F., Constantin, L. V., & Predoi, D. (2011). Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100 C. *Nanoscale Research Letters*, 6, 1-8.

Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery, 63-70.

Del Rocío Coutiño, E. M., Lagunes, L. Á., & Helguera, O. A. (2017). Las nanopartículas de plata: Mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, 36(2), 39-54.

Diaz Acosta, Edgar Manuel. 2018. "Nanopartículas de Plata: Un Enfoque En Aplicaciones Biológicas." *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología* 12(22):

Dumitrascu, Mioara. 2011. 2 *Balneo-Research Journal Artemia Salina*.
<http://brineshrimp.wordpress.com/>.

Durán, Nelson et al. 2010. 21 J. Braz. Chem. Soc Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, Their Toxicity and Possible Mechanisms of Action.

Edison, T. N. J. I., & Sethuraman, M. G. (2017). Areca catechu assisted synthesis of silver nanoparticles and its electrocatalytic activity on glucose oxidation. *Journal of Cluster Science*, 28, 3139-3148.

Ema, Makoto, Hirokazu Okuda, Masashi Gamo, and Kazumasa Honda. 2017. "A Review of Reproductive and Developmental Toxicity of Silver Nanoparticles in Laboratory Animals." *Reproductive Toxicology* 67: 149–64.

Esquivel, R., and S. Mas. 2021. "Synthesis of Silver Nanoparticles: Review of Potential Use of Trichoderma Species." *Revista Cubana de Química* 33.

Faisal, Shah et al. 2021. "Green Synthesis of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles Using Aqueous Fruit Extracts of Myristica Fragrans: Their Characterizations and Biological and Environmental Applications." *ACS Omega* 6(14): 9709–22.

Falasca, S., and M. Bernabé. 2008. "Potenciales Usos y Delimitacion Del Area de Cultivo de *Moringa Oleifera* En Argentina." *Revista virtual de REDESMA*.

Fernanda, R. P. M. (2021). Efecto Antimicrobiano y Citotóxico de Nanopartículas de Cobre y Plata Sintetizadas Usando Extractos de Moringa oleífera Contra Patógenos Implicados en Infecciones Asociadas a Dispositivo Médico y Sitio Quirúrgico.

Gardea-Torresdey, J L et al. 2002. 71 *Microchemical Journal* XAS Investigations into the Mechanism(s) of Au(III) Binding and Reduction by Alfalfa Biomass.

GBIF. (s.f.), 2017. Fauna en la cuenca del río Amazonas (versión 1.0). GBIF. <https://www.gbif.org/es/dataset/fa8ab13c-52ed-4754-b838-aeff74c79718>

Gopinath, V., MubarakAli, D., Priyadarshini, S., Priyadharsshini, N. M., Thajuddin, N., & Velusamy, P. (2012). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: A novel biological approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 96, 69-74. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.03.02>

Guevara, M., & Lodeiros, C. (2003). Composición bioquímica de nauplios y metanauplios de *Artemia* sp.(Crustacea, Anostraca) proveniente de la salina artificial de Araya, nororiente de Venezuela. *Ciencias marinas*, 29(4B), 655-663.

Holguin, N. 2016. “Evaluación in Vitro de Actividad Inhibitoria de Extractos de *Moringa Oleífera* Lam. Contra *Fusarium Oxysporum* f. Sp. Quitoense, En Plántulas de Lulo (*Solanum Quitoense* Lam.)” Maestría en microbiología agroindustrial. Universidad Católica de Manizales.

Huong, V. T. L., & Nguyen, N. T. (2021). Green synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles using *Sapindus mukorossi* fruit pericarp extract. *Materials Today: Proceedings*, 42, 88-93.

Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6).

https://journals.lww.com/rips/fulltext/2014/09060/synthesis_of_silver_nanoparticles

[chemical,.1.aspx](#)

Jaime Yockteng. 2017. “Biología de La *Artemia* Sp.” <https://www.bioartemia.com/2017/03/03/biologia-de-la-artemia-sp/> (November 29, 2022)

Jamshed, A. et al. 2022. "THP-1 Cells Line Cytotoxicity, Antileishmanial Activity, Brine Shrimp Lethality and Characterization of Silver Nanoparticles Synthesized Using *Anchusa Arvensis* Aqueous Extract." 18(5).

Kannan, N., Selvaraj, S., & Murty, R. V. (2010). Microbial production of silver nanoparticles. *Digest journal of nanomaterials and biostructures*, 5(1), 135-140.

Krüger, H.-J., Rahmel, A., & Schwenk, W. (1968). Elektrochemische messungen in NaOH-schmelzen. *Electrochimica Acta*, 13(3), 625-643. [https://doi.org/10.1016/0013-4686\(68\)87031-8](https://doi.org/10.1016/0013-4686(68)87031-8)

Kwak, J., & An, Y.-J. (2015). A review of the ecotoxicological effects of nanowires. *International journal of environmental science and technology*, 12, 1163-1172.

Meyer, B N et al. 1982. 45 Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents.

Monteagudo, R. et al. 2022. "Evaluation of Anti-Microbial Activity of Extracts of *Moringa Oleifera* Lam. Cultivated in Cuba." *Revista de Producción Animal*.

Moreno, C., E. Yanchapanta, D. Alvarez, and R. Dávalos. 2022. "Green Synthesis of Silver Nanoparticles as a Bactericidal Agent for Domestic Wastewater Treatment." *Revista científica dominio de las ciencias*.

Muñoz-Echeverri, Laura et al. 2021. "Síntesis Verde de Nanopartículas de ZnO Con Actividad Antibacteriana Para Funcionalizar Textiles de Algodón." *Informador Técnico* 85(2).

Neli Martín. 2015. "*Artemia Salina* (Parte II)." *Planeta Neli*. <https://www.planeta-neli.es/index.php/2015/10/20/artemia-salina-parte-ii/> (November 29, 2022).

Pino Pérez, Oriela, and Fanny Jorge Lazo. 2010. 22 *Rev. Protección Veg Artemia Bioassay: Useful Working Tool for Ecotoxicologists and Chemists of Natural Products*.

Ovais, M., Khalil, A. T., Raza, A., Khan, M. A., Ahmad, I., Islam, N. U., Saravanan, M., Ubaid, M. F., Ali, M., & Shinwari, Z. K. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles via plant extracts: Beginning a new era in cancer theranostics. *Nanomedicine*, 11(23), 3157-3177. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0279>

Romero, Ana Sánchez. Efecto de La Temperatura Sobre El Tiempo y La Eficiencia de Descapsulación y Eclosión En El Crustáceo Euritermo *Artemia* Sp.

Romero, M. 2021. Efecto Antimicrobiano y Citotóxico de Nanopartículas de Cobre y Plata Sintetizadas Usando Extractos de *Moringa Oleífera* Contra Patógenos Implicados En Infecciones.

Sholikhah, U., Pujiyanto, A., Lestari, E., Sarmini, E., & Lubis, H. (2018). Critical parameters of silver nanoparticles (AgNPs) synthesized by sodium borohydride reduction. *Res. J. Chem. Environ* Vol. 22 (Special Issue II) August (2018), 22(2), 179-183.

Sorgeloos, Patrick et al. 1977. 12 Aquaculture Decapsulation of *Artemia* Cyst: A Simple Technique for the Improvement of the Use of Brine Shrimp in Aquaculture.

Stevens, C.O., F.D. Ugehe, and K.P. Baiyeri. 2015. "Utilization Potentials of *Moringa Oleifera* in Nigeria: A Preliminary Assessment." *International Letters of Natural Sciences* 40: 30–37.

Vanhaecke, P., G. Persoone, C. Claus, and P. Sorgeloos. 1981. 5 ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY Proposal for a Short-Term Toxicity Test with *Artemia* Nauplii.

Yang, Y., Xu, S., Xu, G., Liu, R., Xu, A., Chen, S., & Wu, L. (2019). Effects of ionic strength on physicochemical properties and toxicity of silver nanoparticles. *Science of The Total Environment*, 647, 1088-1096. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.064>

Zhang, Xi Feng, Zhi Guo Liu, Wei Shen, and Sangiliyandi Gurunathan. 2016. "Silver Nanoparticles: Synthes

Abdussalam-Mohammed, W. (2020). Comparison of chemical and biological properties of metal nanoparticles (Au, Ag), with metal oxide nanoparticles (ZnO-NPs) and their applications. *Adv J Chem Sect A*, 3(2), 111-236.