



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de oro a partir de tibicos.

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

José Francisco Tlaxca Santamaría

Directora: Dra. Abigail Martínez Torres

Codirectora: Dra. Leslie Susana Arcila Lozano

Enero 2025



1. ÍNDICE

1. ÍNDICE	1
2. RESUMEN	6
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1 ALIMENTOS FERMENTADOS	8
3.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS ALIMENTOS FERMENTADOS	9
3.3 FERMENTACIÓN	9
3.4 TIBICOS	10
3.5 CARACTERÍSTICAS DE LOS TIBICOS	12
3.6 MICROORGANISMOS PRESENTES	14
3.7 NANOTECNOLOGÍA Y NANOMATERIALES	15
3.7.1 Nanopartículas de oro	16
3.7.2 Caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs)	16
3.7.2.1 Espectroscopía UV-Vis	18
3.7.2.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	20
3.7.2.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	21
3.7.3 Síntesis de AuNPs	23
3.7.3.1 Métodos físicos y químicos de síntesis	23
3.7.3.2 Síntesis química de nanopartículas de oro de diferentes formas y tamaños	24
3.7.3.3 Biosíntesis de AuNPs	25
3.7.4 Parámetros que controlar en la biosíntesis de AuNPs	34
3.7.4.1 pH	34
3.7.4.2 Temperatura	35
3.7.4.3 Concentración de precursor	35
3.7.5 Mecanismo	36
3.7.6 Aplicaciones de las AuNPs	38
4. JUSTIFICACIÓN	43
5. OBJETIVOS	44
5.1. OBJETIVO GENERAL	44
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	44
6. MATERIALES Y MÉTODOS	45
6.1 DIAGRAMA DE TRABAJO	45
6.2 OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE TIBICOS	46
6.3 OBTENCIÓN DE LOS SOBRENADANTES DE TIBICOS	46
6.4 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	47
6.5 BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	47
6.5.1 Biosíntesis 1 de AuNPs	51
6.5.2 Biosíntesis 2 de AuNPs	51
6.5.3 Biosíntesis 3 de AuNPs	51
6.5.4 Biosíntesis 4 de AuNPs	52
6.5.5 Biosíntesis 5 y 6 de AuNPs	52
6.5.6 Biosíntesis cinética de AuNPs	52

6.6	CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	53
6.6.1	<i>Espectroscopía UV-Vis</i>	53
6.6.2	<i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)</i>	53
6.6.3	<i>Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</i>	53
6.6.4	<i>Análisis de la distribución de tamaño de las AuNPs</i>	54
6.6.5	<i>Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS)</i>	54
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
7.1	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	55
7.2	BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	59
7.2.1	<i>Caracterización de nanopartículas de oro por espectroscopia UV-Vis</i>	60
7.2.1.1	<i>Biosíntesis 1</i>	63
7.2.1.2	<i>Biosíntesis 2</i>	63
7.2.1.3	<i>Biosíntesis 3</i>	64
7.2.1.4	<i>Biosíntesis 4</i>	66
7.2.1.5	<i>Biosíntesis 5 y 6</i>	67
7.2.1.6	<i>Biosíntesis V-Cinética</i>	69
7.2.1.7	<i>Biosíntesis con aislados del sobrenadante de túbicos</i>	72
7.3	ANÁLISIS ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	74
7.4	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).....	78
7.4	ANÁLISIS EDS.....	81
8.	CONCLUSIONES	83
9.	REFERENCIAS	84
10.	ANEXOS	99
10.1.	FORMULACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	99
10.1.1.	<i>Medio de cultivo piloncillo para túbicos</i>	99
10.1.2.	<i>Glicerol</i>	99
10.1.3.	<i>GYM</i>	99
10.1.4.	<i>YPD</i>	99
10.1.5.	<i>GYC</i>	99
10.2.	FOTOS DE LAS NANOPARTÍCULAS OBTENIDAS EN LA BIOSÍNTESIS V-CINÉTICA A LOS DIFERENTES TIEMPOS DE INANICIÓN.....	100
10.2.1.	<i>2 horas inanición</i>	100
10.2.2.	<i>1 día inanición</i>	100
10.2.3.	<i>7 días inanición</i>	101
10.2.4.	<i>14 días inanición</i>	101
10.2.5.	<i>21 días inanición</i>	101

Índice de figuras

FIGURA 1. REACTIVOS Y PRODUCTOS INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE ALIMENTOS FERMENTADOS	10
FIGURA 2. ESTRUCTURAS DE α -GLUCANOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS LÁCTICAS.	13
FIGURA 3. ESTRUCTURA DEL POLISACÁRIDO DE LOS GRANOS DE KÉFIR DE AGUA.	14
FIGURA 4. ESPECTROS UV-VIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON DIFERENTES MORFOLOGÍAS.	19
FIGURA 5. ESPECTROS UV-VIS Y MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE TRANSMISIÓN (TEM) DE NANOPARTÍCULAS DE ORO.	20
FIGURA 6. ESQUEMA DE UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN.	22
FIGURA 7. REPRESENTACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MEDIADA POR MICROORGANISMOS.	26
FIGURA 8. PROCESO DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS BIOLÓGICAS MONODISPERSAS, ESTABLES Y DE ALTO RENDIMIENTO.	28
FIGURA 9. REPRESENTACIÓN DEL MECANISMO DE BIOSÍNTESIS INTRACELULAR DE AUNPS UTILIZANDO <i>L. KIMCHICUS</i> .	37
FIGURA 10. TIBICOS EN CRECIMIENTO Y EN INANICIÓN.	47
FIGURA 11. CONTROLES NEGATIVOS UTILIZADOS.	61
FIGURA 12. ESPECTRO UV-VIS DE LOS CONTROLES NEGATIVOS.	61
FIGURA 13. ESPECTROS DE ABSORCIÓN UV-VIS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO, DE LA PRIMERA SÍNTESIS.	63
FIGURA 14. REACCIONES DE LA SEGUNDA SÍNTESIS.	64
FIGURA 15. ESPECTROS UV-VIS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO, DE LA SEGUNDA SÍNTESIS.	64
FIGURA 16. TERCERA BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO.	65
FIGURA 17. ESPECTROS UV-VIS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO, DE LA TERCERA SÍNTESIS.	65
FIGURA 18. CUARTA BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO.	66
FIGURA 19. ESPECTROS UV-VIS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO, DE LA CUARTA SÍNTESIS.	66
FIGURA 20. QUINTA BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO.	67
FIGURA 21. ESPECTROS UV-VIS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO, DE LA QUINTA Y SEXTA SÍNTESIS.	68
FIGURA 22. SEXTA BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO.	68
FIGURA 23. ESPECTROS UV-VIS DE LA PRIMERA SÍNTESIS CON 2H DE INANICIÓN.	70
FIGURA 24. ESPECTROS UV-VIS DE LA PRIMERA SÍNTESIS CON 7 DÍAS DE INANICIÓN.	71
FIGURA 25. ESPECTROS UV-VIS DE LAS SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EMPLEANDO TIBICOS CON 14 Y 21 DÍAS DE INANICIÓN.	72
FIGURA 26. ESPECTROS UV-VIS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO, DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EMPLEANDO MICROORGANISMOS AISLADOS DEL SOBRENADANTE DE TIBICOS.	73
FIGURA 27. COMPARACIÓN DE LOS ESPECTROS UV-VIS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO, DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EMPLEANDO.	74

FIGURA 28. ESPECTROSCOPIA FTIR DE NANOPARTÍCULAS DE ORO BIOSINTETIZADAS CON TIBICOS DE 18 DÍAS DE INANICIÓN.....	75
FIGURA 29. ESPECTROSCOPIA FTIR DE NANOPARTÍCULAS DE ORO BIOSINTETIZADAS CON TIBICOS DEL LOTE TP2 CON 14 DÍAS DE INANICIÓN.....	76
FIGURA 30. ESPECTROSCOPIA FTIR DE NANOPARTÍCULAS DE ORO BIOSINTETIZADAS CON TIBICOS DEL LOTE TG CON 14 DÍAS DE INANICIÓN.....	77
FIGURA 31. ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS INFRARROJOS OBTENIDOS.....	78
FIGURA 32. MICROGRAFÍAS TEM A 500 NM DE LA FORMACIÓN DE AUNPS EMPLEANDO DIVERSOS LOTES DE TIBICOS.....	79
FIGURA 33. ANÁLISIS DE LAS MICROGRAFÍAS TEM DE NP'S DE ORO BIOSINTETIZADAS CON DIFERENTES LOTES DE TIBICOS.....	81
FIGURA 34. ESPECTROSCOPIA DE RAYOS X DISPERSIVA DE ENERGÍA (EDS) DE LAS NANOPARTÍCULAS BIOSINTETIZADAS CON TIBICOS.....	82

Índice de tablas

TABLA 1. COMPUESTOS AROMÁTICOS Y METABOLITOS DE LA FERMENTACIÓN ENCONTRADOS EN EL KÉFIR DE AGUA.	11
TABLA 2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	17
TABLA 3. COMPARACIÓN ENTRE LA SÍNTESIS QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	30
TABLA 4. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS UTILIZANDO PLANTAS, HONGOS Y BACTERIAS	31
TABLA 5. RELACIÓN ENTRE PH Y MORFOLOGÍA EN LA BIOSÍNTESIS DE AUNPS	34
TABLA 6. PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS Y SU IMPORTANCIA	39
TABLA 7. APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO	40
TABLA 8. COMPOSICIÓN DE LAS REACCIONES DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	48
TABLA 9. VARIACIONES DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN UTILIZADAS PARA LA BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO MEDIANTE TIBICOS	50
TABLA 10. COMPOSICIÓN DE LAS REACCIONES DE SÍNTESIS TIPO CINÉTICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	52
TABLA 11. MICROORGANISMOS AISLADOS A PARTIR DE LOS TIBICOS	55
TABLA 12. RESULTADOS DE LAS DISTINTAS BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO REALIZADAS	62

2. Resumen

Las nanopartículas de oro (AuNPs) en los últimos años han presentado un creciente interés debido a sus propiedades y potenciales aplicaciones en diversas áreas como médica, ambiental, industrial, entre muchas más. Sin embargo, los métodos químicos y físicos de síntesis, mayormente utilizados, presentan problemas debido a la utilización de reactivos contaminantes para el medio ambiente. Por todo lo anterior, la síntesis verde ha surgido como una alternativa ecológica, utilizando desde extractos vegetales hasta microorganismos como hongos, levaduras y bacterias, que evitan el uso de esos reactivos dañinos y además ofrecen características como la biocompatibilidad y la posibilidad de eliminar varios pasos de síntesis. Hasta la fecha no se cuenta con reportes de la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) utilizando algún consorcio microbiano. Por lo que en este proyecto se busca establecer las bases para la biosíntesis de nanopartículas de oro utilizando un consorcio microbiano de fácil mantenimiento. El consorcio microbiano utilizado fueron los granos conocidos como “tibicos” o “kéfir de agua”, que está compuesto principalmente por bacterias lácticas, acéticas y levaduras. Estos microorganismos fermentan el sustrato (azúcares) produciendo etanol, ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono y otros metabolitos secundarios.

Para la biosíntesis se adaptó una metodología reportada previamente; inicialmente los tibicos se sometieron a condiciones de estrés para el consorcio microbiano presente, posteriormente se recuperó el sobrenadante que contenía los metabolitos secretados para realizar la biosíntesis. En este proyecto se evaluaron diferentes tiempos de inactivación con el objetivo de establecer el mejor rendimiento y la síntesis con las mejores características. Las síntesis se realizaron empleando ácido cloroáurico al 4% como agente precursor de la biosíntesis y se mantuvieron las mismas condiciones de incubación y temperatura. La síntesis de las nanopartículas de oro empleando tibicos como agentes reductores/estabilizantes fue monitoreada mediante espectroscopia UV-Visible, durante diferentes periodos de tiempo (24, 48, 72, 144 horas), presentando un pico máximo de absorción a una longitud de onda en el rango de 530-550 nm, característico de la excitación del plasmón superficial de las nanopartículas de oro.

Como parte de la caracterización del nanomaterial biosintetizado se empleó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) para identificar los grupos funcionales adsorbidos a la superficie de las AuNPs provenientes del sobrenadante. En este análisis se obtuvieron espectros con bandas características en 1039 cm^{-1} que corresponden a una vibración de tensión de los grupos C-O/C-C, 1344 cm^{-1} que se asigna a vibraciones simétricas de estiramiento del COO^- . en la región de 2854 cm^{-1} y 2929 cm^{-1} correspondientes a

los modos vibracionales de tensión simétricos y asimétricos respectivamente del -CH₂, en la región de 3309 cm⁻¹ correspondiente a la vibración de tensión del O-H, que se pueden encontrar en extractos de ácidos carboxílicos. Mediante el análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se determinó la morfología y la distribución de tamaños de las nanopartículas de oro obtenidas. La mayoría de las nanopartículas biosintetizadas presentaron una morfología predominantemente esférica con tamaños de diámetro en el intervalo de 5 a 40 nm, y con un tamaño promedio en el intervalo de 14 a 25 nm para las diferentes condiciones experimentales evaluadas.

Los consorcios microbianos de túbicos presentan un gran potencial como agentes reductores en la biosíntesis de nanopartículas de oro (AuNPs), al ser sistemas biológicos de bajo costo y fácil mantenimiento, representan una alternativa sostenible a los métodos químicos y biológicos tradicionales. Esta característica los convierte en una opción atractiva para la producción de AuNPs con aplicaciones en diversos campos.

3. Introducción

3.1 Alimentos fermentados

Los alimentos y bebidas fermentados son elementos básicos de la dieta humana y se han producido y consumido desde el desarrollo de las civilizaciones humanas; generalmente se definen como aquellos productos elaborados a partir de crecimiento microbiano controlado y conversiones enzimáticas de componentes alimentarios mayores y menores modificando las propiedades sensoriales y funcionales originales generando un producto final deseable por el consumidor (Marco *et al.*, 2017).

Tradicionalmente, los alimentos fermentados se produjeron a partir de fuentes vegetales o animales mediante fermentación tradicional, en función de la presencia de los microorganismos que se encontraban en la materia prima. Sin embargo, al no ser un proceso controlado y se desconocen los microorganismos involucrados, pudieran existir patógenos en los alimentos (Muhialdin *et al.*, 2021).

Aunque algunos alimentos fermentados y bebidas alcohólicas tradicionales todavía se producen en casa sin control de los iniciadores de fermentación, a nivel industrial se emplean cultivos iniciadores (Tamang *et al.*, 2020).

Los cultivos iniciadores son formulaciones que contienen una gran cantidad de microorganismo, pueden ser cultivos axénicos o consorcios microbianos, que se añaden a los alimentos para transformar al alimento a partir de los compuestos resultantes de su metabolismo. Esta práctica ha permitido la comercialización de diversos productos alimenticios que aportan características sensoriales y nutricionales específicas, así como potenciales beneficios para la salud y garantías de seguridad alimentaria. Su uso se extiende a múltiples industrias alimentarias, ya que se adaptan a diferentes sustratos y permiten controlar el proceso de fermentación, logrando así resultados predecibles. (García-Díez & Saraiva, 2021)

El desarrollo de cultivos iniciadores se basa en los siguientes pasos: (a) aislamiento e identificación de cepas microbianas; (b) determinación *in vitro* de propiedades fisiológicas deseables e indeseables; (c) determinación *in situ* de la aptitud ecológica en el sustrato de fermentación e impacto benéfico en la calidad del producto; y (d) adaptación de las cepas para la producción a gran escala de biomasa (Gänzle *et al.*, 2023).

Los alimentos y bebidas fermentados son elementos básicos de la dieta humana y se han producido y consumido desde el desarrollo de las civilizaciones humanas; generalmente se definen como aquellos productos elaborados a partir de crecimiento microbiano controlado y conversiones enzimáticas de componentes

alimentarios mayores y menores modificando las propiedades sensoriales y funcionales originales generando un producto final deseable por el consumidor (Marco *et al.*, 2017).

3.2 Características de los alimentos fermentados

Los alimentos fermentados exhiben efectos benéficos para la salud, entre ellos se ha reportado para algunos el aumento de la inmunidad, la reducción de los niveles de colesterol en sangre, proteger contra patógenos (Martinez-Villaluenga *et al.*, 2016), combatir la carcinogénesis, la diabetes, la obesidad, las alergias (Rizwan *et al.*, 2023), y aliviar los síntomas de la intolerancia a la lactosa. Los beneficios para la salud relacionados con los alimentos fermentados suelen atribuirse a los péptidos bioactivos que se generan durante la degradación de proteínas por los microorganismos que participan en el proceso de fermentación. (Apud *et al.*, 2024).

Los exopolisacáridos, compuestos bioactivos, son polímeros naturales producidos biológicamente por diversos microorganismos durante la fermentación. Estos polímeros están formados por subunidades repetidas de monosacáridos u oligosacáridos, unidas mediante diferentes enlaces glicosídicos. (Şanlıer *et al.*, 2017). El potencial biotecnológico de los exopolisacáridos producidos por bacterias ácido lácticas ha despertado un creciente interés, gracias a sus prometedoras propiedades antioxidantes, antidiabéticas, anticancerígenas, reductoras del colesterol e inmunomoduladoras, que abren nuevas vías para el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceuticos (Liang *et al.*, 2024).

3.3 Fermentación

Durante la fermentación, los microorganismos descomponen los carbohidratos fermentables en productos finales como ácido orgánico, dióxido de carbono y alcohol (figura 1), así como metabolitos antimicrobianos como las bacteriocinas que aumentan la seguridad alimentaria al matar o inhibir patógenos transmitidos por los alimentos. La fermentación también aumenta la vida útil de los alimentos, especialmente los altamente perecederos, y mejora las propiedades organolépticas de los alimentos, la digestibilidad de proteínas e hidratos de carbono, y la biodisponibilidad de vitaminas y minerales (Ansorena & Astiasarán, 2015).

Los procesos de fermentación de alimentos se pueden clasificar según los metabolitos primarios y los microorganismos involucrados: alcohol y dióxido de carbono (levadura), ácido acético (*Acetobacter*), ácido láctico (bacterias ácido-lácticas, BAL, como las de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*), ácido propiónico (*Propionibacterium freudenreichii*) o amoníaco y ácidos grasos (*Bacillus*, mohos) (Steinkraus, 1997). Las fermentaciones también se pueden describir en función de los sustratos alimentarios, que incluyen carnes y pescados, lácteos, verduras, soja y otras legumbres, cereales, raíces almidonadas, uvas y otras frutas (Qin *et al.*, 2022). Las materias primas que contienen altas

concentraciones de monosacáridos y disacáridos, o en algunos casos almidón, son fermentadas por levaduras o bacterias del ácido láctico. Los mohos y los bacilos son empleados generalmente para la sacarificación o proteólisis del almidón o como microbiota de maduración secundaria después de una fermentación primaria (Marco *et al.*, 2017)

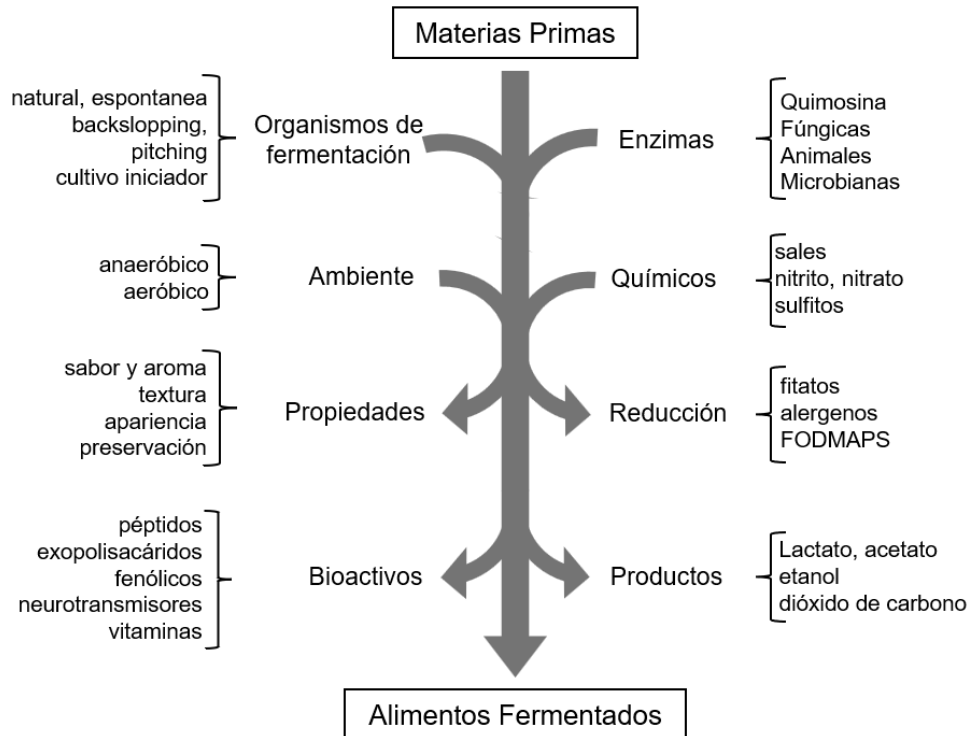


Figura 1. Reactivos y productos involucrados en el proceso de obtención de alimentos fermentados. Tomada y modificada de Marco y colaboradores (2017).

3.4 Tibicos

Son varios los nombres con los que se les conoce a los tibicos, como: “tibi”, “abejas de California”, “abejas africanas”, “semillas de cerveza japonesas”, “nueces de cerveza”, “balm of gilead” y “tepache de tibicos”. Finalmente fueron denominados “granos de kéfir de agua” con el fin de distinguirlos del kéfir de leche (Monar *et al.*, 2014; Lynch *et al.*, 2021).

El origen de los tibicos es aún incierto; existen algunas descripciones de gránulos similares llamados “plantas de cerveza de jengibre” que soldados ingleses importaron de la guerra de Crimea en 1855 (Güzel-Seydim *et al.*, 2021). De igual manera hay reportes de granos de origen mexicano relacionados con el cactus (*Opuntia*) de donde los gránulos se removían de las hojas (Pidoux, 1989).

Son varios los nombres con los que se les conoce a los tibicos, como: “tibi”, “abejas de California”, “abejas africanas”, “semillas de cerveza japonesas”, “nueces de cerveza”, “balm of gilead” y “tepache de tibicos”. Finalmente fueron denominados “granos de kéfir de agua” con el fin de distinguirlos del kéfir de leche (Monar *et al.*, 2014; Lynch *et al.*, 2021).

El tepache de tibicos o kéfir de agua (WK por sus siglas en inglés) es una bebida fermentada ácida, alcohólica y afrutada que se bebe a escala doméstica en todo el mundo. El WK puede ser una fuente probiótica, prebiótica y antioxidante muy importante (Güzel-Seydim *et al.*, 2021), cuya fermentación se inicia con los tibicos (Coma *et al.*, 2019). Se obtiene mediante una fermentación de 2 a 4 días, de una solución de sacarosa, generalmente entre 3 y 10%; frutas frescas, principalmente limones o frutas secas como higos y el inóculo de microorganismos, es decir los tibicos (Monar *et al.*, 2014).

Al final de un proceso de fermentación, los tibicos se separan de la bebida mediante un tamiz y se reutilizan para posteriores fermentaciones (Laureys *et al.*, 2017). Técnicamente, esto se puede repetir de manera continua y tradicionalmente los granos se reutilizan y propagan de una fermentación a la siguiente (Lynch *et al.*, 2021).

El sustrato inicial que da lugar al kéfir de agua está compuesto principalmente por sacarosa, glucosa, fructosa y manitol, una vez fermentado se obtiene una bebida que presenta carbonatación y se observa ligeramente coloreada, con sabor levemente ácido debido a la producción de ácido láctico, ácido acético, etanol (≤ 2 % (v/v)) y dióxido de carbono (Monar *et al.*, 2014; Martínez-Torres *et al.*, 2016). A su vez, se han identificado aproximadamente 30 compuestos diferentes en el kéfir de agua (tabla 1). Muchos de los compuestos de sabor incluyen ésteres metílicos, que se derivan de las frutas utilizadas en el producto y los metabolitos producidos por los microorganismos durante la fermentación (Güzel-Seydim *et al.*, 2021).

Tabla 1. Compuestos aromáticos y metabolitos de la fermentación encontrados en el Kéfir de agua.

Nombre de los compuestos
2-Methyl-1-propanol, alcohol isoamílico, acetato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, butanoato de etilo, 2-metilbutanoato de etilo
Acetato de 2-feniletilo, lactato de etilo, butanoato de etilo, 2-metilbutanoato de etilo, heptanoato de etilo, nonanoato de etilo, 9-decenoato de etilo, bencenopropanoato de etilo, octanoato de metilo, octanoato de isoamilo, succinato de dietilo, hexanoato, octanoato, nonanoato, decanoato, hexanal. , furfural, benzaldehído, 1-octanol, 1,3-propanodiol, alcohol bencílico, 2-feniletanol, 4-etilfenol, 4-etilguaiacol, 2,4-di-terc-butilfenol, hidroxitolueno butilado, estireno

Tomada y modificada de Güzel-Seydim y colaboradores (2021).

3.5 Características de los tibicos

Los tibicos son estructuras gelatinosas de 5 a 20 mm de diámetro y con forma irregular, parecida a la de una coliflor. El contenido aproximado de materia seca de los granos puede variar del 10 al 14% (p/p) (Monar *et al.*, 2014; Lynch *et al.*, 2021). Los granos de kéfir de agua son quebradizos y están compuestos de una matriz de exopolisacáridos a la que se adhieren los microorganismos de los tibicos, que es una asociación simbiótica de bacterias y levaduras (Laureys *et al.*, 2017; Romero-Luna *et al.*, 2020).

Los tibicos son translúcidos y de color blanco grisáceo, cerosos y de consistencia dura; pueden describirse como parecidos a la “sal de roca” ya que suelen ser lisos y rara vez tienen gránulos de subunidades visibles (Güzel-Seydim *et al.*, 2021). Los gránulos pueden llegar a cambiar entre una fermentación a nivel casero y una industrial, siendo en esta última, gránulos pequeños, inclusive de una sola unidad, mientras que los caseros son generalmente más grandes y muestran diversas subunidades conformando el granulo, esta diferencia se origina debido a daños en la estructura derivados de los procesos propios de su producción industrial, así como a la utilización de una concentración de sustratos generalmente mayor (Laureys *et al.*, 2017; Lynch *et al.*, 2021).

Los tibicos contienen un consorcio de varios microorganismos que metabolizan rápidamente el azúcar. Se sabe que las bacterias del ácido láctico son capaces de producir diferentes α -glucanos y fructanos a partir de sacarosa. La formación de estos exopolisacáridos está catalizada por dextransucrasas o fructansucrasas. Estas enzimas escinden el enlace glucosa-fructosa de la sacarosa, liberan uno de los monosacáridos y transfieren el otro monosacárido a una molécula aceptora, esta puede ser la creciente cadena de polisacáridos. Los α -glucanos derivados de bacterias del ácido láctico tienen una alta heterogeneidad estructural y generalmente se dividen en grupos según el tipo de enlace de la columna vertebral (Fels *et al.*, 2018).

Los α -glucanos se pueden clasificar en clases, según el tipo de enlace entre los átomos de carbono de la cadena lineal, y son producidos fundamentalmente por los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* (figura X) (Korakli & Vogel, 2006).

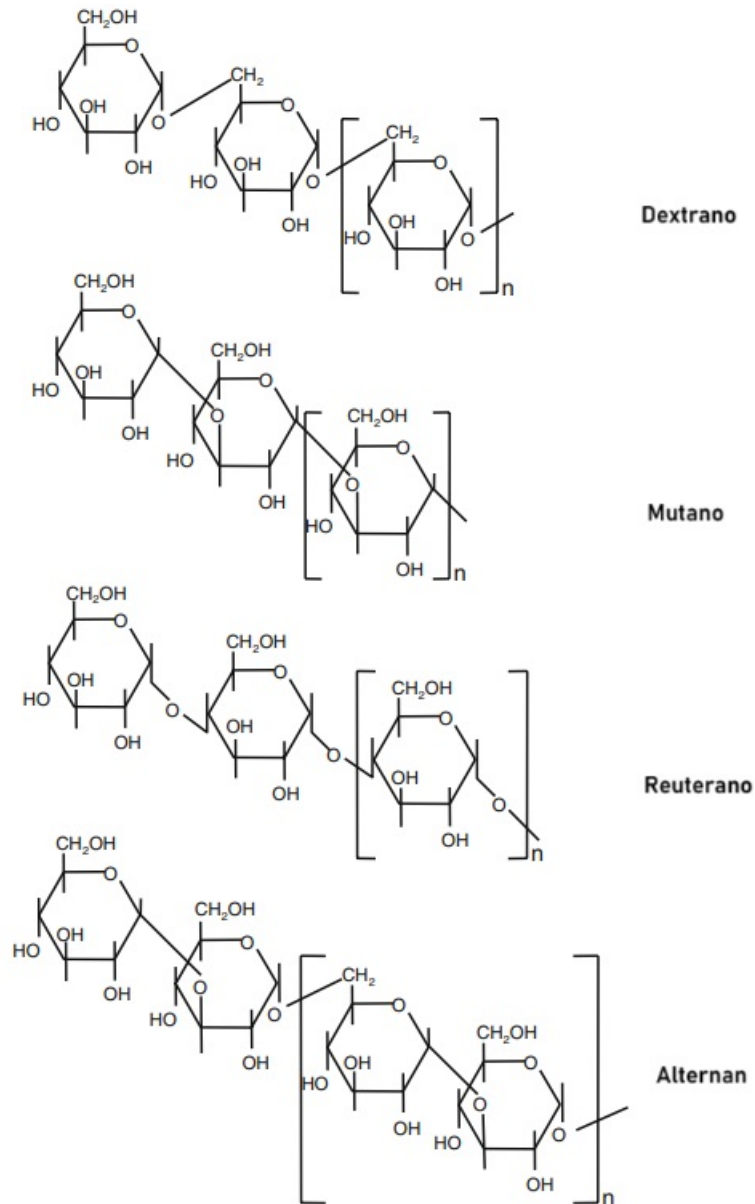


Figura 2. Estructuras de α -glucanos producidos por bacterias lácticas (modificado de Korakli & Vogel, 2006).

Los tibicos contienen dextrano, que es un polímero de glucosa (Coma *et al.*, 2019), la estructura del dextrano de estos granos está formada por residuos de glucopiranosilo unidos por α -D-(1 \rightarrow 6) con cadenas laterales unidas α -(1 \rightarrow 3) (figura 2) (Güzel-Seydim *et al.*, 2021).

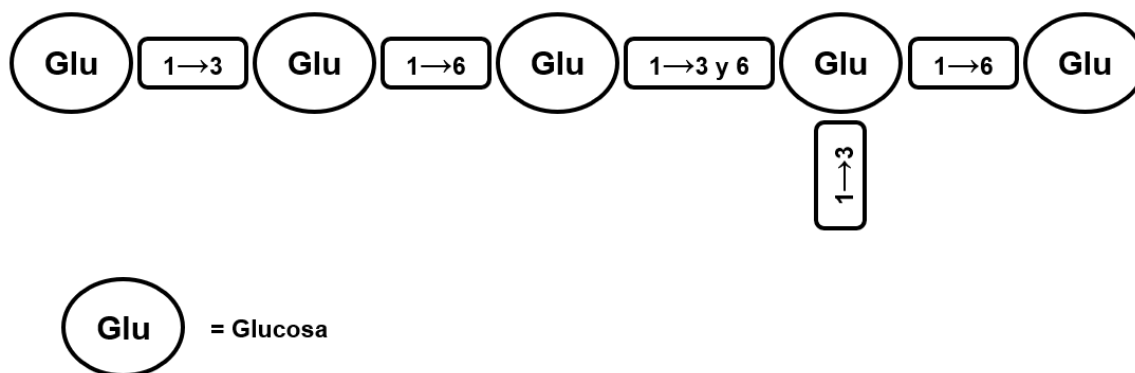


Figura 3. Estructura del polisacárido de los granos de kéfir de agua (modificado de Güzel-Seydim *et al.*, 2021).

La producción de dextrano es probablemente una adaptación de nicho a un entorno rico en sacarosa, que es una característica del kéfir de agua (Lynch *et al.*, 2021; Güzel-Seydim *et al.*, 2021). El dextrano es producido por varias especies de bacterias acidolácticas (BAL por sus siglas en inglés), asociadas a los tibicos. Se han reportado como responsables de generar este polisacárido algunas cepas de *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus hordei*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc citreum* (Martínez-Torres *et al.*, 2016).

Gulitz y colaboradores en 2011, reportaron una cepa de *L. hilgardii* que producía grandes cantidades de dextrano y a partir de esta caracterizaron la enzima responsable, el glicosiltransferano (Gtf) comúnmente llamado glucansucrasa, una glicosiltransferasa.

3.6 Microorganismos presentes

En general, la microbiota del kéfir de agua está compuesta por una estructura de polisacárido dextrinado insoluble en agua, en donde viven en simbiosis microorganismos (Coma *et al.*, 2019; Çevik *et al.*, 2019). Se sabe que la microbiota del kéfir de agua depende de su origen, el medio de cultivo, la higiene y manipulación durante el mantenimiento del cultivo (Güzel-Seydim 2021). Los principales géneros microbianos que se pueden encontrar en los tibicos son: bacterias ácido lácticas, principalmente se reportan del género *Lactobacillus*, bacterias del ácido acético, principalmente el género *Acetobacter* y levaduras, destacando el género *Saccharomyces* (Lynch *et al.*, 2021; Fels 2018). Güzel-Seydim y colaboradores en 2021 reportaron que los granos de kéfir de agua contienen aproximadamente 70% de *Lactobacillus* sp., 10% de *Leuconostoc* sp., 10% de *Acetobacter* sp., 5% de *Bifidobacterium* sp. y 5% de otras bacterias. Los géneros de levaduras son muy variables tanto en los granos de kéfir de agua como

en los de kéfir de leche, sin embargo, ambos comparten levaduras del género *Candida* y *Kazachstania*. Los géneros *Hanseniaspora*, *Kloeckera* y *Guehomyces* son propios del kéfir de agua (Fiorda *et al.*, 2017; Lynch *et al.*, 2021).

La simbiosis entre levaduras y bacterias en los tibicos ocurre debido a que el crecimiento de las levaduras se produce por la acidificación del medio creado por las bacterias; mientras que el crecimiento de las bacterias es estimulado por la producción de factores de crecimiento (vitaminas) y compuestos nitrogenados solubles por parte de las levaduras (Monar *et al.*, 2014).

Recientemente, se han estudiado a escala de laboratorio la dinámica de la comunidad microbiana, la diversidad de especies y la metabolómica del proceso de fermentación del kéfir de agua. Los microorganismos clave durante la fermentación del kéfir de agua son las especies de bacterias del ácido láctico (LAB), *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus hilgardii* y *Lactobacillus nagelii* y las especies de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Laureys *et al.*, 2017). *L. hilgardii* y *L. nagelii* son especies clave en las comunidades de granos de kéfir de agua, particularmente debido a su producción de exopolisacáridos (EPS) (Lynch *et al.*, 2021).

3.7 Nanotecnología y nanomateriales

La nanotecnología es cualquier tecnología operada a nanoescala con aplicaciones a macro escala, es decir, que emplea átomos y moléculas individuales para formar estructuras funcionales (Nasrollahzadeh *et al.*, 2019). El prefijo nano significa la milmillonésima parte de alguna unidad (1×10^{-9}). La nanotecnología estudia las diversas estructuras de la materia que tienen dimensiones del orden de una milmillonésima de metro (Poole & Owens, 2003).

La nanotecnología se inspira en la naturaleza y su capacidad de crear formas complejas ensamblando átomos y moléculas para lograr estructuras y dispositivos funcionales de dimensiones nanométricas (Panda y Deepa, 2011), como la leche (un coloide a nanoescala), proteínas, células, bacterias, virus, etc. Además, muchos materiales que parecen lisos a simple vista tienen una estructura intrincada en su superficie, el caso de algunos moluscos que construyen conchas con superficies internas iridiscentes muy fuertes, mediante la estructuración de nanoladrillos de carbonato de calcio, formando estructuras con alta resistencia mecánica (Buzea *et al.*, 2007; Poole & Owens, 2003).

Los materiales nanoestructurados, aunque no son nuevos gracias a los avances recientes en herramientas de síntesis y caracterización, han atraído una atención considerable impulsando el auge en su estudio y uso industrial debido a sus propiedades físicas y químicas únicas que les brindan potencial para aplicaciones importantes en diversos campos de estudio (Du *et al.* 2010). Los nanomateriales tienen componentes estructurales menores de $1 \mu\text{m}$ en al menos una dimensión. Las nanopartículas son un nanomaterial con una dimensión menor a $1 \mu\text{m}$ y

potencialmente tan pequeñas como escalas de longitud atómica y molecular (Zuhrotun *et al.*, 2023b).

3.7.1 Nanopartículas de oro

Las nanopartículas (NP) son partículas a nanoescala de varios materiales y formas (Zuhrotun *et al.*, 2023b). Las NP con menos de 300 átomos de algún metal pueden mostrar propiedades ópticas y electrónicas distintas en comparación con el metal a granel (Sardar *et al.*, 2009).

Las nanopartículas, debido a su tamaño extremadamente reducido, exhiben propiedades físicas y químicas únicas que las diferencian significativamente de los materiales a granel. Estas propiedades, que surgen de los efectos cuánticos y de su elevada relación superficie/volumen, justifican la consideración de las nanopartículas como un estado de la materia distinto a los estados clásicos (sólido, líquido, gaseoso y plasma) (Buzea *et al.*, 2007).

Entre la variedad de nanopartículas con sus aplicaciones, las nanopartículas hechas con metales nobles como el oro (AuNPs) y la plata (AgNPs), han despertado un gran interés en los últimos años debido a sus características únicas, como propiedades ópticas y electrónicas inusuales, biocompatibilidad, naturaleza inerte, alta estabilidad sin citotoxicidad, fuerte absorción de ondas electromagnéticas en la región visible por resonancia de plasmones superficiales (SPR) y fácil funcionalización de la superficie que les permite desempeñar un papel más destacado en biología y medicina (Rajasree y Suman, 2012; Santra *et al.*, 2015; Zuhrotun *et al.*, 2023).

Las AuNPs se definen como una suspensión de partículas de oro submicrónicas en agua con un tamaño inferior a 100 nm (Akhtar y Pathak, 2017). Las nanopartículas diseñadas pueden sintetizarse con diferentes formas, tamaños y química de superficie, lo que influye en las propiedades ópticas, electrónicas, térmicas y mecánicas de los materiales para su amplia gama de aplicaciones en nanotecnología (Santra *et al.*, 2015). Las AuNPs esféricas poseen atributos útiles, como propiedades optoelectrónicas relacionadas con el tamaño y la forma, una gran relación superficie-volumen, excelente biocompatibilidad y baja toxicidad. Estas propiedades hacen de las AuNPs una herramienta importante en la bionanotecnología. Las propiedades físicas importantes para la caracterización de las AuNPs incluyen la resonancia de plasmones superficiales (SPR) y la capacidad de extinguir la fluorescencia (Yeh *et al.*, 2012).

3.7.2 Caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs).

La caracterización de los nanomateriales es un paso crucial durante la síntesis y biosíntesis, la estabilidad, forma, tamaño, y dispersión de las nanopartículas son propiedades importantes que se utilizan en el proceso de caracterización (tabla 2). Las nanopartículas de oro, AuNPs, pueden dispersarse en solución o simplemente

pueden reaccionar con parejas redox en solución. El hecho de que estas partículas forman soluciones ópticamente claras y homogéneas hace que los estudios espectroscópicos sean particularmente atractivos. Algunas técnicas de espectrometría que se utilizan para la caracterización de nanopartículas son la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopia UV-Visible; de igual manera, otras técnicas utilizadas son la microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (XRD), dispersión de luz dinámica (DLS), dispersión de luz electroforética (ELS) y espectroscopia de dispersión de energía (EDS) (Sardar *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2016c).

Tabla 2. Técnicas de caracterización de nanopartículas

Técnicas	Característica
Microscopia de fuerza atómica (AFM)	Geometría, estructura, distribución
Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Rendimiento térmico
Dispersión dinámica de la luz (DLS)	Distribución hidrodinámica de tamaños
Espectroscopia de fluorescencia	Propiedades ópticas
Espectroscopia infrarroja UV-VIS	Estructura, análisis de grupos funcionales
Espectrometría de masas (MS)	Peso molecular, composición, superficie
Resonancia magnética nuclear (NMR)	Estructura, composición, pureza
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	Agregación, tamaño y forma
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	Agregación, tamaño y forma
Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS)	Composición química y elemental

Tomada y modificada de Mughal y colaboradores en 2021

3.7.2.1 Espectroscopia UV-Vis

La espectroscopia de plasmones de superficie (SPS) se ha utilizado para estudiar pequeños cristales metálicos durante unos 50 años. SPS es una técnica versátil para estudiar la quimisorción, las reacciones redox, la biodetección, la aleación y los procesos electroquímicos. Con SPS las pequeñas nanopartículas metálicas exhiben modos de plasmones superficiales bien definidos, estas incluyen nanopartículas de Au, Ag, Cu, Sn, Pb, Hg, Cd, In y metales alcalinos (Sardar *et al.*, 2009).

La espectroscopia UV-Visible es una técnica simple, rápida y relativamente económica para la caracterización de nanopartículas. La longitud de onda en el rango de 300 a 800 nm se utiliza generalmente para la caracterización de nanopartículas en un rango de tamaño de 2 a 100 nm. La presencia de una banda máxima de absorción en el espectro UV-Visible a longitudes de onda características es un indicio de la presencia de nanopartículas en solución. La fuerte banda de absorción del plasmón de superficie en el rango de 500 a 600 nm se utiliza en la caracterización de nanopartículas de oro. Esta banda de absorción máxima se debe a las oscilaciones colectivas de los electrones de conducción debido a la excitación resonante de los fotones incidentes, lo que se denomina "resonancia del plasmón superficial" (SPR). La posición de la banda está influenciada no solo por el tamaño, sino también por la forma, el solvente, el ligando superficial, la carga del núcleo, la temperatura e incluso es sensible a la proximidad de otras nanopartículas (Ahmed *et al.*, 2016c; Panda y Deepa, 2011; Yeh *et al.*, 2012; Sardar *et al.*, 2009).

Aunque el análisis espectroscópico UV-Visible se utiliza principalmente para pruebas cualitativas de nanopartículas, las formas características de las bandas podrían, de hecho, estar correlacionadas con las propiedades de las nanopartículas, como el tamaño, la forma y su estabilidad (figura 3). Al monitorear la evolución de la banda SPR se puede determinar en tiempo real la formación, el crecimiento y los cambios en la morfología de las nanopartículas. La disminución gradual simultánea en la absorción UV alrededor de 300 nm, correspondiente al máximo de absorción de los iones HAuCl_4 , indica el progreso de la reacción. (Panda y Deepa, 2011; Yeh *et al.*, 2012; Sardar *et al.*, 2009).

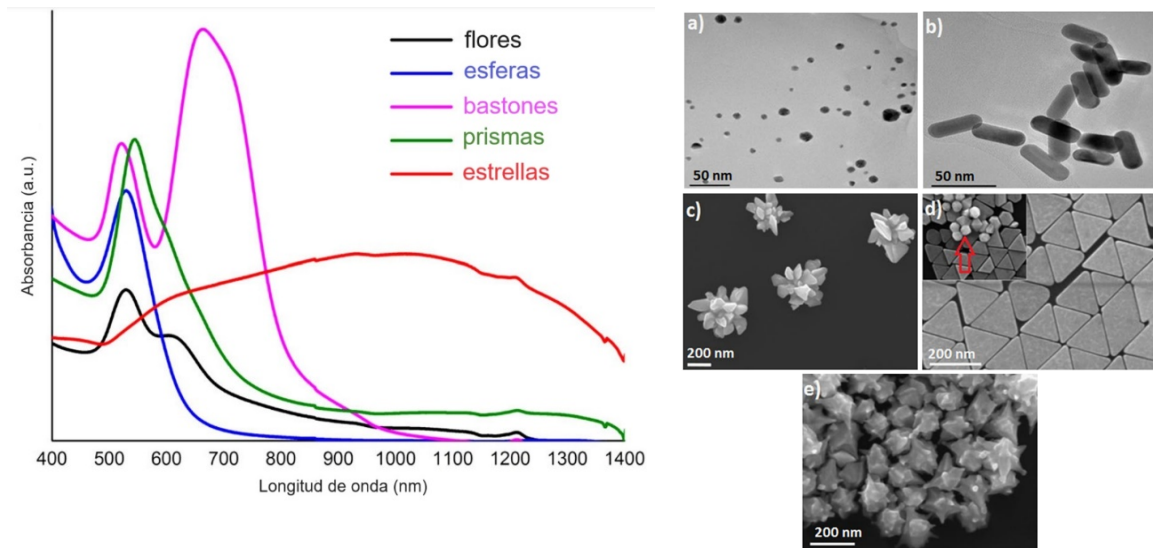


Figura 4. Espectros UV-Vis de nanopartículas de oro con diferentes morfologías (Izquierda); a) esferas, b) varillas, c) flores, d) prismas, e) estrellas. Tomada y modificada de Woźniak y colaboradores (2017).

Un gráfico de absorbancia/longitud de onda ayuda a determinar las características de las nanopartículas de oro, un espectro de absorción sin desplazamiento de la longitud de onda máxima indica una distribución de tamaño estrecha y también poca o ninguna agregación de las nanopartículas en solución. La simetría de la banda de absorción es una señal de nanopartículas esféricas monodispersas (Reddy *et al.*, 2010). La presencia de una banda amplia puede indicar polidispersidad, formas anisotrópicas o agregación de las nanopartículas. La aparición de múltiples bandas es otro indicio de nanopartículas anisotrópicas (varillas, nanoplacas, etc.) (Diegoli *et al.*, 2008).

A medida que aumenta el tamaño de las nanopartículas, la posición de la banda máxima de absorción en el espectro UV-Visible se desplaza hacia longitudes de onda mayores (red shift o corrimiento hacia el rojo) (Panda y Deepa, 2011). Las AuNPs esféricas presentan una variedad de colores (p. ej., marrón, naranja, rojo y púrpura) en solución acuosa como consecuencia de cambios en la forma y el tamaño del núcleo, como se puede observar en la figura 4 (Sardar *et al.*, 2009).

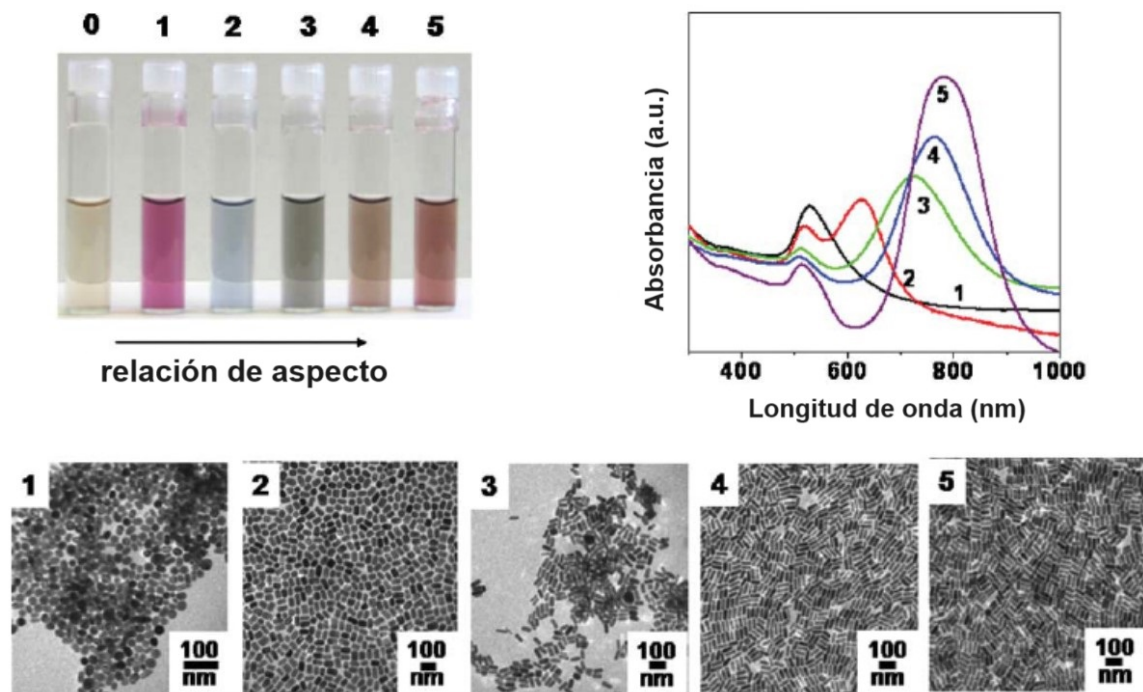


Figura 5. Nanopartículas de oro con variación en su relación de aspecto. A) Se muestran viales con soluciones acuosas de nanoesferas de oro (vial 1) y nanobarras (*nanorods*) con una relación de aspecto creciente (2-5). B) Espectros UV-Vis de las nanopartículas. C) Micrografías electrónicas de transmisión (TEM) de las nanopartículas de los viales 1-5. Tomada y modificada de Murphy y colaboradores, 2008.

3.7.2.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).

La espectroscopia infrarroja es una técnica poderosa para identificar compuestos orgánicos e inorgánicos porque, a excepción de las moléculas homonucleares como O_2 , N_2 , Cl_2 , todas las especies químicas moleculares absorben radiación infrarroja. Además, cada compuesto molecular tiene un espectro de absorción infrarroja único, por lo que, la espectroscopia infrarroja permite una asignación exacta y precisa de los grupos funcionales, tipos de enlaces y conformaciones moleculares (Skoog *et al.*, 2017). Es una técnica que permite la medición de sustancias en estado gaseoso, líquido o sólido, empleando poca cantidad de muestra, en tiempo real y que requiere manipulaciones sencillas (Wadekar, 2017).

La energía de la radiación infrarroja puede excitar transiciones vibratorias y rotatorias, pero es insuficiente para excitar transiciones electrónicas. Un espectro infrarrojo presenta puntos máximos de absorción estrechos, con poca separación entre sí, que resultan de las transiciones entre los distintos niveles cuánticos vibratorios. Las variaciones en los niveles rotacionales también pueden dar lugar a una serie de puntos máximos para cada estado vibratorio. Sin embargo, con muestras líquidas o sólidas, la rotación es frecuentemente obstruida o prevenida, y

los efectos de estos pequeños niveles de energía no son detectados. El número de formas en que una molécula puede vibrar está relacionado con el número de átomos y, por lo tanto, con el número de enlaces que estas contienen (Talari *et al.*, 2016; Movasaghi *et al.*, 2008).

Los espectrómetros de infrarrojo por transformada de Fourier en el (FTIR, por sus siglas en inglés) ofrecen la ventaja de una alta sensibilidad, resolución y velocidad de recolección de datos (los datos de un espectro completo pueden obtenerse en 1 segundo o menos). Las mediciones se realizan en el rango infrarrojo (IR) del espectro de la luz electromagnética, en particular en la región del infrarrojo cercano (NIR) y del infrarrojo medio (MIR), lo que proporciona información altamente discriminatoria debido a la excitación de transiciones vibratorias y vibrorotacionales específicas de cada una de las especies moleculares (López-Lorente & Mizaikoff, 2016). El haz pasa a través de la muestra a la vez que los átomos absorben fotones a una frecuencia que coincide con su frecuencia de vibración y el detector mide la intensidad restante del haz transmitido (Wadekar, 2017).

Diversas publicaciones describen el uso de técnicas de FT-IR, para determinar los grupos funcionales presentes dentro de una suspensión coloidal de AuNPs (Ahmed *et al.*, 2016; López-Lorente & Mizaikoff, 2016; Akintelu *et al.*, 2020).

Los espectros FTIR revelan firmas vibratorias de los constituyentes presentes en los medios circundantes de las nanopartículas, por ejemplo, durante la síntesis o cuando se aplican nanopartículas metálicas en medios complejos como extractos biológicos que revelan proteínas y metabolitos (López-Lorente & Mizaikoff, 2016; Wadekar, 2017). Los grupos funcionales orgánicos adheridos a la superficie de las nanopartículas y la química de la superficie de las nanopartículas biogénicas se caracterizan mediante espectroscopia FTIR (Ahmed *et al.*, 2016). Estudios anteriores que realizaron análisis FTIR en AuNPs revelaron flavonoides (Riaz *et al.*, 2020), terpenos, taninos (Rauf *et al.*, 2021), proteínas (Rotimi *et al.*, 2019), polifenoles (Akintelu *et al.*, 2020), alcaloides (Fahmy *et al.*, 2021) y ácidos carboxílicos (Ahmed *et al.*, 2022) como biomoléculas que actúan como agentes reductores en la síntesis de AuNPs.

3.7.2.3 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una poderosa herramienta para caracterizar las nanopartículas (Rajeshkumar & Bharath, 2017). La TEM es una técnica valiosa para la caracterización fisicoquímica de nanopartículas (Malatesta, 2016). Con esta técnica no solo se pueden visualizar, sino que también se pueden determinar propiedades como el estado de agregación, dispersión, sorción, tamaño, estructura y forma de los nanomateriales (Mavrocordatos *et al.* 2004; Almatroudi, 2020).

Se utiliza para obtener medidas cuantitativas como la distribución de tamaño, el tamaño de partícula y la morfología de las nanopartículas sintetizadas para que

sean efectivas para las respectivas aplicaciones (Mughal *et al.*, 2021).

La figura 6 ilustra esquemáticamente la estructura de un TEM. En este sistema, el haz de electrones se genera por emisión termoiónica desde un filamento de tungsteno, el cual son acelerados mediante un voltaje de cientos de kilovoltios. Este voltaje determina la longitud de onda de los electrones, que típicamente oscila entre 10^{-1} y 10^{-3} Å. Posteriormente, el haz se enfoca sobre la muestra a través de lentes magnéticas condensadoras (Williams & Carter, 1996).

La TEM utiliza un haz de electrones para interactuar con una muestra y forma una imagen en una placa fotográfica (Tiede *et al.*, 2008). En TEM, los electrones se transmiten a través de una muestra, por lo que la muestra debe ser delgada o absorberá aun gran parte del haz de electrones y la imagen obtenida perderá definición (Tiede *et al.*, 2008)

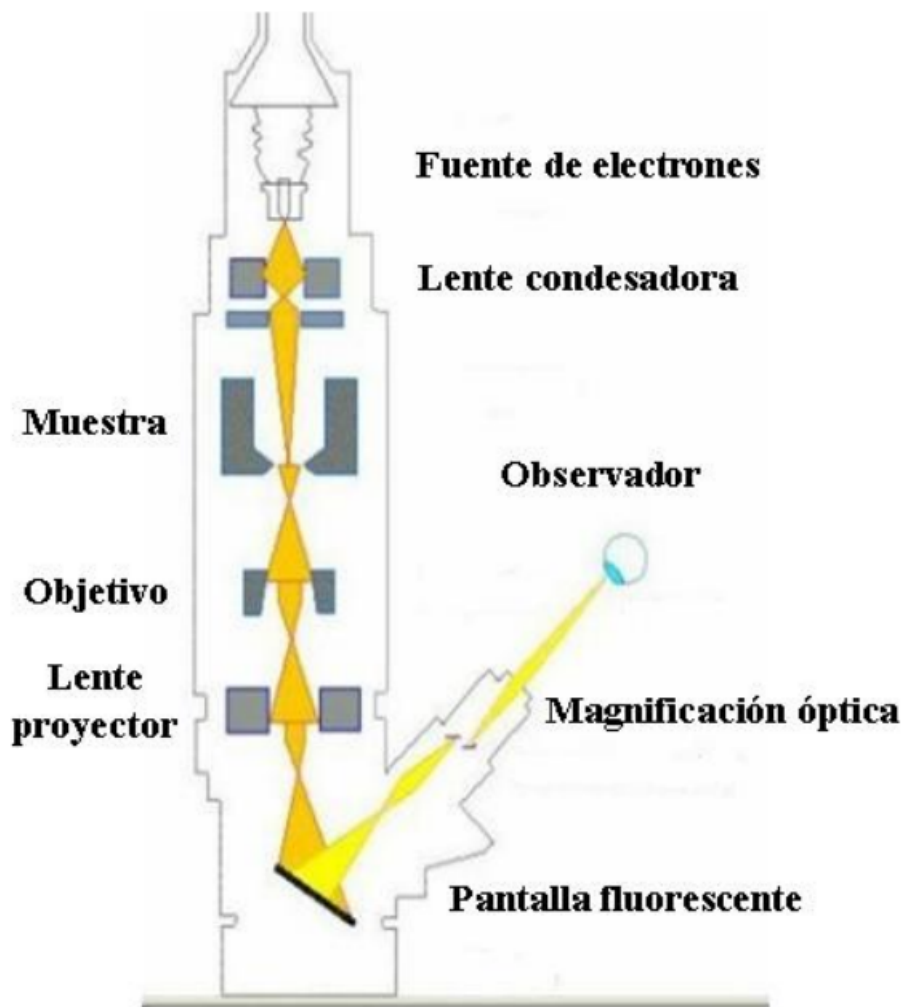


Figura 6. Esquema de un microscopio electrónico de transmisión.

3.7.3 Síntesis de AuNPs

En las últimas décadas se han realizado importantes esfuerzos para fabricar nanopartículas de oro con monodispersidad y control del tamaño, formas y funcionalidad de la superficie (Kumar *et al.*, 2013; Sardar *et al.*, 2009; Yeh *et al.*, 2012).

Los métodos básicos para la preparación de nanopartículas de oro implican métodos físicos, químicos y biológicos (Kumar *et al.*, 2013).

3.7.3.1 Métodos físicos y químicos de síntesis

De manera general los métodos fisicoquímicos utilizados para la producción de nanopartículas de oro se basan en dos enfoques, denominados “de arriba hacia abajo” (*Top-Down*) o “de abajo hacia arriba” (*Bottom-Up*).

En el enfoque de arriba hacia abajo, el material a granel se transforma en pequeñas partículas de tamaño nanométrico. Aunque este tipo de enfoques son fáciles de usar, son ineficaces para fabricar partículas pequeñas y de forma regular, debido a la dificultad en el control del tamaño y la forma de partícula adecuados (Abid *et al.*, 2022).

Se han introducido métodos físicos como la ultrasonificación, la ablación por láser y la descomposición térmica para descomponer materiales a granel en nanoescalas. En tales enfoques, se requiere mucha energía o presión y es difícil producir NPs con tamaños inferiores a 100 nm (Lu *et al.*, 2020).

En cuanto al enfoque “abajo hacia arriba” o *Bottom-Up* las NPs se forman mediante el crecimiento y autoensamblaje de átomos y posteriormente moléculas (Abid *et al.*, 2022). Este método, sin embargo, está influenciado por el pH, la temperatura, los enlaces iónicos y covalentes y la concentración (Indiarto *et al.*, 2021). Algunos de los métodos comúnmente empleados en la síntesis de NPs son la reducción fotoquímica, la precipitación química, la microemulsión, la reducción microbiana y los métodos hidrotermales (Lu *et al.*, 2020).

Por otro lado, los métodos físicos generalmente requieren altas temperaturas y presiones, lo que hace que no solo sea difícil controlar el tamaño y la forma de las AuNPs, sino que también aumenta el consumo de energía y los costos de producción (Kitching *et al.*, 2014).

Las nanopartículas de oro de diferentes tamaños se preparan mediante la reducción del oro en presencia de un agente estabilizador que evita la aglomeración de partículas (Kumar *et al.*, 2013), debido a que las partículas más pequeñas experimentan mayores fuerzas impulsoras para agregarse y disminuir la energía superficial, por lo que es necesaria una capa protectora o “recubrimiento” durante la síntesis para mantenerlas en un estado finamente disperso (Sardar *et al.*, 2009).

Las nanopartículas están cubiertas o protegidas por capas de ligandos; un valor añadido es la capacidad de alterar la química de la superficie. Se han empleado intercambios de ligandos diferentes para las nanopartículas de oro. Uno es el intercambio del ligando citrato, débilmente unido, con un tiol orgánico o una mezcla de tioles. Este es un procedimiento relativamente simple en el que se puede suponer razonablemente que la reacción de intercambio continúa hasta el agotamiento (Sardar *et al.*, 2009).

Se han reportado modificaciones de AuNPs con biomoléculas complejas como lípidos ligados a oligonucleótidos, péptidos y anticuerpos. Giljohann y colaboradores son pioneros en el estudio de estos nuevos ligandos utilizados en la modificación de nanopartículas, desarrollando y demostrando el uso de métodos simples para sintetizar lipoproteínas de alta densidad (HDL) con control sobre el tamaño, la forma y la composición. Cada vez se aprecia más que el tamaño, la forma y la química de las HDL tienen un impacto en su fisiología *in vivo*, y estas estructuras pueden resultar útiles como agentes terapéuticos (candidatos para tratamiento de aterosclerosis) y de imagen (Giljohann *et al.*, 2010).

3.7.3.2 Síntesis química de nanopartículas de oro de diferentes formas y tamaños

Curiosamente, las AuNPs se pueden sintetizar en una variedad de formas con alto rendimiento que incluyen varillas, octaedros, dodecaedros, prismas triangulares, placas triangulares, placas hexagonales y nanoestrellas. La forma y el tamaño de las AuNPs determinan la mayoría de sus propiedades físicas y químicas, como la resonancia de plasmones, la actividad antimicrobiana y la tasa de catálisis. La simple reducción de sales metálicas mediante agentes reductores de manera controlada generalmente produce nanopartículas esféricas, porque las esferas muestran el estado energético más bajo, permitiendo su fácil formación y estabilización (Kitching *et al.*, 2014; Murphy *et al.*, 2008; Sardar *et al.*, 2009).

El control de la forma se logra con mayor frecuencia a través de un proceso de dos pasos conocido como "crecimiento mediado por semillas". En el primer paso, se generan pequeñas partículas semilla de oro en condiciones de alta sobresaturación química que conducen a una tasa de nucleación rápida y, por lo tanto, a núcleos esféricos uniformes de 1-5 nm. Estas condiciones aseguran el rápido crecimiento de todas las superficies de cristal, pero están contraindicadas para el control de la forma. En el segundo paso, un paso de crecimiento, se alteran las condiciones de reacción, se agregan más iones de oro y un reductor diferente, junto con algún tipo de tensioactivo o molécula que modela la forma, y las semillas crecen en partículas más grandes con una morfología predeterminada. Normalmente, la etapa de crecimiento es mucho más lenta y se desarrolla en condiciones de reducción más suaves que la etapa de nucleación. A pesar de estos avances, muchas preparaciones coloidales contienen un gran porcentaje de otras formas. Una cuestión clave sigue siendo el papel fundamental de las semillas utilizadas para cultivar diferentes tipos de nanocristales (Sardar *et al.*,

2009).

Condiciones experimentales simples como la temperatura de incubación, la presencia o ausencia de oxígeno pueden alterar drásticamente la morfología de las nanopartículas de oro (Bharde *et al.*, 2007b).

3.7.3.3 Biosíntesis de AuNPs

Comúnmente, la síntesis de AuNPs se realiza mediante métodos químicos y físicos. Sin embargo, en las últimas décadas la preocupación creciente por desarrollar tecnologías sintéticas limpias, no tóxicas y ambientalmente amigables o eco-amigables (He *et al.*, 2007; Akhtar y Pathak, 2017), ha llevado a las investigaciones en nanosíntesis a dar un fuerte énfasis en los enfoques de "química verde" para sintetizar nanopartículas (Panda y Deepa, 2011; Ahmed *et al.*, 2016c). El concepto de "química verde" en la síntesis de nanopartículas es el desarrollo de nanopartículas que involucra como agentes reductores y estabilizadores materiales naturales como son extractos de diversas plantas, algas y microorganismos (bacterias, hongos y levaduras), enzimas, exudados de artrópodos, etc. que son amigables con el medio ambiente (tabla 4) (Kitching *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2016c; Adebayo *et al.*, 2021; Zuhrotun *et al.*, 2023b).

La síntesis verde o biosíntesis está emergiendo como un punto de inflexión en el campo de la nanotecnología y la biotecnología (Ahmed *et al.*, 2016c), ya que es una ruta alternativa importante que ha atraído un enorme interés debido a su confiabilidad, estabilidad, menor uso de productos químicos nocivos, rentabilidad y respeto por el medio ambiente (tabla 3) (Bhambure *et al.*, 2009; Adebayo *et al.*, 2021; Zuhrotun *et al.*, 2023b).

La biosíntesis es el fenómeno que tiene lugar mediante procesos biológicos o reacciones enzimáticas (figura 5) (Akhtar y Pathak, 2017). La biosíntesis de nanopartículas implica la captura de metales, la reducción enzimática y el recubrimiento. Los iones metálicos se reducen a nanopartículas en presencia de enzimas. La enzima sirve como sitio de nucleación, proporcionando electrones al metal para su reducción (Ghosh *et al.*, 2021).

Existe un creciente interés en buscar y hacer uso de microorganismos como trabajadores de una fábrica viva (Du *et al.*, 2007), el principal interés es la producción de nanopartículas a partir de un recurso barato que brinde una propagación alta y económica de la biomasa (Rajasree y Suman, 2012) útil para llevar a cabo la biosíntesis. Se ha puesto un gran esfuerzo en la biosíntesis de nanopartículas inorgánicas, como Ag, Au, Pd, CaCO₃, BaCO₃, SrCO₃, ZrO₂, TiO₂, SiO₂, PbCO₃, CdCO₃, BaTiO₃, Fe₃O₄, CuAlO₂ y CdS mediante el uso de microorganismos (Bharde *et al.*, 2007b; Huang *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2016c).

La resistencia microbiana frente a los iones de metales pesados se ha aprovechado para la recuperación biológica de metales, mediante la reducción de los iones metálicos para la formación de nanopartículas de oro (He *et al.*, 2007). Algunos microorganismos pueden sobrevivir y crecer incluso con una alta

concentración de iones metálicos, gracias a que han desarrollado mecanismos de supervivencia para desintoxicar el entorno celular inmediato mediante la reducción de las especies metálicas tóxicas (Husseiny *et al.*, 2007; Waghmare *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2016c). Los mecanismos involucran: sistemas de eflujo, alteración de la solubilidad y toxicidad vía reducción u oxidación, biosorción, bioacumulación, complejación extracelular o precipitación de metales y falta de sistemas específicos de transporte de metales (Sterritt & Lester, 1980; Wood & Wang, 1983; Ji & Silver, 1995; Silver, 1996; Bruins *et al.*, 2000). Los microorganismos pueden sintetizar nanopartículas metálicas a través de la biorreducción, para eliminar los metales solubles del entorno circundante, disminuyendo así su toxicidad y biodisponibilidad. Los microorganismos capaces de biorreducir metales pueden colonizar entornos contaminados con estos (Kitching *et al.*, 2014). Por lo tanto, muchos microorganismos pueden ser considerados posibles candidatos para la síntesis de nanopartículas.

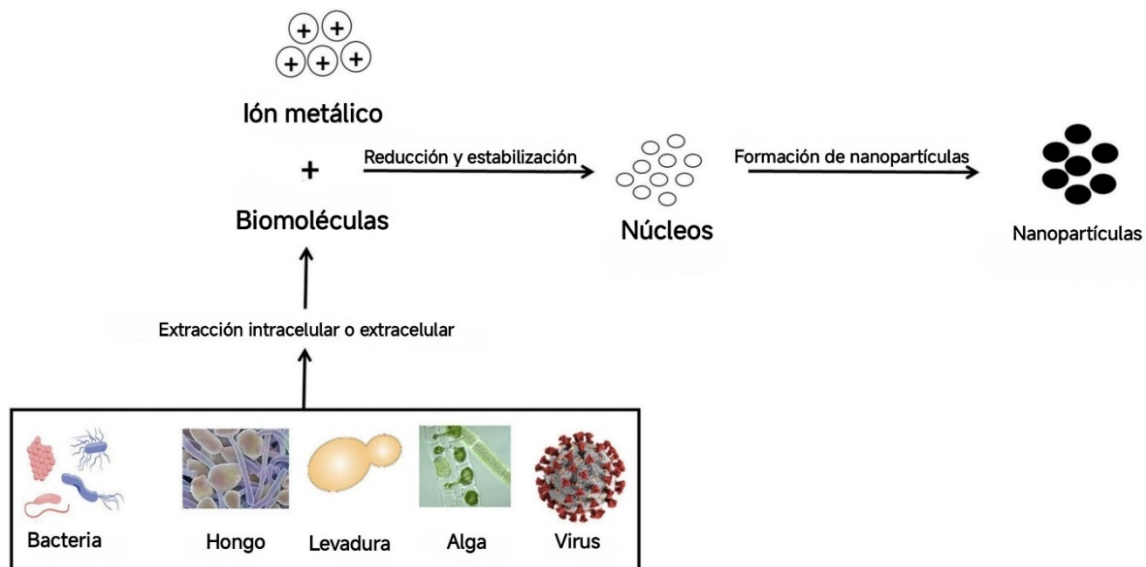


Figura 7. Representación de la síntesis de nanopartículas mediada por microorganismos. Tomada y modificada de Ghosh y colaboradores, 2021.

Los métodos biosintéticos de AuNPs que se basan en microorganismos viables o sus extractos (proteicos o de metabolitos), poseen dos beneficios principales: tienen un menor impacto ambiental y aumentan la rentabilidad (Kitching *et al.*, 2014; Waghmare *et al.*, 2014). Esto se debe a que, a un costo muy bajo, los microorganismos producen de manera renovable tanto la biorreducción como los agentes de protección/estabilización necesarios en el proceso, sin necesidad de productos químicos exógenos. Además, los mecanismos biosintéticos brindan la posibilidad de manipular las propiedades de las AuNPs producidas, como la forma, el tamaño y la funcionalización de su superficie para aplicaciones específicas

(Singh *et al.*, 2016).

La biosíntesis de nanopartículas de oro se puede lograr mediante varios sistemas biológicos, utilizando microorganismos (bacterias, levaduras, actinobacterias, hongos, etc.) (Bharde *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2007; Bhambure *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2016c). Incluso se ha reportado el uso de microorganismos modificados genéticamente para la biosíntesis de NPs estabilizadas sin necesidad de agentes de protección auxiliares (Huang *et al.*, 2009). De igual manera, los hongos son prometedores para la biosíntesis industrial de AuNPs debido a su fácil manejo, mayor secreción de proteínas que las bacterias, alto rendimiento de biomasa y accesibilidad para un escalamiento (Du *et al.*, 2010; Kitching *et al.*, 2014).

En la mayoría de los protocolos experimentales que involucran microorganismos (bacterias, hongos y levaduras), se realiza un pretratamiento general, para esto las células se recolectan, después de la fermentación de los respectivos medios de crecimiento, mediante centrifugación o filtración y se lavan bien con agua destilada estéril para eliminar los componentes del medio (figura 6).

Para la síntesis extracelular, la biomasa se dispersa en agua desionizada durante un periodo para extraer el contenido de las células o que éstas liberen metabolitos secundarios. Posterior a este tiempo de estrés metabólico, se adiciona sal de oro al sobrenadante libre de células. Este método hace que el proceso sea completamente extracelular, utilizando las biomoléculas secretadas por la célula. Este tipo de síntesis es la más popular ya que elimina varios pasos de procesamiento necesarios para la recuperación de nanopartículas de oro. Mientras que, para una síntesis intracelular, las células (biomasa húmeda/seca) se resuspenden en agua estéril o en un tampón al que se añade una solución acuosa de la sal de oro precursora (HAuCl₄). A continuación, las mezclas se pueden incubar a diferentes temperaturas en condiciones estacionarias o de agitación en oscuridad. Pasado el tiempo de reacción, se recuperan periódicamente alícuotas y se analizan para determinar la formación de nanopartículas de oro (Ahmed *et al.*, 2016c; Kuyukina *et al.*, 2022; Bhambure *et al.*, 2009; Keskin *et al.*, 2021).

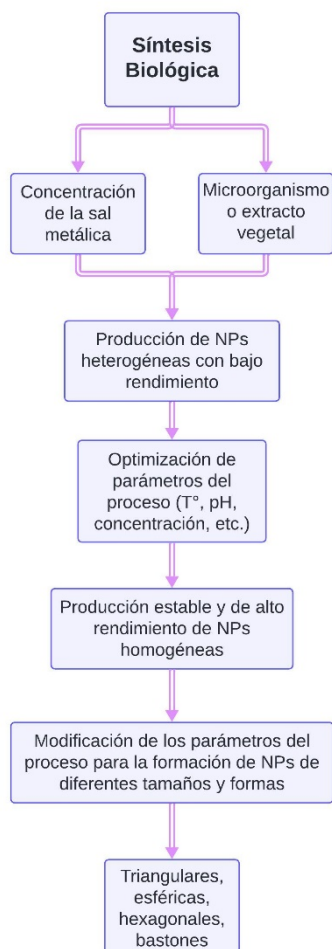


Figura 8. Proceso de síntesis de nanopartículas biológicas monodispersas, estables y de alto rendimiento (Modificado de Golhani *et al.* (2020)).

De igual manera, el uso de plantas o algas para la síntesis de nanopartículas sigue métodos experimentales similares. Para la obtención del extracto de plantas, diferentes partes de la planta se lavan con agua destilada, se cortan en trozos pequeños y se hierven en un solvente universal (generalmente agua destilada) para obtener el extracto. Para la síntesis, el extracto hace reaccionar con HAuCl_4 para la síntesis de nanopartículas de oro (Ali *et al.*, 2022; Waclawek *et al.*, 2018; Hosny & Fawzy, 2021).

En contraste, las plantas son productores rentables de compuestos fitoquímicos, que funcionan como agentes reductores y estabilizadores en el proceso de síntesis de nanopartículas, principalmente extractos de algunas partes de plantas, como hojas, flores, tallos, raíces y frutos (Huang *et al.*, 2009; Zuhrotun *et al.*, 2023b).

Entre los materiales biológicos mencionados, las plantas parecen ser las mejores

candidatas y son apropiadas para la biosíntesis de nanopartículas a gran escala. El uso de extractos de plantas en la síntesis de nanopartículas tiene varias ventajas sobre el uso de otros materiales biológicos, entre las cuales la cinética para la síntesis con un enfoque usando plantas es mucho mayor que la de otros enfoques biosintéticos, y es equivalente a la síntesis de nanopartículas usando métodos químicos (Zuhrotun *et al.*, 2023b; Du *et al.*, 2010). En la tabla 3, se presenta un resumen de las ventajas y desventajas de la síntesis química y verde de las nanopartículas.

Los microorganismos como posibles nanofábricas ecológicas pueden influir en el tamaño y la morfología de las partículas nanoestructuradas preparadas con metales (Du *et al.*, 2007), muestra de esto es que se ha logrado la biosíntesis de nanopartículas de metales nobles con morfologías bien definidas, incluidas esféricas (Ünlüer *et al.*, 2023), hexagonales (Cai *et al.*, 2023), triangulares (Ayyoub *et al.*, 2022), varillas (Radhakrishnan *et al.*, 2021), elípticas, cúbicas, láminas planas, dodecaedros, icosaedros, etc., con tamaños desde 1 nm hasta varios milímetros (Du *et al.*, 2007; Akhtar y Pathak, 2017).

Aunque se ha establecido con éxito que la biosíntesis de nanopartículas de oro es factible a partir de biomasa viva y muerta de varios organismos, y extractos vegetales, la principal limitación de este enfoque, en comparación con los protocolos químicos comunes, es que las NPs obtenidas a menudo muestran amplias distribuciones de tamaño y morfologías no controladas. Y, como es bien sabido, propiedades importantes de las NPs metálicas, concretamente las propiedades ópticas y biológicas, están fuertemente influenciadas por su tamaño y morfología (Panda y Deepa, 2011; Pinto *et al.*, 2017; Morgan *et al.*, 2019).

Tabla 3. Comparación entre la síntesis química y biológica de nanopartículas metálicas. Elaboración propia.

Tipo de síntesis	Ventajas	Desventajas	Referencia
Química	<ul style="list-style-type: none"> • El método más sencillo utilizado para la preparación de nanopartículas metálicas. • Menores tiempos requeridos para la síntesis 	<ul style="list-style-type: none"> • Se necesitan temperatura elevadas • Adición de agentes estabilizantes • Solventes orgánicos • Agentes reductores agresivos 	Panda y Deepa, 2011; Jamkhande <i>et al.</i> , 2019; Dhanker <i>et al.</i> , 2021; Bharde <i>et al.</i> , 2007
Biológica	<ul style="list-style-type: none"> • Condiciones ambientales de temperatura, pH y presión • Bajo consumo de energía • No tóxico • Sostenible • Excelente estabilidad química • Biocompatibilidad • Rentabilidad • Uso de solventes no tóxicos • Extracción de las NPs mediante mecanismos sencillos • Nanopartículas libres de contaminación tóxica de subproductos • No es necesario agregar agentes estabilizadores externos • Menor número de pasos para la obtención de NPs funcionalizadas 	<ul style="list-style-type: none"> • Se requiere mayor tiempo para el crecimiento microbiano y la posterior síntesis • Purificación comúnmente inadecuada o ineficiente • Limitación de un control de tamaño, forma y uniformidad • Proceso complicado de mantenimiento de cultivos celulares • Componentes no deseados en los sobrenadantes, como residuos del medio de cultivo 	Zuhrotun <i>et al.</i> , 2023b; Dhanker <i>et al.</i> , 2021; Santra <i>et al.</i> , 2015; Waghmare <i>et al.</i> , 2014; Ahmed <i>et al.</i> , 2016c; Zuhrotun <i>et al.</i> , 2023b; Du <i>et al.</i> , 2010.

- Extractos fáciles de obtener
- NPs estables durante el almacenamiento a largo plazo

Tabla 4. Síntesis de nanopartículas utilizando plantas, hongos y bacterias. Elaboración propia.

Organismo	Agente reductor	Tiempo de reacción	Temperatura	pH	Tamaño (nm)	Forma	Localización	Referencia
Bacterias								
<i>Actinobacter sp.</i>	Biomasa activa	12 h	37 °C	3	50–500	Hexagonales	-	(Bharde <i>et al.</i> , 2007b)
<i>Bifidobacterium animalis</i>		24 h	37 °C	7	5–60	Esféricas, triangulares	Intracelular	(Wang <i>et al.</i> , 2021)
<i>Enterococcus sp.</i>		48 h	-	-	5-10	Esféricas	Intracelular	(Nandhini <i>et al.</i> , 2020)

<i>Enterococcus sp.</i>		24 h	-	-	-	Esféricas	Intracelular	(Vairavel <i>et al.</i> , 2020)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		48 h	37 °C	5	20-80	Esféricas	Extracelular	(Rajasree y Suman, 2012)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>		24 h	Ambiente	-	30–120	Esféricas	Intracelular	(Kuyukina <i>et al.</i> , 2022)
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>		48 h	Ambiente	7	10-20	Esféricas	Extracelular	(He <i>et al.</i> , 2007)
<i>Arthrospira platensis</i>	Exopolisacárido	30 minutos	Hervor	10	8-35	Esféricas	Extracelular	(El-Deeb <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bacillus subtilis</i>	Sobrenadante libre de células	24 h	30 °C	7.76	4.7–25	-	Extracelular	(El-Bendary <i>et al.</i> , 2022)
<i>Citricoccus sp.</i>		48 h	30°C	-	25–65	Esféricas	Extracelular	(Camas <i>et al.</i> , 2018)
<i>Paracoccus haeundaensis</i>		15 minutos	70 °C	-	15-35	Esféricas	Extracelular	(Patil <i>et al.</i> , 2019)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		24 h	37 °C	-	15–30	Hexagonales	Extracelular	(Husseiny <i>et al.</i> , 2007)
<i>Streptomyces flavolimosus</i>		72 h	38 °C	-	4-20	Esféricas	Extracelular	(El-Naggar <i>et al.</i> , 2023)
<i>Streptomyces sp.</i>		72 h	28 °C	8	43	Esféricas	Extracelular	(Ünlüer <i>et al.</i> , 2023)
<i>Vibrio alginolyticus</i>		24 h	-	-	50–100	Irregulares	Extracelular	(Rajeshkumar <i>et al.</i> , 2021)
Hongos								
<i>Coriolus versicolor</i>	Biomasa activa	6 h	37 °C	3	100-300	Esféricas y elípticas	Intracelular	(Sanghi & Verma, 2010)
<i>Penicillium sp.</i>		48 h	28 °C	-	30	Esféricas	Intracelular	(Zhang <i>et al.</i> , 2009)
<i>Phoma sp.</i>		48 h	28 °C	-	10–100	Esféricas	Extracelular	(Nejad <i>et al.</i> , 2022)
<i>Yarrowia lipolytica</i>		72 h	30 °C	7 y 9	15	Triangulares y hexagonales	Extracelular	(Agnihotri <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aspergillus flavus</i>	Sobrenadante libre de células	2 minutos	30 °C	7	12	Esféricas	Extracelular	(Abu-Tahon <i>et al.</i> , 2020)

<i>Aspergillus niger</i>		96 h	28 ± 2 °C	-	7-18	Esféricas	Extracelular	(Bhambure <i>et al.</i> , 2009)
		48 h	58 °C	7	50	Hexagonales	Extracelular	(Cai <i>et al.</i> , 2023)
<i>Aspergillus sp.</i>		7 dias	30 °C	-	-	Varillas	Intracelular	(Qu <i>et al.</i> , 2019)
<i>Aspergillus tamarii</i>		24 h	30 °C	-	80-137	Varillas	Extracelular	(Radhakrishnan <i>et al.</i> , 2021)
<i>Penicillium rubens</i>		150 minutos	40 °C	5	15	Esféricas	Extracelular	(Bhandari <i>et al.</i> , 2023)
<i>Trichoderma sp.</i>		60 h	-	7	1-24	Esféricas	Extracelular	(Qu <i>et al.</i> , 2018)
Planta								
<i>Dittrichia viscosa</i>	Extracto acuoso	10 h	-	-	20-50	Esféricas y triangulares	Extracelular	(Ayyoub <i>et al.</i> , 2022)
<i>Graviola</i>		-	-	8	20-30	Esféricas	Extracelular	(Kamala & Priya, 2020)
<i>Physalis minima</i>		1 h	-	-	15	Esféricas	Extracelular	(Sekar <i>et al.</i> , 2022)
<i>Tinospora cordifolia</i>		24 h	-	-	16.25	Esféricas	Extracelular	(Ali <i>et al.</i> , 2022)
<i>Pistacia vera</i>	Extracto de cascara	30 minutos	50 °C	-	20-35	Esféricas	Extracelular	(Shirzadi-Ahodshti <i>et al.</i> , 2023)
<i>Garcinia mangostana</i>		5 minutos	Ambiente	-	47.92±4.9	Esféricas	Extracelular	(Lee <i>et al.</i> , 2017)
<i>Moringa oleifera</i>	Extracto de corteza	5 minutos	Ambiente	-	17-21	Anisotrópica	Extracelular	(Mondal <i>et al.</i> , 2021)
<i>Artemisia absinthium</i>	Extracto de hojas	2 h	45 °C	-	13.40	Esféricas y rectangulares	Extracelular	(Keskin <i>et al.</i> , 2021)
<i>Artemisia herba-alba</i>		2 minutos	25 °C	-	12-20	Varillas	Extracelular	(Abdalhamed <i>et al.</i> , 2021)
<i>Curcumae Kwangsiensis</i>		1 h	25 °C	-	8-25	Esféricas	Extracelular	(Chen <i>et al.</i> , 2021)
<i>Lycoris aurea</i>		overnight	-	-	24.1	Esféricas	Extracelular	(Ying <i>et al.</i> , 2019)
<i>Morus alba</i>		2 minutos	25 °C	-	12-20	Varillas	Extracelular	(Abdalhamed <i>et al.</i> , 2021)
<i>Persicaria salicifolia</i>		Instantáne	Ambiente	-	5-23	Esféricas	Extracelular	(Hosny & Fawzy,

<i>Psidium guajava</i>		0	27 °C	-	20-35	Esféricas, triangulares, hexagonales	Extracelular	2021) (Deshpande <i>et al.</i> , 2009)
<i>Syzygium aromaticum</i>		-	27 °C	-	5–100	Irregulares	Extracelular	(Deshpande <i>et al.</i> , 2010)
<i>Acacia sinuata</i>	Extracto de semilla	2 h	-	-	46	Esféricas	Extracelular	(Meti <i>et al.</i> , 2023)

3.7.4 Parámetros que controlar en la biosíntesis de AuNPs

La síntesis de nanopartículas es un proceso sensible a múltiples factores que pueden influir significativamente en sus características finales. Entre estos factores destacan la concentración de precursor, la naturaleza y concentración de los extractos utilizados, el tipo de microorganismo empleado, así como las condiciones de reacción como tiempo de incubación, temperatura, pH, iluminación, aireación y presión (Bharde *et al.*, 2007; Bharde *et al.*, 2007b; Ahmed *et al.*, 2016c; Akhtar y Pathak, 2017; Pinto *et al.*, 2017).

3.7.4.1 pH

El pH es un factor crítico que afecta la síntesis de nanopartículas de oro (tabla 5), al producir alteraciones en los grupos funcionales de la biomasa o bien de los extractos utilizados para la biosíntesis (Panda y Deepa, 2011).

Las variaciones en el pH durante la exposición a iones de oro tienen un impacto en el tamaño, la morfología, ubicación y la cantidad de partículas biosintetizadas (Dehviri *et al.*, 2019; Ariski *et al.*, 2023). Se han recopilado ensayos que muestran cómo un aumento en el pH provoca cambios en la morfología de las NPs obtenidas o bien un aumento de tamaño y morfologías variables con un pH más básico (Golhani *et al.*, 2020). De igual manera, la acumulación óptima de oro por parte de las células microbianas normalmente ocurre en el rango de pH 2 a 6 (Waghmare *et al.*, 2014).

El valor de pH en el que se llevan a cabo las reacciones de biosíntesis es igualmente crucial para garantizar la estabilidad en el tiempo de las nanopartículas (NPs). Síntesis realizadas a pH dentro del rango neutro (7) y pH ácidos muestran una mayor estabilidad (Osman *et al.*, 2018).

Tabla 5. Relación entre pH y morfología en la biosíntesis de AuNPs. Elaboración propia.

Organismo	pH	Tamaño	Forma	Referencia
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	4	25-30 nm	Esférica	(Oza <i>et al.</i> , 2012)
	8	20 nm	Esférica	
	10	10 nm	Esférica	
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	4	50–400 nm	Esféricas y triangulares	(Singh & Kundu, 2013)
	7	10–20 nm	Esférica	
Pulpa de	2	200 nm	Triangular	(Castro <i>et al.</i> , 2010)

remolacha azucarera	4	160 y 20 nm	Esféricas y triangulares	
	7	25x40-290 nm	Nanorods	
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	1.5	10-15 nm	Esféricas	(Chen <i>et al.</i> , 2011)
	2	15-20 nm	Esféricas	
	2.5	15-20 nm	Esféricas	
	3	15-25 nm	Esféricas	
	3.5	20-45 nm	Esféricas	
	4	25-50 nm	Esféricas	

3.7.4.2 Temperatura

El control de la temperatura de reacción permite regular la duración del proceso de síntesis. Una reducción de la temperatura durante el proceso de síntesis facilita una formación gradual de nanopartículas, en consecuencia, la disminución en la concentración de AuNPs. Es decir, a una temperatura de reacción más alta, la duración de la reacción se reduce significativamente (Ariski *et al.*, 2023; Chamkouri *et al.*, 2023); debido a que a temperaturas más altas los átomos de Au podrían moverse más rápido y el número de colisiones efectivas aumentaría rápidamente, lo que resulta en una reducción más rápida de los átomos Au^{3+} en átomos con valencia cero Au^0 (Doan *et al.*, 2020).

El tamaño de las nanopartículas de Au intracelulares aumenta con el aumento de la temperatura, debido a que a una mayor temperatura se produce un proceso de nucleación secundaria sobre la superficie de los núcleos preformados, mientras que a temperaturas bajas este proceso no ocurre, lo que lleva a la forma de nanopartículas esféricas pequeñas. Por otra parte, la temperatura constante beneficia la formación de AuNPs con buena monodispersidad (Zhang *et al.*, 2009).

3.7.4.3 Concentración de precursor

El aumento en la concentración de iones de oro conduce a cambios en la longitud de onda máxima hacia valores mayores, lo que indica la formación de AuNPs de mayor tamaño (Doan *et al.*, 2020). De igual manera, la concentración de $HAuCl_4$ conlleva cambios en la forma de las nanopartículas, siendo que a menor concentración se obtienen nanopartículas esféricas de 10 a 20 nm de tamaño, mientras que a mayor concentración se obtienen nanohilos de oro de 50 nm a 60 nm de diámetro, con estructura de red (Panda y Deepa, 2011).

Las AuNPs con tamaños de núcleo variables se preparan mediante la reducción de sales de oro en presencia de agentes estabilizadores apropiados que evitan la

aglomeración de partículas (Ghosh *et al.*, 2008).

3.7.5 Mecanismo

Los mecanismos que se consideran para la biosíntesis de nanopartículas incluyen sistemas de eflujo, alteración de la solubilidad y toxicidad vía reducción u oxidación (figura 9), bioadsorción, bioacumulación, complejación extracelular o precipitación de metales y falta de sistemas específicos de transporte de metales (Chokriwal *et al.*, 2014). La pared celular de los microorganismos también desempeña un papel importante en la síntesis de nanopartículas. Las enzimas, proteínas, lípidos y carbohidratos, (Markus *et al.*, 2016)

presentes dentro y fuera de la pared celular bio reducen los iones metálicos a nanopartículas y, finalmente, las nanopartículas de menor tamaño se difunden a través de la pared celular o bien se difunden al medio (figura 6) (Ghosh *et al.*, 2021).

Un ejemplo es el caso de *Lactobacillus* spp., con la cual Nair y Pradeep (2002) reportaron que, durante el paso inicial de síntesis de nanopartículas, se produce la nucleación de grupos de iones metálicos, mientras que existe una interacción electrostática entre la célula bacteriana y los grupos metálicos, lo que conduce a la formación de nanoaglomerados o *nanoclusters*, los cuales representan las primeras etapas de agregación de átomos o moléculas. A medida que aumenta el número de componentes, se pasa de los *nanoclusters*, con hasta 100 átomos, a las nanopartículas, que pueden contener hasta 1,000 o más átomos (Peng *et al.*, 2020).

Posteriormente, los *nanoclusters* de menor tamaño se difunden a través de la pared celular bacteriana. También se encontró un mecanismo similar en hongos para la síntesis de nanopartículas. Mukherjee y colaboradores en 2001 reportaron sobre un mecanismo para la síntesis de nanopartículas utilizando especies de *Verticillium*. El mecanismo de síntesis de nanopartículas se dividió en captura, biorreducción y síntesis (Mukherjee *et al.*, 2001).

Aún no se ha ideado el mecanismo exacto para la síntesis de nanopartículas utilizando agentes biológicos, ya que diferentes agentes biológicos reaccionan de manera distinta con los iones metálicos y también existen diferentes biomoléculas responsables de la síntesis de nanopartículas (Gudikandula *et al.*, 2017).

Entre la biosíntesis de nanopartículas de oro, la síntesis extracelular ha recibido mucha atención ya que elimina varios pasos de síntesis (Ahmed *et al.*, 2016), como el proceso de recubrimiento de las nanopartículas, vital para su estabilidad (Álvarez-Chimal & Arenas-Alatorre, 2023). Los agentes biológicos secretan una gran cantidad de enzimas capaces de hidrolizar metales y así provocar una reducción enzimática de iones metálicos.

De hecho, los microbios pueden ayudar en la síntesis de diversos óxidos metálicos mediante procesos de respiración (Kim *et al.*, 2018). Los electrones pueden pasar de compuestos orgánicos a compuestos inorgánicos a través de la respiración anaeróbica microbiana, promoviendo la formación de nanopartículas, realizando a su vez procesos de biorremediación (Ghosh *et al.*, 2021).

Se sabe que el género *Shewanella* es capaz de oxidar ácidos orgánicos, actuando como donadores de electrones para reducir metales inorgánicos (Harris *et al.*, 2018). Así, el mecanismo para reducir especies de metales tóxicos en nanopartículas metálicas ha sido desarrollado por microorganismos como una manera de desintoxicar el entorno celular inmediato (Murray *et al.*, 2017).

Se reportó un mecanismo de síntesis extracelular de AuNPs utilizando *Rhodopseudomonas capsulata*, en el que la biorreducción de los iones de oro se inicia mediante la transferencia de electrones desde el NADH mediante la reductasa dependiente de NADH como portador de electrones. A continuación, los iones (Au^{3+}) obtienen electrones y se reducen a oro elemental (Au^0) y por lo tanto, dan como resultado la formación de AuNPs. Del mismo modo, la síntesis de NPs por la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* implica la acción de la enzima reductasa dependiente de NADPH que convierte Au^{3+} en Au^0 a través de una reducción enzimática (Tikariha *et al.*, 2012).

Se ha descubierto que bacterias como *Delftia tsuruhatensis* GX-3 biomineralizan extracelularmente nanopartículas de oro. Se observó que la excreción de una proteína fijadora de soluto y/o una porina son responsables de la desintoxicación y fabricación de nanopartículas de oro mediante la transferencia de electrones a Au^{3+} (Golhani *et al.*, 2020).

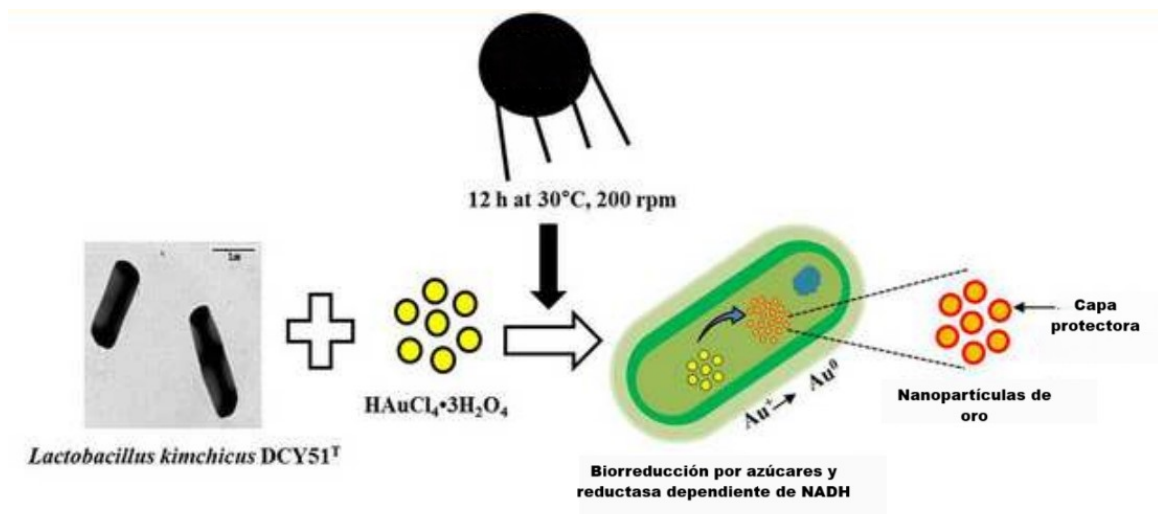


Figura 9. Representación del mecanismo de biosíntesis intracelular de AuNPs utilizando *L. kimchicus*. Tomada y modificada de Markus y colaboradores, 2016

3.7.6 Aplicaciones de las AuNPs

Los materiales a nanoescala muestran diversas propiedades tanto físicas como

químicas dependiendo de las características del material como lo son las moléculas presentes en la superficie, el tamaño, la forma y el estado de agregación (Elahi *et al.*, 2018). Estas características proporcionan una alta relación superficie-volumen que confiere características fisicoquímicas diferentes con los macromateriales (Liu *et al.*, 2020).

Entre la variedad de nanomateriales, las nanopartículas metálicas, especialmente las de oro, han ganado interés debido a sus características particulares (Kitching *et al.*, 2014). Las principales características de las AuNPs (tabla 6) incluyen propiedades optoelectrónicas únicas (Elahi *et al.*, 2018) relacionadas con la forma, gran relación superficie-volumen, excelente biocompatibilidad y baja toxicidad; estas propiedades las convierten en herramientas excepcionales en biotecnología (Elahi *et al.*, 2018).

Los atributos fisicoquímicos que muestran las AuNPs las convierten en andamios para una gran variedad de aplicaciones (tabla 7) en campos como la terapéutica, la detección y el diagnóstico (Sardar *et al.*, 2009), el bioetiquetado, la administración de fármacos (Tomar & Garg, 2012), la detección química y biológica (Yeh *et al.*, 2012), la obtención de imágenes, la óptica no lineal, la energía fotovoltaica y la catálisis (Waclawek *et al.*, 2018).

Tabla 6. Propiedades de las nanopartículas y su importancia.

Propiedades	Importancia
Estado de agregación	Las nanopartículas que tienen tendencia a agregarse pueden mantener su funcionalidad, sin embargo, el aumento de tamaño podría conducir a una disminución de la absorción.
Composición elemental	Una composición diferente de las partículas conduce a un comportamiento/impacto diferente, p. Cd versus Fe.
Concentración de masa	Normalmente, una mayor concentración de contaminantes conduce a un aumento de la toxicidad/impacto, esto no siempre es aplicable a las nanopartículas.
Concentración de número de partículas	Las nanopartículas tienen bajas concentraciones en masa, pero muestran un alto porcentaje del número total de partículas.
Forma	Las diferentes formas de las partículas (esféricas, tubulares, etc.) Pueden tener diferentes afinidades o accesibilidades, como el transporte a través de las membranas hasta las células o un comportamiento antibacteriano diferente.
Tamaño y distribución de tamaño	Las nanopartículas se definen y clasifican por su tamaño, y éste es una de las principales propiedades que describen el comportamiento del transporte.
Solubilidad	Nanopartículas solubles; su forma iónica puede ser nociva o tóxica.
Especiación	Diferentes especies pueden tener diferente comportamiento, toxicidad, impacto.
Estructura	La estructura puede influir en la estabilidad o el comportamiento.
Área superficial (y porosidad)	El aumento de la superficie aumenta la reactividad y el comportamiento de sorción.
Carga superficial	La carga superficial influye en la estabilidad de las partículas, especialmente en las dispersiones.
Química superficial	Las moléculas estabilizantes pueden tener diferentes composiciones químicas e influir en el comportamiento o la toxicidad de las partículas.

Tabla 7. Aplicaciones de las nanopartículas de oro. Elaboración propia.

Agente reductor	Forma	Tamaño (nm)	Aplicación	Referencia
<i>Acalypha indica</i> <i>Linn</i>	Esféricas	20–30	Potenciales agentes anticancerígenos que mostraron efectos citotóxicos y características apoptóticas contra líneas celulares del cáncer de mama.	(Krishnaraj <i>et al.</i> , 2014)
<i>Acroscyphus sphaerophoroides</i>	Cuasiesféricas y prismáticas	5–35	Las nanopartículas de oro sintetizadas utilizando biomasa seca de una especie de líquen de gran altitud, <i>A. sphaerophoroides</i> , mostraron una potente actividad antioxidante cuando se utilizaron como biomatriz cargada.	(Debnath <i>et al.</i> , 2016)
<i>Artemisia dracunculus</i>	Triangulares	100–150	Las nanopartículas de oro se consideran excelentes catalizadores, por ejemplo, en la reducción de 4-nitrofenol (4-NP) a 4-aminofenol (4-AP) mediante borohidruro de sodio (NaBH ₄).	(Wacławek <i>et al.</i> , 2018)
BPS-30	Esféricas	50 ± 5	Reducción de 4-nitroanilina (4-NA) a 4-aminoanilina mediante borohidruro de potasio (KBH ₄) en fase acuosa.	(Jia <i>et al.</i> , 2012)
Cáscara de cebolla	Esféricas y triangulares	45-42	Efectos antibacterianos y anticandidiasis sinérgicos contra diversos microorganismos patógenos, así como un fuerte potencial antioxidante e inhibidor del proteasoma.	(Patra <i>et al.</i> , 2016)
<i>Callistemon citrinus</i>	Esféricas	37	Inhibición de tres cepas de bacterias Gram negativas y cuatro Gram positivas (<i>Escherichia coli</i> , <i>Vibroalginolyticus</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Staphylococcal enteritis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria ivanovii</i> y <i>Mycobacterium smegmatis</i>).	(Rotimi <i>et al.</i> , 2019)

<i>Cucurbita pepo</i>	Esféricas y triangulares	2-7	Actividad inhibidora eficaz contra <i>Escherichia coli</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> .	(Krishnaraj <i>et al.</i> , 2019)
<i>Curcuma kwangsiensis</i>	Esféricas	8-25	Propiedades antioxidantes contra DPPH, así como actividades contra el cáncer de ovario en líneas celulares SK-OV-3, SW-626 y PA-1 sin ninguna citotoxicidad en la línea celular normal (HUVEC).	(Chen <i>et al.</i> , 2021)
<i>Escherichia coli</i>	Nanoplacas	50	Biocatalizador con AuNPs unidas a una fracción de membrana de células de <i>E. coli</i> K12, que sirve como catalizador heterogéneo eficiente en la reducción completa de 4-nitrofenol en presencia de NaBH ₄ .	(Srivastava <i>et al.</i> , 2013)
<i>Fusarium sp.</i>	Esféricas	30.16 ± 17	Nanocatalizador reutilizable en la reducción de los compuestos tóxicos p-nitrofenol, o-nitrofenol y o-nitroanilina utilizando borohidruro sódico (NaBH ₄). Reductor de compuestos nitroaromáticos a una concentración cien veces superior en comparación con los catalizadores existentes.	(Guria <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lactobacillus kimchicus</i>	Esféricas	5-30	Las nanopartículas de oro (AuNPs) sintetizadas por un microorganismo probiótico mediante un mecanismo de unión a la membrana intracelular y estabilizadas por residuos de aminoácidos y proteínas unidas a la superficie sirvieron como captadores de radicales libres contra el DPPH.	(Markus <i>et al.</i> , 2016)

<i>Penicillium aculeatum</i>	Esféricas	60	Las nanopartículas de oro sintetizadas utilizando <i>Penicillium aculeatum</i> mostraron ser un potencial agente escolicida para la hidatidosis quística causada por la fase larvaria de la tenia del perro <i>Echinococcus granulosus</i> .	(Barabadi <i>et al.</i> , 2017)
<i>Synechocystis sp.</i>	Esféricas	5.6–54.5	Cianobacterias biofotovoltaicas con nanopartículas de oro intracelulares para generar biofotocorriente de forma eficaz y autosostenible, aumentando los electrones fotoexcitados y mejorando la conducción eléctrica para la transferencia de electrones a través de la membrana celular.	(I. Liu & Choi, 2021)
<i>Turbinaria decurrens</i> Bory	Esféricas	10–19	Actividad anticancerígena contra las líneas celulares MCF-7, HEPG-2, and HCT-116, así como su potencial como candidato terapéutico en el tratamiento de enfermedades de estrés oxidativo, particularmente el cáncer.	(Hasan <i>et al.</i> , 2022)

4. Justificación

La síntesis de nanopartículas de oro ha experimentado un auge en los últimos años debido a sus diversas aplicaciones y propiedades en campos como la medicina, la electrónica y la catálisis. Tradicionalmente, la síntesis química ha sido el método más utilizado para obtener estas nanopartículas, gracias al control de características de las nanopartículas sintetizadas. Sin embargo, debido a que estas técnicas resultan laboriosas y generan productos secundarios tóxicos, se ha buscado alternativas como la biosíntesis.

En los últimos años, la biosíntesis ha emergido como una alternativa atractiva, ofreciendo una serie de ventajas significativas como la biocompatibilidad, la posibilidad de funcionalizar las nanopartículas con biomoléculas específicas y la sostenibilidad, ya que se utiliza organismos vivos y/o sus componentes (como bacterias, hongos o plantas) como agentes reductores y estabilizantes. Esto la convierte en un proceso más amigable con el medio ambiente, ya que reduce el uso de productos químicos y genera menos residuos. Sus ventajas la convierten en una tecnología prometedora con un gran potencial para diversas aplicaciones en el futuro.

Los tibicos, o granos de kéfir de agua, son un consorcio de microorganismos, conformados por bacterias y levaduras, que fermentan azúcares para la producción de una bebida probiótica. A pesar de su popularidad como alimento funcional, los tibicos también son una fuente de una amplia gama de metabolitos secundarios con un gran potencial para distintas aplicaciones biotecnológicas. Los tibicos son capaces de producir una amplia variedad de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y prebióticas, como lo son los ácidos orgánicos, exopolisacáridos, vitamina B12, además de enzimas. Además, los tibicos son una fuente barata, sostenible y versátil de metabolitos secundarios. Lo anterior, gracias a que son fáciles y económicos de cultivar y mantener.

Este trabajo busca evaluar el potencial de los tibicos para biosintetizar nanopartículas de oro y caracterizarlas; aprovechando la sorprendente capacidad de producción de metabolitos secundarios que ofrece este consorcio microbiano que, junto con la facilidad y economía de su mantenimiento, los convierte en los candidatos ideales para ser utilizados como agentes reductores en una síntesis verde de AuNPs.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

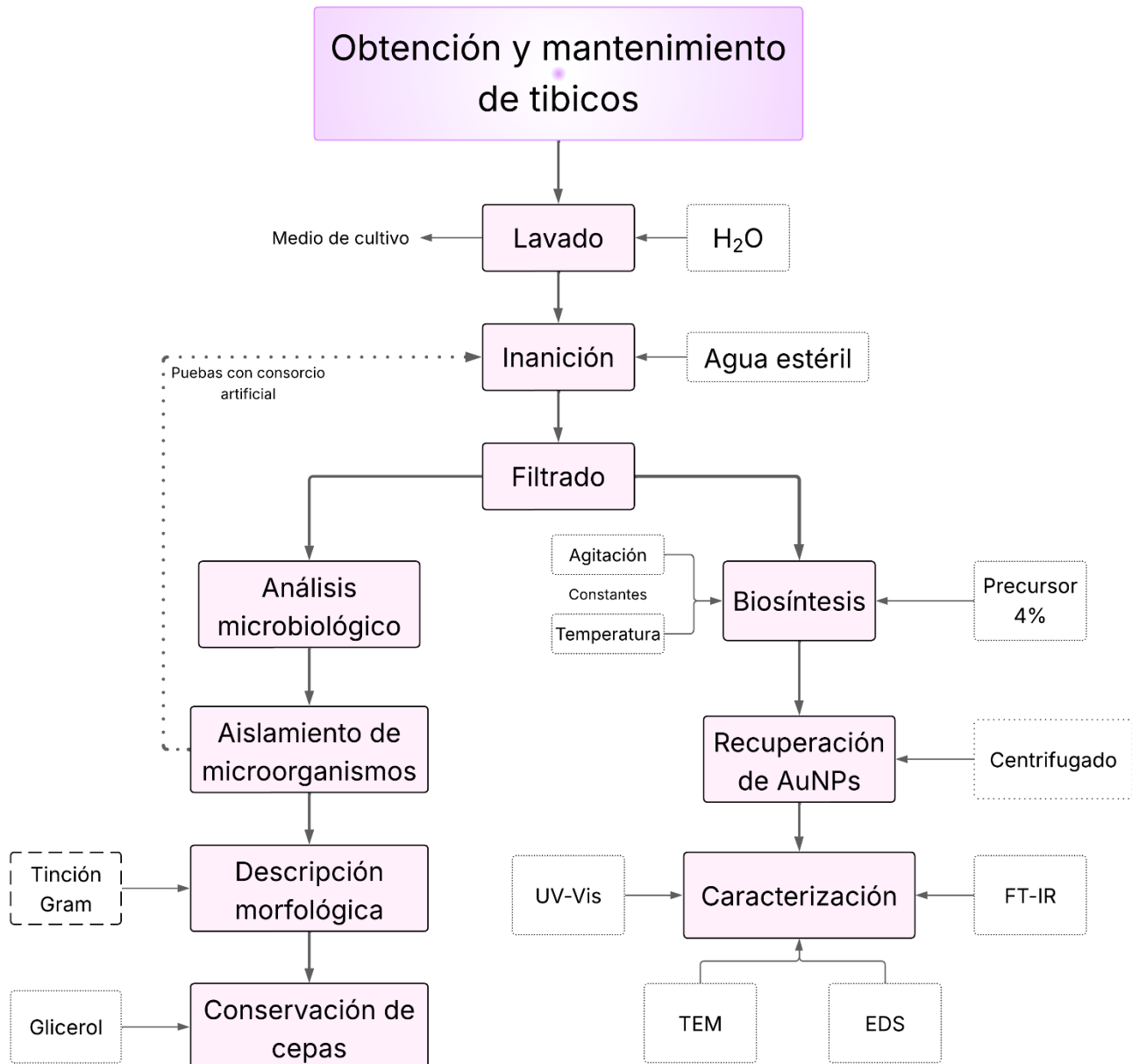
- Biosintetizar AuNPs empleando compuestos bio-reductores producidos por los consorcios microbianos de los granos de tibicos y sus aislados, con la finalidad de demostrar su capacidad para realizar síntesis verde.

5.2. Objetivos particulares

- Aislar, seleccionar y describir microorganismos a partir de los consorcios microbianos sometidos a estrés por inanición.
- Generar y probar un consorcio microbiano artificial en la biosíntesis de nanopartículas de oro.
- Evaluar la capacidad de los consorcios microbianos de realizar biosíntesis de nanopartículas de oro.
- Caracterizar las nanopartículas biosintetizadas mediante espectroscopia UV-visible, FT-IR y Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).
- Comparar la capacidad de biosíntesis de las AuNPs entre los consorcios microbianos y los microorganismos aislados.

6. Materiales y métodos

6.1 Diagrama de trabajo



6.2 Obtención y mantenimiento de tibicos

Este trabajo experimental se inició con la obtención y mantenimiento de los tibicos, procedentes de cultivos tradicionales de la Ciudad de Puebla. Para su cultivo, se prepararon dos lotes: FT (TP) y G (TG). Cada lote se inoculó con una cantidad específica de tibicos previamente lavados (20 g) en frascos de 100 mL. A continuación, se adicionó el medio piloncillo específico para tibicos (anexos) a cada frasco.

El medio de cultivo se cambió cada 48 horas para el lote FT (TP) y cada 96 horas para el lote G (TG), según las indicaciones previas a las cuales eran mantenidos, ambos se mantuvieron a temperatura ambiente (comunicación verbal).

6.3 Obtención de los sobrenadantes de tibicos

Una vez que se lograron establecer y mantener los dos lotes de tibicos (FT y G), se sometieron a inanición. Los tibicos se recuperaron del medio de fermentación mediante filtración con ayuda de un colador de metal estéril, los gránulos se lavaron tres veces con agua destilada estéril, para eliminar restos del medio de cultivo, posteriormente, los granos lavados se inocularon en agua destilada estéril al 10% p/v (figura 7) y se incubaron a temperatura ambiente durante diferentes tiempos (como se muestra en la tabla 9).

Después del período de inanición respectivo para cada sobrenadante, la biomasa fue separada mediante filtración usando un colador de metal estéril y posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos a 4 °C en una centrifuga (Centurion Scientific K241R). Una vez centrifugado, se decantó para recuperar el sobrenadante, este último se conservó en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para la biosíntesis de nanopartículas de oro y para realizar el análisis microbiológico.

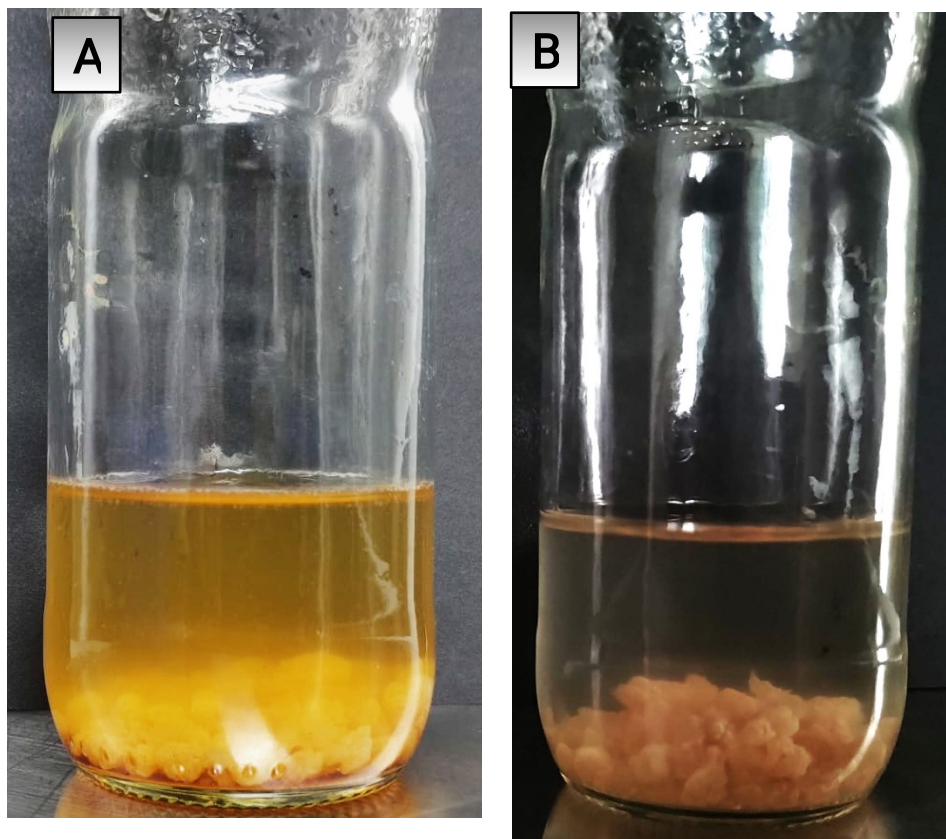


Figura 10. A) Tibicos en crecimiento en medio piloncillo al 5%, B) Tibicos en inanición en agua de garrafón estéril.

6.4 Aislamiento de microorganismos

Se tomó 1 mL del sobrenadante de tibicos resguardado a 4 °C, se homogeneizó y se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-3} . De las diluciones obtenidas se tomaron 50 μ L y se sembraron mediante extensión en superficie en los medios de cultivo GYM, YPD, PILONCILLO, MRS y GYC (anexo), y se incubaron a 30 ± 2 °C, hasta que hubo crecimiento observable.

Después de la incubación, se enumeraron las colonias y se aislaron todas las colonias que presentaron morfologías distintas, mediante subcultivos en los respectivos medios. Los aislados bacterianos se sometieron a tinción de Gram para verificar su axenidad. Todos los aislados se conservaron a -70 °C en glicerol al 30%.

6.5 Biosíntesis de Nanopartículas de Oro.

La biosíntesis de las nanopartículas de oro se realizó empleando la metodología modificada descrita por Wypij *et al.* (2021). El procedimiento se describe a continuación.

Para la preparación del precursor de la reacción de biosíntesis de nanopartículas de oro se utilizó HAuCl_4 (solución de cloruro de oro (III) o ácido cloro áurico, 484385-10G, Sigma Aldrich) el cual fue disuelto en agua destilada para tener una solución precursora al 4%, el vial utilizado se cubrió de la luz con papel aluminio para evitar la posible foto-oxidación del reactivo precursor.

Por otra parte, se agregó un volumen del sobrenadante de tibicos al frasco de reacción, previamente esterilizado. La síntesis de nanopartículas de oro se inició con la adición de 250 μL de la solución de HAuCl_4 al 4% por cada 100 mL de sobrenadante. Una vez agregado el precursor, el frasco de reacción y los controles (tabla 8) fueron cubiertos con papel aluminio y llevados a la incubadora con una temperatura y agitación constantes, para que se llevara a cabo el proceso de biosíntesis.

Tabla 8. Composición de cada uno de los reactivos empleados en la síntesis de nanopartículas de oro empleando tibicos como agente reductor y estabilizante.

Reactivo	Reacción	Control 1	Control 2
HAuCl_4	250 μL	0	250 μL
Sobrenadante de tibicos	100 mL	100 mL	0
Agua de garrafón	0	0	100 mL
Volumen de reacción	100 mL	100 mL	100 mL

Se monitoreo la biosíntesis de las nanopartículas de oro realizando un barrido en la región Uv/Vis de 300 - 800nm mediante el seguimiento de la formación de la banda del plasmón superficial en la región de 500-600 nm empleando un espectrofotómetro UV/Vis (Genesys 10S ThermoScientific). Se empleó como blanco el agua utilizada para la reacción de biosíntesis. A las 24 horas de añadido el sobrenadante de tibicos, se tomó una alícuota de la mezcla de reacción, se centrifugo y lavó tres veces para retirar residuos y concentrar el resultado de la reacción, posteriormente se determinó su absorbancia, esta lectura se consideró como la muestra T_0 . Todas las mediciones de absorbancia se realizaron usando celdas de cuarzo. A partir de la determinación T_0 se realizaron mediciones de absorbancia a las 48, 72 y 168 horas respectivamente.

Para recuperar el producto de reacción, la alícuota o el volumen de la reacción se

distribuyó en microtubos de 2 mL (según el volumen de reacción), y se centrifugó a 6000 rpm por 50 minutos en una microcentrífuga (witeg Wisd CF-10 WITEG Labortechnik).

Una vez finalizado el tiempo de reacción, los frascos se retiraron de la incubadora y se procedió a eliminar el sobrenadante. Tras completar el proceso de centrifugación, el material recuperado, que contenía las nanopartículas de oro, se resuspendió en 3 mL de agua destilada estéril y se almacenó en un vial de cristal transparente para su posterior caracterización.

El experimento se realizó en 7 ocasiones con variaciones entre los ensayos, modificando el tiempo de inanición, temperatura y velocidad de agitación durante la incubación de las reacciones, así como los tiempos de recuperación de las nanopartículas biosintetizadas tal como se señala en la tabla 9.

Tabla 9. Variaciones de las condiciones de reacción utilizadas para la biosíntesis de nanopartículas de oro mediante tiburones.

# Biosíntesis	Tiempo Inanición (d)	Obtención sobrenadante		Agua utilizada	Incubación		Recuperación		Tiempo max (h)
		Centrifugado (rpm)	Tiempo (minutos)		rpm	T (°C)	rpm	Tiempo (s)	
1	4	6000	15	Garrafón	187	-	6000	90	168
2	7 y 30	6000	15	Destilada	187	-	6000	20	150
		Filtrado/Bomba vacío							
3	18	6000	15	Garrafón	150	33-35	6000	20	144
4	5 y 18	6000	15	Garrafón	150	31.7-32.2	6000	50	144
5	18	6000	15	Garrafón	150	35	6000	60	144
6	18	6000	15	Garrafón	150	35	6000	60	168
Cinética	2 h, 1, 7, 14, 21	6000	15	Garrafón	150	35	6000	30	144

6.5.1 Primera biosíntesis de AuNPs

Después de un proceso de inanición de 4 días, los tibicos se intentaron filtrar con papel filtro, sin embargo, este absorbía mucho sobrenadante y tardaba en pasar, por lo que se optó por filtrar con un colador de metal y posteriormente se centrifugo para obtener un sobrenadante de 72 mL, el cual fue llevado a 200 mL con agua de garrafón estéril. A su vez este volumen fue dividido en dos frascos con 100 mL de sobrenadante cada uno para ser utilizados, uno como control y el otro para la reacción de síntesis con la adición de 250 µl de la solución precursora (HAuCl₄) al 4%. Tanto los controles como la reacción se mantuvieron en una incubadora con agitación a 187 rpm con una temperatura entre 33-35°C por 168h. El seguimiento de la reacción se hizo tomando alícuotas de la reacción de 10 mL, a las 24, 48 y 72 h, estas fueron centrifugadas a 6000 rpm por 90 minutos y resuspendidas en un volumen de 2 mL, y se midió tanto el pH con tiras reactivas y como la banda del plasmón superficial entre 500-600nm mediante espectroscopia UV-Vis.

6.5.2 Biosíntesis 2 de AuNPs

Se utilizaron tibicos con un tiempo de inanición de 1 mes y 1 semana respectivamente, se filtraron con papel filtro de 47 mm de diámetro y bomba de vacío, para obtener el sobrenadante. Posteriormente, se filtró una segunda vez utilizando una membrana con tamaño de poro de 0.45 µm y bomba de vacío. Y se siguió el proceso descrito en el apartado 6.5, en esta versión los frascos de reacción se mantuvieron en una incubadora con agitación a 187 rpm y 33-35 °C, por 150 h. Para el seguimiento de la reacción se tomaron alícuotas de 10ml, a las 24, 48, 72 h fueron centrifugadas a 6000 rpm por 20 minutos para concentrarlas y fueron medidas por espectroscopia UV-Vis.

6.5.3 Biosíntesis 3 de AuNPs

Se utilizaron tibicos con 18 días de inanición los cuales se colaron y centrifugaron a 6000 rpm por 15 minutos para recuperar el sobrenadante. La reacción se mantuvo en una incubadora con agitación a 150 rpm y 33-35 °C.

Para el seguimiento de la reacción de biosíntesis, se tomaron alícuotas de 10 mL a las 24, 48 y 72 h, este volumen fue dividido en tubos Eppendorf de 2 mL y fueron centrifugados en una microcentrífuga (witeg Wisd CF-10) a 6000 rpm por 20 minutos para concentrar las AuNPs y fueron resuspendidas en un volumen de 3 mL, para posteriormente medirlas por espectroscopia UV-Vis.

6.5.4 Biosíntesis 4 de AuNPs

Se utilizaron tibicos con 5 y 18 días de inanición, se realizó el proceso descrito en el apartado 6.4 y se mantuvieron en incubación a 150 rpm con 31.7-32.2 °C.

Para el seguimiento de la reacción, se tomaron alícuotas de 15 mL de reacción (24, 48, 72 h) en tubos falcón y fueron centrifugadas a 6000 rpm por 50 minutos para concentrar las AuNPs en un volumen de 3 mL y fueron medidas mediante espectroscopia UV-Vis.

6.5.5 Biosíntesis 5 y 6 de AuNPs

Se utilizaron tibicos con 18 días de inanición y se realizó el proceso ya descrito (apartado 6.4), en este caso se mantuvieron en incubación con agitación a 150 rpm a 35±0.5 °C. El seguimiento de la reacción se realizó con alícuotas de 20 mL de reacción (24, 48, 72 h) en tubos cónicos, que fueron centrifugadas a 6000 rpm por 60 minutos para concentrar las AuNPs en un volumen de 2 mL.

6.5.6 Biosíntesis cinética de AuNPs

Para verificar la reproducibilidad de la biosíntesis mediante tibicos se realizó una prueba con replicas y diferentes tiempos de inanición (2, 24, 168, 336 y 504 horas) bajo las mismas condiciones ya mencionadas.

Se instalaron frascos que contenían 5 gramos de tibicos en 50 mL de agua de garrafón, con esto se tenían frascos con tibicos del lote FT y con tibicos del lote G para cada prueba de biosíntesis con los diferentes tiempos de inanición.

Tabla 10. Composición de la síntesis tipo cinética de nanopartículas de oro empleando tibicos como agente reductor y estabilizante.

Reactivo	Reacción	Control 1	Control 2
HAuCl ₄	50 µl	0	50 µl
Sobrenadante de tibicos (FT o G)	20 mL	20 mL	0
Agua de garrafón	0	0	20 mL
Volumen de reacción	20 mL	20 mL	20 mL

Se recuperó el sobrenadante como se menciona en el apartado 6.2. A partir de

este, se tomó 20 mL para la reacción y se agregó 50 µl de la solución de HAuCl₄ al 4%; 20 mL fueron utilizados como control (tabla 10). Las reacciones se mantuvieron en una incubadora con agitación a 150 rpm y 35 °C durante 144h.

Para monitorear el proceso de biosíntesis, se tomó alícuotas de 6 mL de la reacción a las 24 h y 144 h. Estas muestras se depositaron en tubos Eppendorf de 2 mL y fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 30 minutos para concentrar las AuNPs. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet de nanopartículas, el cual se resuspendió en 2 mL de agua destilada estéril para su análisis mediante espectroscopia UV-Vis.

6.6 Caracterización de nanopartículas de oro.

Posterior a la biosíntesis, las AuNPs se caracterizaron mediante espectroscopia UV-Vis, FT-IR, TEM y EDS.

6.6.1 Espectroscopía UV-Vis.

La biorreducción de los iones Au⁺³ a Au⁰ se monitoreó por espectroscopia UV-Vis usando un equipo Genesys 10S (ThermoScientific). Los espectros de absorción se obtuvieron en el intervalo de 300-800 nm y una velocidad de barrido de 20 nm s⁻¹. Las mediciones se llevaron a cabo a partir de 24 horas, 48 h, 72 h, 144 h y hasta por 168 horas.

6.6.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).

Se prepararon muestras para análisis FT-IR de la siguiente manera: 500 µL de la suspensión de nanopartículas fueron centrifugadas a 12000 rpm por 30 minutos, lavando el sedimento con agua destilada estéril. Tras una nueva centrifugación, el sedimento se resuspendió en 50 µL de agua y 2 µL de esta suspensión se depositó en un accesorio de ATR (Pike technologies) equipado con un cristal de diamante para su análisis en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27. El secado de la muestra previo a la medición permitió obtener espectros de alta calidad.

6.6.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Las nanopartículas de oro obtenidas se caracterizaron mediante esta técnica para determinar su morfología y tamaño, así como detectar la presencia de aglomerados. El procesamiento y observación se realizó en el laboratorio Universitario de Microscopia (LUME) del instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM (IIM-UNAM) empleando un microscopio JEOL JEM-ARM200F. Las muestras para TEM, se prepararon dejando evaporar una gota de la suspensión coloidal de nanopartículas de oro, sobre rejillas de cobre recubiertas con carbono

(CF300-CU-50). La caracterización por TEM fue llevada a cabo con un microscopio electrónico de transmisión JEOL operado a un voltaje de aceleración de 200 keV.

6.6.4 Análisis de la distribución de tamaño de las AuNPs

Para realizar el análisis del tamaño de las AuNPs se utilizó el software ImageJ en su versión 1.54 (Zhang & Wang, 2023). Para ello, las imágenes se convirtieron al formato de 8-bit. Se ajustó el *threshold* (umbral) en un rango de 0-113 con un *background* (fondo) rojo para facilitar la visualización, posteriormente en los ajustes de proceso de ajuste en *binary* (binario), *erode* (erosión) y *dilate* (dilatación), para ajustar la selección de las nanopartículas de una mejor manera. Por último, se procedió a contabilizar con la herramienta "Analyze", en la configuración de esta herramienta se seleccionaron los parámetros de área, fracción de área, perímetro y diámetro de Feret's.

Posteriormente, manualmente se determinaron los diámetros de las nanopartículas y se elaboraron diagramas de distribución.

6.6.5 Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS).

La caracterización por EDS fue llevada a cabo con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-ARM200F y con ayuda del software Oxford AztecTEM.

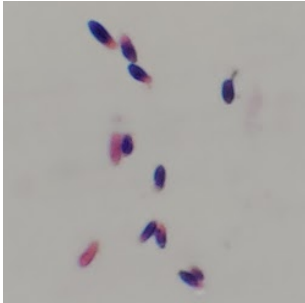

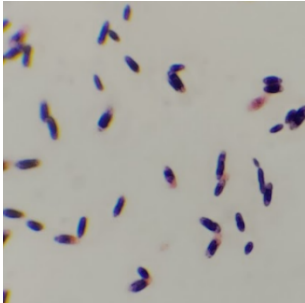

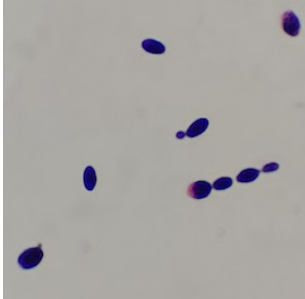

7. Resultados y discusión

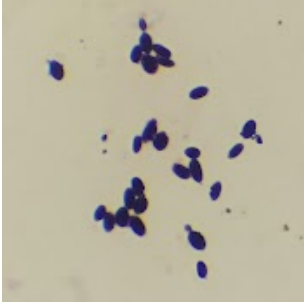

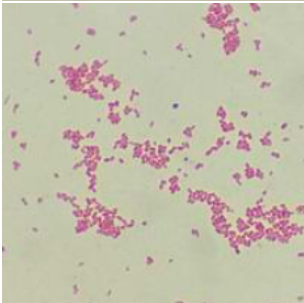



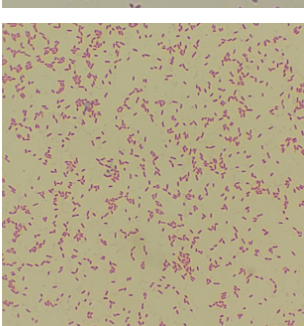



7.1 Análisis microbiológico.

A partir del análisis microbiológico se aislaron un total de 9 levaduras y 9 bacterias Gram negativas, estas cepas fueron aisladas de los sobrenadantes de tibicos con tiempos de inanición de 2, 24, 168, 336 y 504 horas, en distintas diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}).

En la tabla 11 se describen las morfologías de los microorganismos aislados del consorcio microbiano. Se obtuvieron imágenes de las tinciones realizadas (tinción Gram) y de la morfología colonial de las cepas en cultivos axénicos.

Tabla 11. Microorganismos aislados a partir de los Tibicos

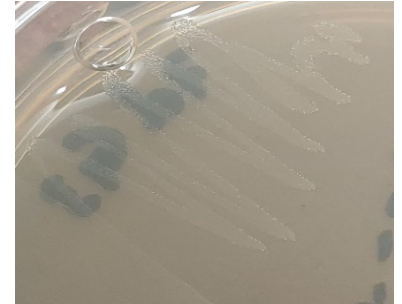
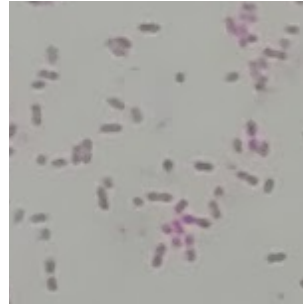
Microorganismo	Cepa	Descripción Macroscópica	Tinción	Colonias
Levadura	2hG1	Colonias medianas, blancas, planas, circulares, superficie rugosa, borde entero, opaca, mate, con un halo translucido.		
Levadura	2hT11	Colonias de 1mm, blancas, planoconvexas, superficie rugosa, borde entero, opaca, mate.		
Levadura	2hT12	Colonias de 0.5 mm, circulares, blancas, convexas, superficie lisa, borde entero, opaca, brillante.		

Levadura	24hT11	Colonias de 0.5 mm, circulares, blancas, convexas, superficie lisa, borde entero, opaca, brillante.		
Bacteria Gram (-)	24hT14	Colonias chicas, sin color, convexa, superficie lisa, borde entero, transparente, brillante.		
Bacteria Gram (-)	24hT15	Colonias irregulares, sin color, planas, superficie lisa, borde ondulado, transparente, mate.		
Bacteria Gram (-)	7dG1	Colonias pequeñas, circulares, sin color, planoconvexas, superficie lisa, borde entero, transparente, brillante.		
Bacteria Gram (-)	7dG2	Colonias pequeñas, circulares, blancas, planoconvexas, superficie lisa, borde entero, transparente, brillante.		

Bacteria
Gram (-)

7dG3

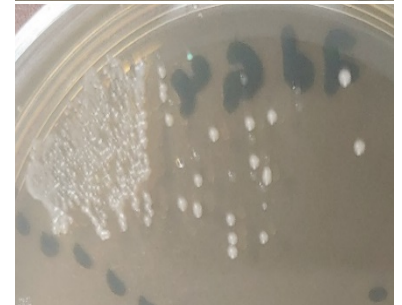
Colonias chicas,
irregulares, sin
color, convexas,
superficie lisa,
borde ondulado,
transparente,
mate.



Levadura

7dG4

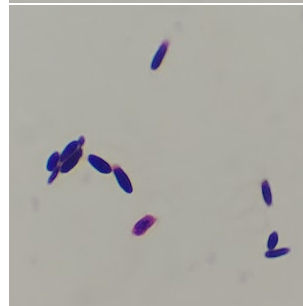
Colonias de 1
mm, circulares,
blancas,
convexas,
superficie lisa,
borde entero,
opaca, brillante.



Levadura

7dG5

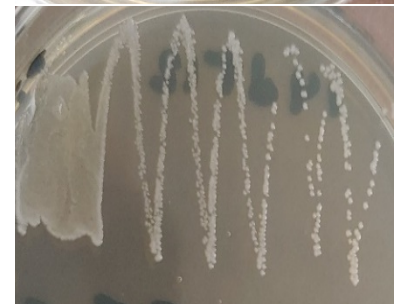
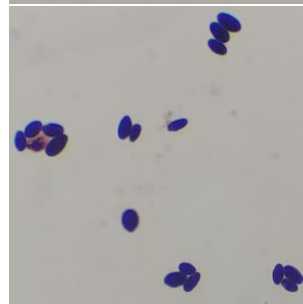
Colonias de 0.5
mm, circulares,
blancas,
planoconvexas,
superficie rugosa,
borde entero,
opaca, mate.



Levadura

14dT1
2

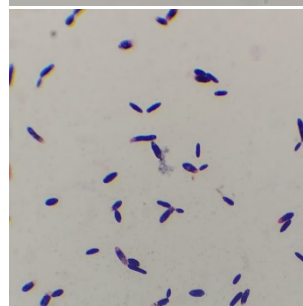
Colonias de 1
mm, circulares,
blancas,
convexas,
superficie lisa,
borde entero,
opaca, brillante.

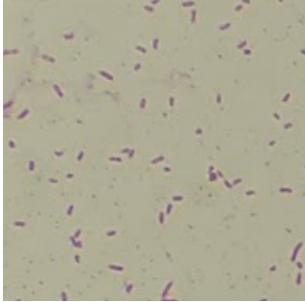

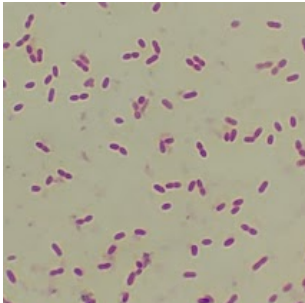



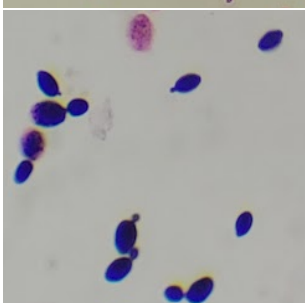





Levadura

14dT1
3

Colonias 1 mm,
circulares,
blancas, planas,
superficie rugosa,
borde entero,
opaca, mate.



Bacteria Gram (-)	14dT1 5	Colonias chicas, circulares, sin color, planas, superficie lisa, borde entero, transparente, mate.		
Bacteria Gram (-)	21dG1	Colonias chicas, circulares, sin color, pulvinadas, mucosas, superficie lisa, borde entero, transparente, brillante.		
Bacteria Gram (-)	21dG2	Colonias chicas, circulares, sin color, planas, superficie lisa, borde entero, transparente, brillante.		
Levadura	21dT1 1	Colonias de 0.5 mm, circulares, blancas, convexas, superficie lisa, borde entero, opaca, brillante.		
Bacteria Gram (-)	21dT1 2	Colonias irregulares, sin color, planas, superficie lisa, borde ondulado, transparente, mate.		

Se recuperaron 9 bacterias Gram negativa y 9 Levaduras, lo cual coincide con la población reportada en los tibicos en los que predominan lactobacilos, acetobacterias y levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*

(Martínez-Torres *et al.*, 2016). Se ha observado que la diversidad de microorganismos presentes dependen directamente de las condiciones de fermentación; sin embargo, al limitar los nutrientes o modificar las condiciones típicas de fermentación, se favorece la presencia de ciertos gremios de microorganismos. Por ejemplo, Zannini y colaboradores hallaron *Lacticaseibacillus satsumensis*, *Liquorilactobacillus nagelii* *Acetobacter fabarum* y levaduras como *Pichia* spp., bajo condiciones de nutrientes limitados (Zannini *et al.*, 2022).

Las bacterias ácido-lácticas han demostrado una notable capacidad para adaptarse a condiciones de estrés, como la carencia de carbohidratos. En respuesta a la inanición, estas bacterias experimentan cambios significativos en su metabolismo, reorientando sus rutas metabólicas hacia la utilización de fuentes de carbono alternativas. Estudios previos han reportado un aumento en el catabolismo de compuestos como inositol, glicerol, ácidos nucleicos, lípidos y aminoácidos (Papadimitriou *et al.*, 2016 y Parlindungan *et al.*, 2019). Además, se ha observado una modulación en la expresión de proteínas, al llegar a una fase estacionaria del crecimiento inducida por las condiciones de inanición, lo que sugiere una adaptación a nivel transcripcional y proteico para optimizar la supervivencia bajo condiciones de estrés (Sengupta *et al.*, 2013).

Las bacterias del ácido acético (BAA) han desarrollado estrategias de supervivencia notables ante la escasez de nutrientes. Algunas especies sintetizan un polisacárido extracelular, el levano, que actúa como un reservorio de energía. Similar al dextrano de los tíficos, este polímero de fructosa brinda a las BAA una fuente de carbono que puede ser utilizada en condiciones de inanición. Estudios previos (Kim *et al.*, 2000; Öner *et al.*, 2016) han demostrado que el levano desempeña un papel crucial en la supervivencia de estas bacterias, al proporcionarles un sustento energético cuando los recursos son limitados. Análogamente, la producción de dextrano en otros sistemas bacterianos sugiere que estos polisacáridos cumplen una función similar como reservorios de nutrientes durante períodos de estrés.

La inanición de glucosa desencadena una serie de respuestas adaptativas en las levaduras. Por un lado, se observa una marcada reducción en la movilidad molecular, afectando tanto al núcleo como al citoplasma. Esta disminución, asociada a una pérdida de volumen celular (Joyner *et al.*, 2016), limita el movimiento de componentes celulares y contribuye a la conservación de energía. Por otro lado, se activa la autofagia, un proceso de reciclaje celular que proporciona los aminoácidos necesarios para mantener las funciones vitales durante períodos de escasez (Suzuki *et al.*, 2011).

7.2 Biosíntesis de nanopartículas de oro.

A continuación, se discuten los resultados obtenidos de la síntesis y

caracterización de las nanopartículas de oro a través de la técnica de espectroscopia UV-Vis, microscopia electrónica de transmisión (TEM), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS).

7.2.1 Caracterización de nanopartículas de oro por espectroscopia UV-Vis

Durante el proceso de biosíntesis se realizaron mediciones por espectroscopia UV/Vis con el objetivo de monitorear el comportamiento de la reacción e identificar la banda del plasmón superficial, característica de las nanopartículas de oro. A continuación, se muestran los espectros UV-Vis para la solución acuosa de HAuCl_4 al 4% y el sobrenadante de tibicos después de un tiempo de inanición (figuras 8 y 9). A estos se les denominara en adelante “blancos”. Todos los blancos fueron medidos a temperatura ambiente. El espectro de la solución de HAuCl_4 muestra una banda de absorción en ~ 210 nm que indica la presencia de átomos de Au (III) libres en la solución (Karpushkin *et al.*, 2018). Es importante destacar que ninguno de los espectros de los blancos muestra absorbancia en el intervalo comprendido entre 500 y 600 nm donde teórica y experimentalmente se ha reportado que la presencia de una banda de absorción, indica la formación de nanopartículas de oro (Azzazy *et al.*, 2012).

Con la finalidad de establecer un tiempo ideal de inanición del consorcio microbiano (tibicos) para la formación de nanopartículas se prepararon diferentes muestras, añadiendo 250 μl de la solución de HAuCl_4 al 4%, por cada 100 mL de volumen del sobrenadante de tibicos con diferentes tiempos de inanición (2 h, 24 h, 96 h, 120 h, 168 h, 336 h y 504 h). El proceso de reducción de las nanopartículas de Au^{+3} a Au^0 fue monitoreado mediante espectroscopia UV-Vis por hasta 168 horas.

En la tabla 12, se puede observar los resultados obtenidos del análisis de espectrofotometría UV-Vis de las distintas versiones realizadas, así como algunas variaciones. Como se observa, la principal variable utilizada fue el tiempo de inanición, sin embargo, y como se mencionó en la metodología, la biosíntesis tipo cinética se realizó para descartar errores humanos y errores en las modificaciones realizadas en las biosíntesis anteriores y como se observa en la tabla, en las biosíntesis 2, 4 y 5, los resultados muestran variaciones derivadas de los cambios realizados en la metodología como se muestra en la tabla 9, lo que indica la sensibilidad del procedimiento de biosíntesis.

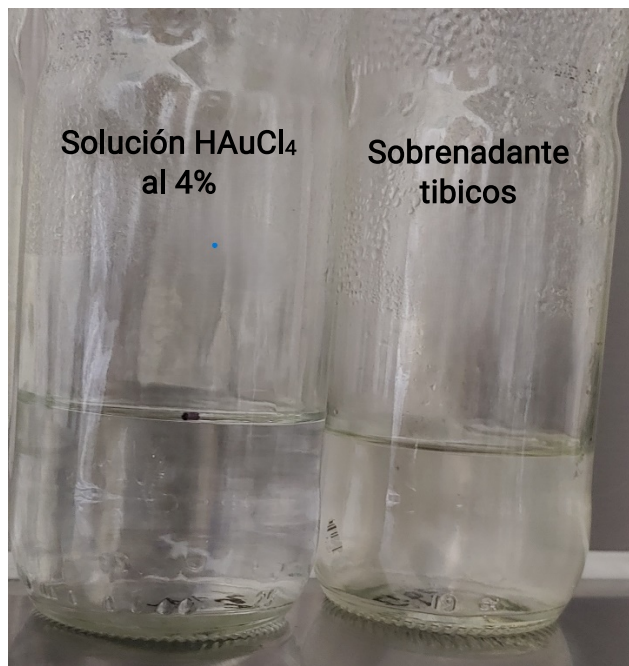


Figura 11. Controles negativos utilizados a) Solución acuosa de HAuCl₄ al 4% y b) Sobrenadante de tibicos después de un tiempo de inanición.

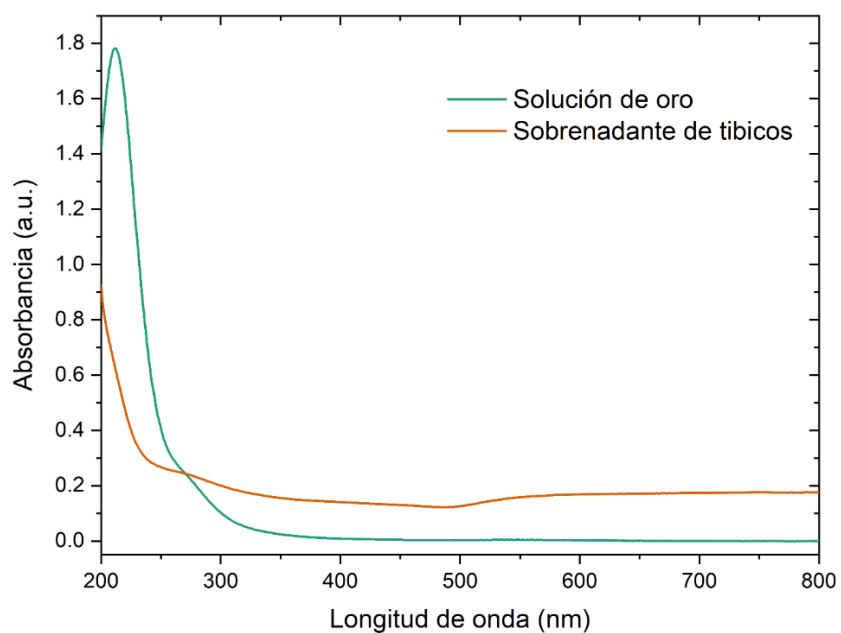


Figura 12. Espectro UV-Vis de los controles negativos utilizados en los experimentos solución acuosa de HAuCl₄ al 4% y el sobrenadante de tibicos después de un tiempo de inanición.

Tabla 12. Resultados de las distintas biosíntesis de nanopartículas de oro realizadas con variaciones de las condiciones de reacción

# Biosíntesis	Tiempo Inanición (días)	Incubación		Color	Tiempo máx. (h)	Absorbancia máx. (nm)
		rpm	T (°C)			
1	4	187	-	Rojas	168	540
2	7 y 30	187	-	Azules	150	-
3	18	150	33-35	Rojas	144	535
4	5 y 18	150	31.7-32.2	Rojas, Azules	144	540
5	18	150	35	Azules	144	577
6		150	35	Rojas	168	544
Cinética	2 h	150	35	Rojas	144	535 y 660
		150	35	Rojas	144	
	7	150	35	Rojas	144	536
	14	150	35	Rojas	144	530
	21	150	35	Rojas	144	534

7.2.1.1 Biosíntesis 1

En la figura 10 se muestra el espectro de UV-Vis de la mezcla de 100 mL de tibicos de 4 días de inanición con la solución de HAuCl₄ al 4%, alrededor de la región de ~540 nm se aprecia una banda de absorción poco definida posiblemente porque el tiempo de inanición de los tibicos es menor al que se requiere para tener una adecuada concentración de metabolitos (Oliveira *et al.*, 2017) y otros compuestos para llevar a cabo la biosíntesis, por la influencia de la temperatura y/o velocidad de agitación a la cual se incubo la reacción. La formación de AuNPs fue monitoreada por 168 horas, en ese intervalo de tiempo la coloración presento cambios significativos, pasando de incolora a café-terroso y llegando a un tono rojizo al transcurrir las 168 horas.

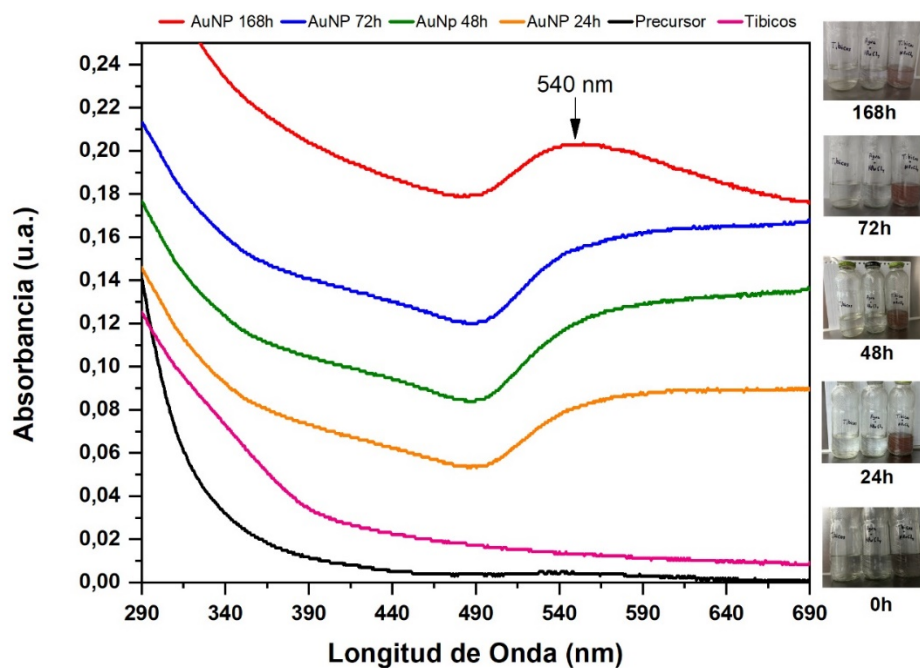


Figura 13. Espectros de absorción UV-Vis en función del tiempo, de la primera síntesis de nanopartículas de oro empleando el sobrenadante de tibicos, después de un proceso de inanición de 4 días.

7.2.1.2 Biosíntesis 2

Se realizó una segunda síntesis aumentando el tiempo de inanición a 7 y 30 días junto con una variación en la obtención del sobrenadante, utilizando una filtración en membranas de 45 μm y agua destilada; al iniciar la reacción se observó un cambio de coloración en la muestra de amarillo pálido a azul cerúleo (figura 11).

La formación se monitoreó a través de espectroscopia UV-Vis generando el espectro de la figura 12, donde se observa que el filtrado de los sobrenadantes afecta directamente la biosíntesis, llevando inclusive a evitar que se produzca.

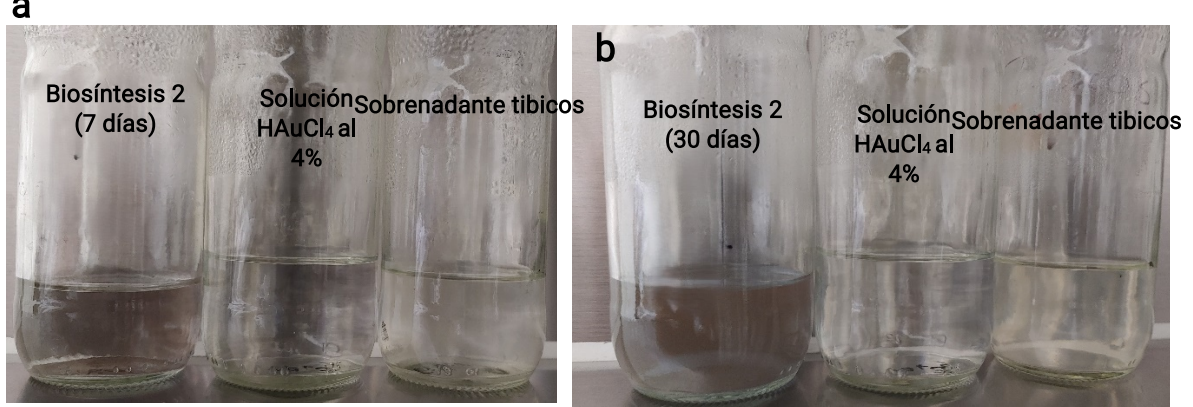


Figura 14. Reacciones de la segunda síntesis de nanopartículas de oro empleando el sobrenadante de tibicos, después de un proceso de inanición de a) 7 días y b) 30 días, y los controles negativos utilizados.

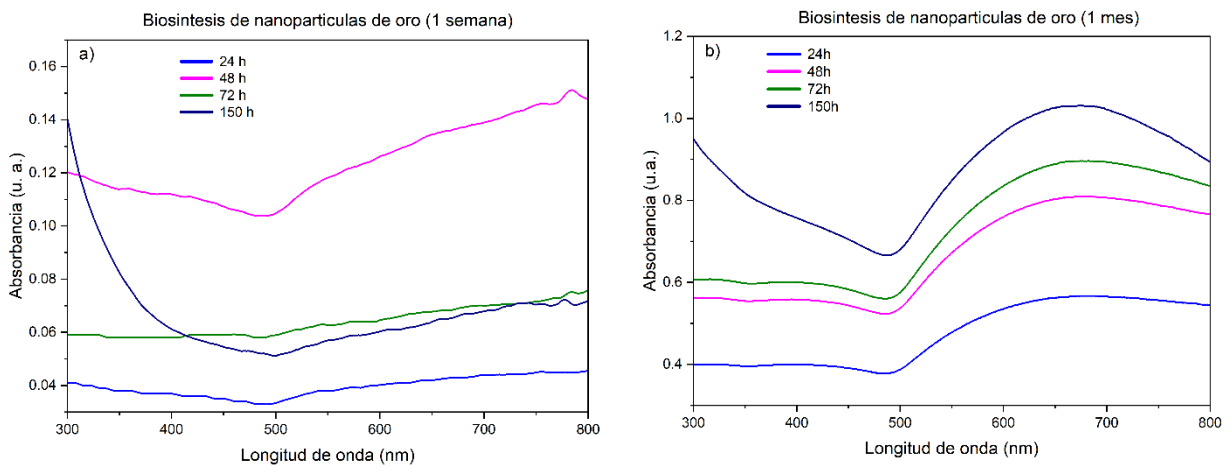


Figura 15. Espectros UV-Vis en función del tiempo, de la segunda síntesis de nanopartículas de oro empleando el sobrenadante de tibicos, después de un proceso de inanición de a) 7 días y b) 30 días. Sumado a estos se realizaron modificaciones con respecto a la primera síntesis.

7.2.1.3 Biosíntesis 3.

Retomando las condiciones de obtención del sobrenadante de la biosíntesis 1, únicamente mediante centrifugación de los tibicos en inanición, se realizó una biosíntesis con tibicos de 18 días de inanición (figura 13). La síntesis se monitoreó a través de espectroscopia UV-Vis generando el espectro de la figura 14 donde se observa que cerca de la región comprendida entre 500 y 600 nm sobresale una banda ancha de absorción en ~ 535 nm característica de la presencia de nanopartículas de oro (Yi *et al.*, 2013) y que va en aumento hasta por 144 horas. De acuerdo con Bansal *et al.* (2020) cuando los espectros exhiben una sola banda de

absorción se infiere la presencia de nanopartículas de oro con formas esféricas.

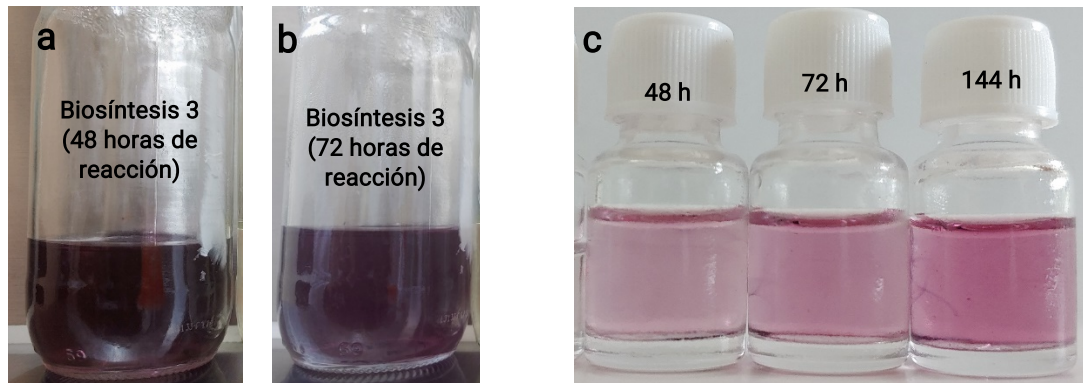


Figura 16. Tercera biosíntesis de nanopartículas de oro empleando sobrenadante de tibicos, después de un proceso de inanición de 18 días, a las a) 48, b) 72 horas, y c) las muestras medidas a los diferentes tiempos de reacción (48, 72 y 144 horas).

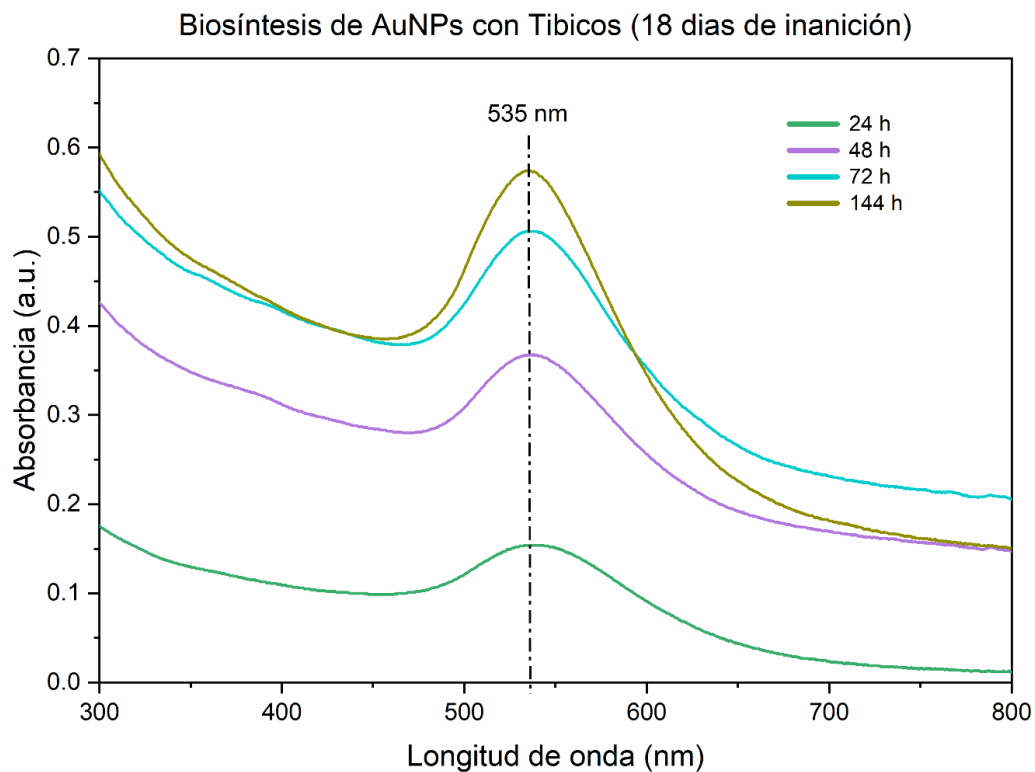


Figura 17. Espectros UV-Vis en función del tiempo, de la tercera síntesis de nanopartículas de oro empleando sobrenadante de tibicos, después de un proceso de inanición de 18 días.

7.2.1.4 Biosíntesis 4

Durante la biosíntesis con tibicos de 5 días de inanición (Véase figura 16a) el espectro UV-Vis muestran bandas de absorción a los diferentes tiempos, con una banda de mayor intensidad alrededor de 540 nm, con una forma más ancha y poco definida en comparación con otros tiempos de inanición. Esto podría sugerir, al igual que en la primera síntesis (figura 9), que el tiempo de inanición no fue suficiente para lograr una adecuada concentración de metabolitos y compuestos para llevar a cabo la biosíntesis.

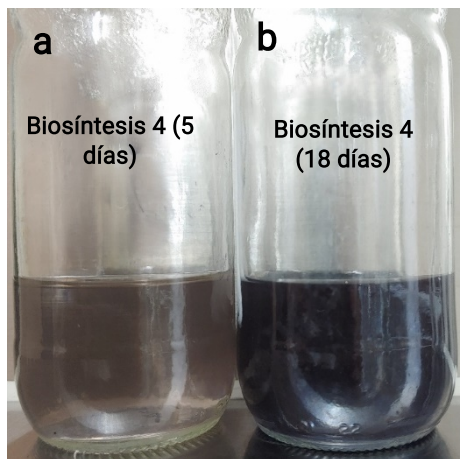


Figura 18. Cuarta biosíntesis de nanopartículas de oro empleando sobrenadante de tibicos, después de un proceso de inanición de a) 5 y b) 18 días.

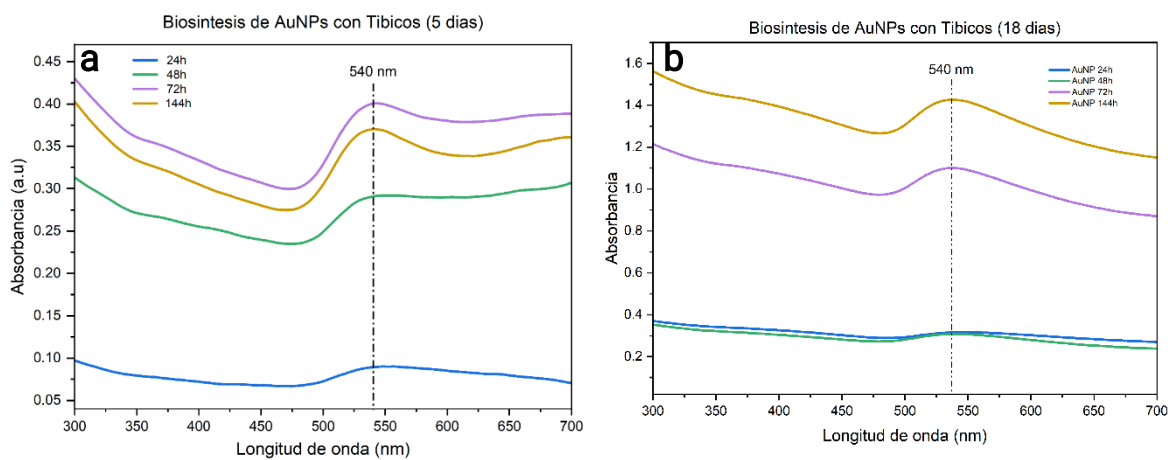


Figura 19. Espectros UV-Vis en función del tiempo, de la cuarta síntesis de nanopartículas de oro empleando sobrenadante de tibicos, después de un proceso de inanición de a) 5 días y b) 18 días.

En la figura 16b, se aprecia el espectro UV-Vis de la biosíntesis realizada con

tibicos de 18 días de inanición, el espectro de absorción muestra una banda ancha de absorción en 577 nm posiblemente debido a la presencia de nanopartículas esféricas de un tamaño mayor. De acuerdo con Haiss *et al.* (2007), bandas anchas y con absorbancia máxima más cercana a los 600 nm sugieren la presencia de nanopartículas con tamaños alrededor de los 100 nm.

7.2.1.5 Biosíntesis 5 y 6

Como observamos en la quinta y sexta síntesis realizadas (figuras 17-19), ambos llevados a cabo bajo los mismos parámetros, se observan resultados distintos, como se observa en las figuras 17-19, en ambas biosíntesis de utilizo un tiempo de inanición de 18 días, sin embargo los resultados difieren en ambas biosíntesis mostrando en la sexta síntesis una banda definida en 570 nm mientras que en la quinta síntesis las bandas obtenidas no son definidas, al igual que la coloración de las reacciones una roja y otra azul, respectivamente, lo que nos llevó a considerar las pruebas realizadas como poco representativas de lo que estaba ocurriendo en el proceso de biosíntesis.

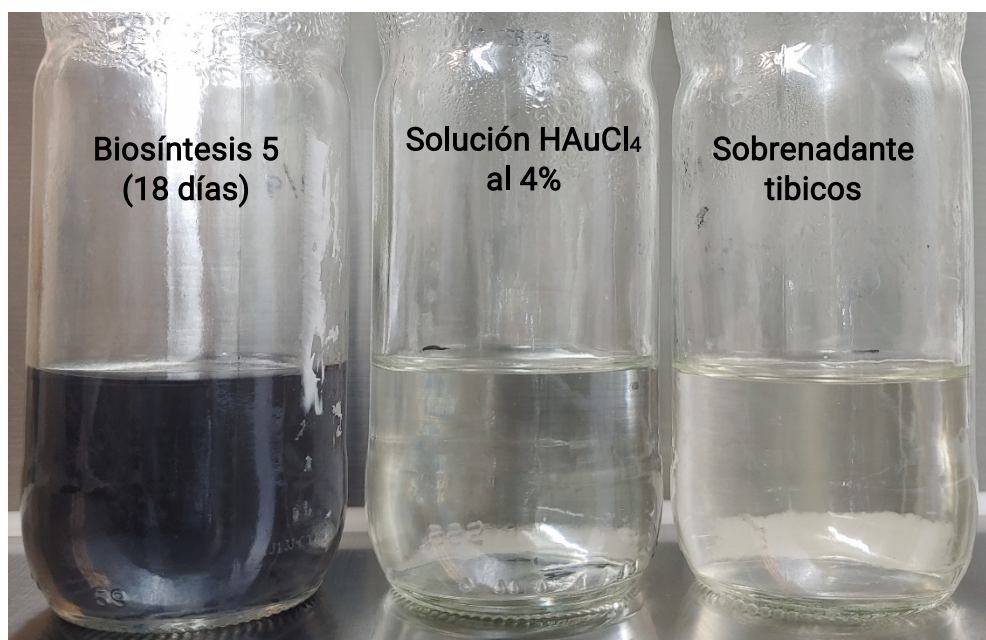


Figura 20. Quinta biosíntesis de nanopartículas de oro empleando sobrenadante de tibicos, después de un proceso de inanición de 18 días y los controles negativos utilizados.

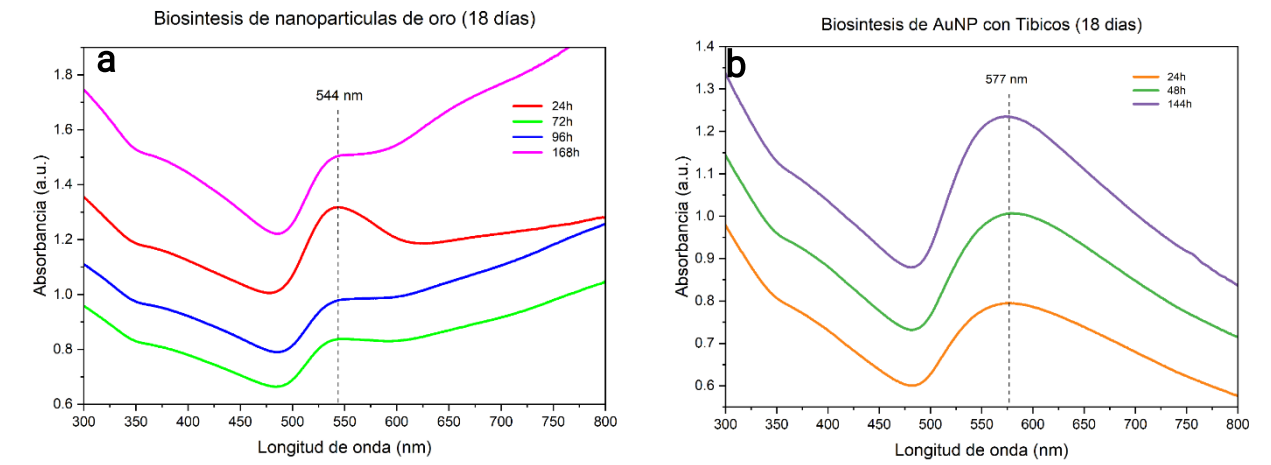


Figura 21. Espectros UV-Vis en función del tiempo, de la a) quinta y b) sexta síntesis de nanopartículas de oro empleando el sobrenadante de tibicos, después de procesos de inanición de 18 días. Sumado a estos se realizaron modificaciones con respecto a la primera síntesis.

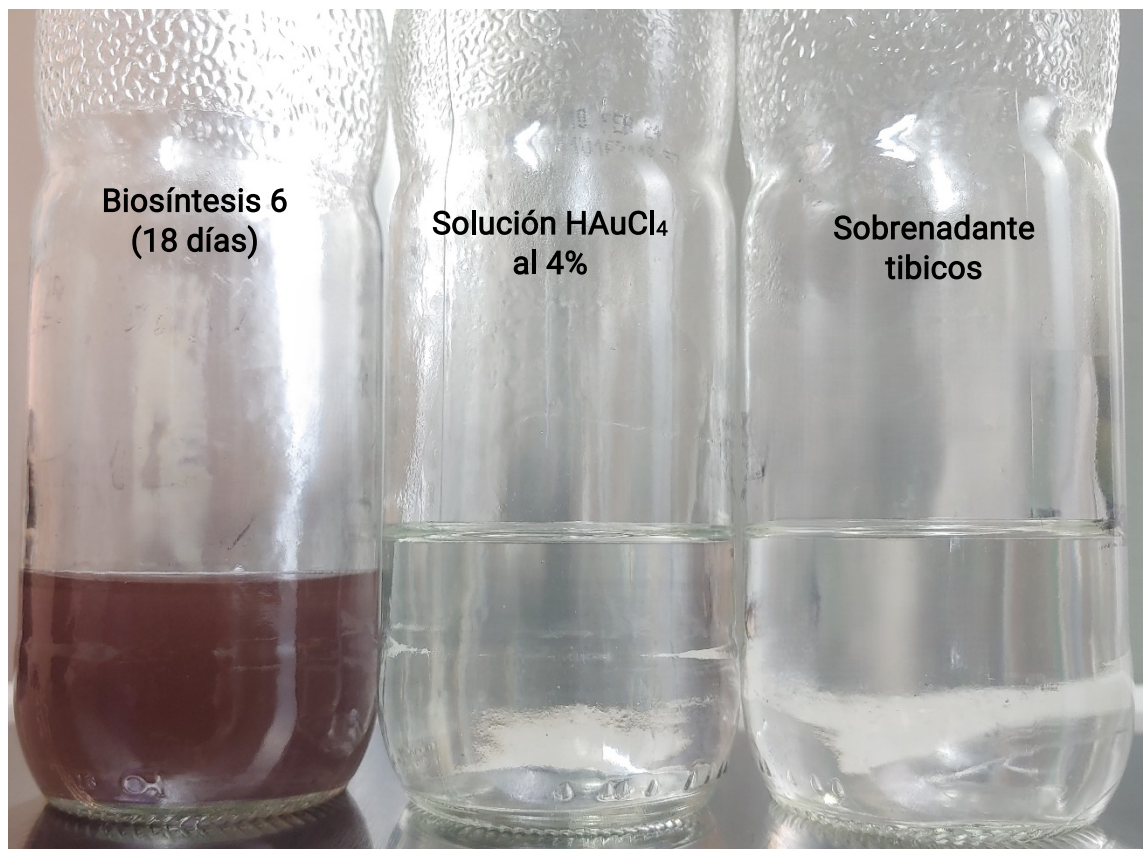


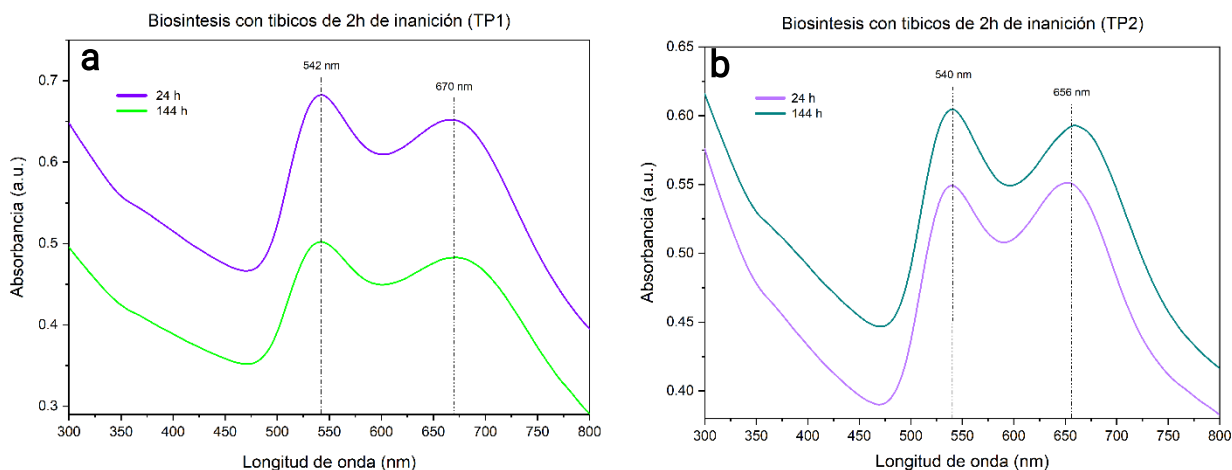
Figura 22. Sexta biosíntesis de nanopartículas de oro empleando sobrenadante de tibicos, después de un proceso de inanición de 18 días y los controles negativos utilizados.

7.2.1.6 Biosíntesis V-Cinética

Para analizar la reproducibilidad de la biosíntesis mediante tibicos con la solución de oro al 4%, se realizó una prueba con tres replicas y diferentes tiempos de inanición (2 horas, 1, 7, 14 y 21 días), con los dos lotes distintos de tibicos que se tenían G (TG) y dos replicas para FT (TP1 Y TP2) bajo las mismas condiciones y observando los valores de absorbancia con mediciones en dos periodos con tiempos de reacción de 24 y 144 horas.

Como se muestra en la figura 20, durante la síntesis 1 (2 horas de inanición) se observa una banda de absorción alrededor de 540 nm para las dos replicas con TP y de 535 nm para TG y una segunda banda ancha de absorción en 660-670 nm posiblemente debido a la presencia de formas diferentes a las esféricas. De acuerdo con Woźniak y colaboradores en 2017; durante el análisis de la espectroscopia UV-Vis de una síntesis de nanopartículas de oro con un control de forma reportaron que el número de bandas de absorción, así como la amplitud de estas varía dependiendo de la forma de las nanopartículas sintetizadas, es decir, las nanopartículas con formas esféricas mostraron una sola banda de absorción, mientras que los nanorods o nanobastones y las nanopartículas con morfología tipo flores mostraron dos bandas de absorción, como las observadas en nuestra síntesis.

Comparando esta síntesis con las posteriormente realizadas, podemos observar que solo en esta se presentan más de una banda de absorción en el espectro UV-Vis, lo que nos podría sugerir una gran variación en la composición de nuestro sobrenadante (hasta este momento desconocida) respecto al tiempo de inanición, presentándose una menor concentración de nuestros agentes estabilizantes lo que lleva a una mayor aglomeración o bien presentándose una variación en la conformación de estos llevando a la síntesis de morfologías distintas a las esféricas para esta síntesis.



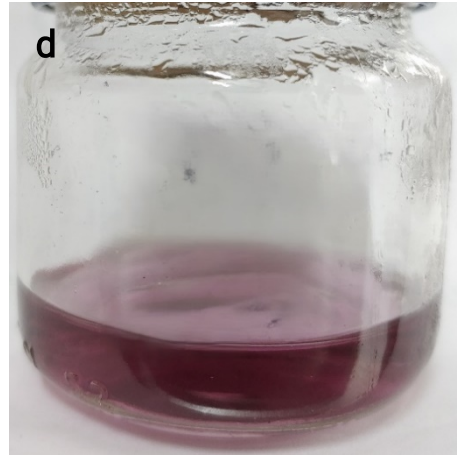
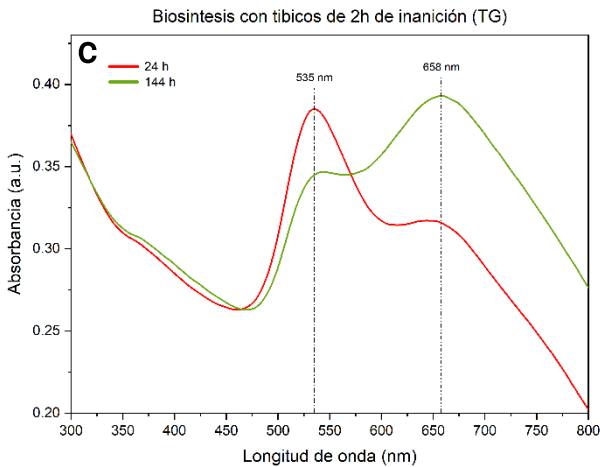


Figura 23. Espectros UV-Vis de la primera síntesis con 2h de inactivación, utilizando los lotes a) TP1, b) TP2 y c) TG, de táticos para realizar la síntesis de nanopartículas de oro, d) nanopartículas sintetizadas.

Por otro lado, para el caso de la síntesis 3 (7 días de inactivación), el espectro UV-Vis muestra una sola banda de absorción alrededor de 536 nm, en cada una de las mediciones realizadas a los 3 lotes utilizados (TP1, TP2 y TG). De acuerdo con Santos y colaboradores (2021), cuando los espectros presentan una sola banda de absorción se deduce que las nanopartículas de oro sintetizadas presentan formas esféricas.

Como se observa en la figura 21, para el caso de la síntesis con el lote TP1, la intensidad de las bandas de absorción disminuye a medida que aumenta la aglomeración de las nanopartículas metálicas (Zook *et al.*, 2011), caso contrario al de los lotes TP2 y TG, en los cuales se observa el aumento en la intensidad de las bandas conforme transcurre el tiempo de reacción. Estas bandas se pueden observar mucho más definidas que las anteriores, en especial las obtenidas de las síntesis con TP2, esto posiblemente debido a una mayor monodispersidad, lo que genera bandas más definidas (Oliveira *et al.*, 2017) como las obtenidas en la síntesis después de 7 días de inactivación.

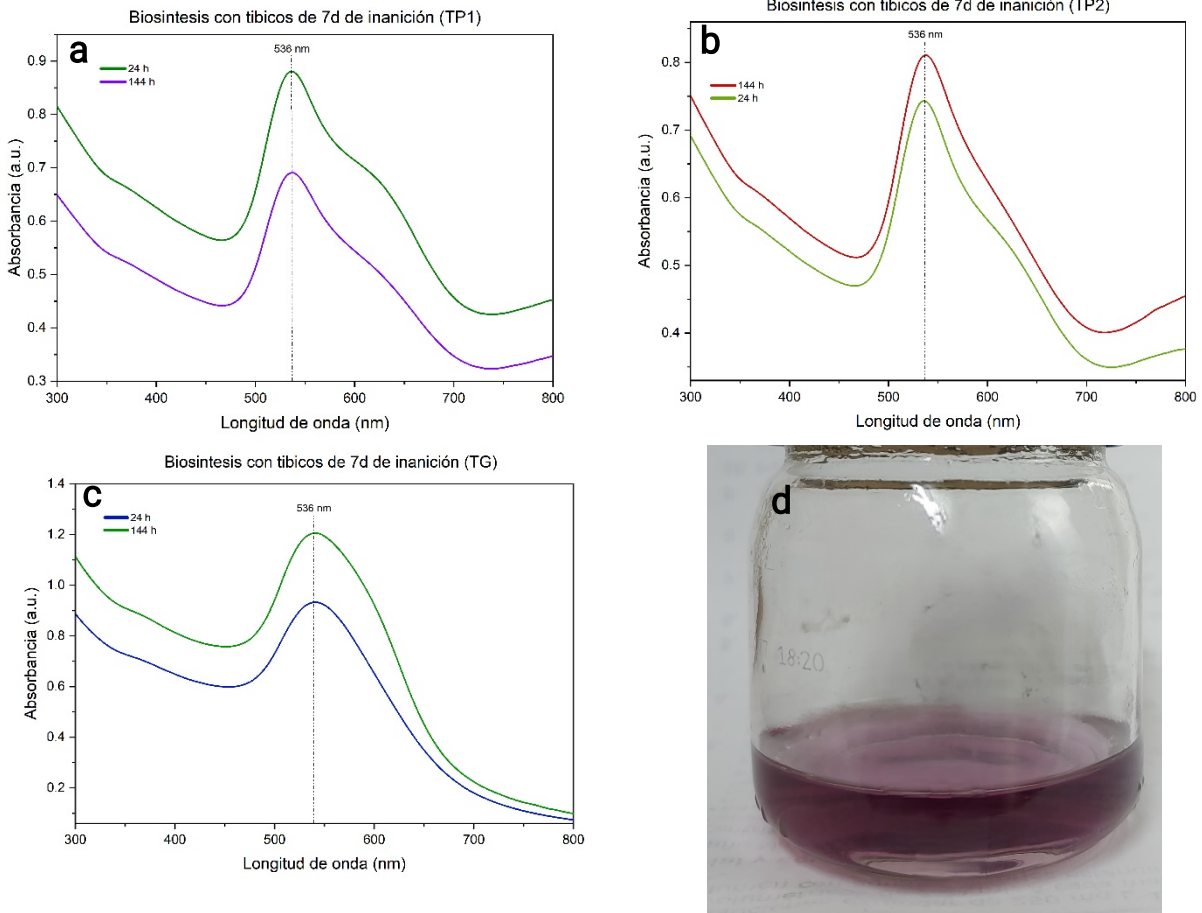


Figura 24. Espectros UV-Vis de la primera síntesis con 7 días de inanición, utilizando los lotes a) TP1, b) TP2 y c) TG, de tibicos para realizar la síntesis de nanopartículas de oro, d) nanopartículas sintetizadas.

Durante la reacción 4 con sobrenadante de 14 días de inanición el espectro UV-Vis (figura 22a) muestra bandas de absorción con mayor intensidad alrededor de 536 nm en el caso de las síntesis realizadas por los lotes TP2 y TG, mientras que para el lote TP1 se observan bandas de absorción con una forma más ancha y de menor intensidad en aproximadamente 558 nm durante las primeras 24 horas de iniciada la reacción. Para la segunda medición (144h) la intensidad de la banda de absorción aumenta al igual que se vuelve más definida debido a una mayor concentración de las nanopartículas metálicas (Philip, 2010).

Por otra parte, el espectro de absorción para la biosíntesis 5 empleando sobrenadante con 21 días de inanición (figura 22b) muestra bandas de absorción alrededor de 534 nm. Si embargo, en esta síntesis se presentan bandas menos definidas siendo esto un indicador de una mayor polidispersividad en la solución (Oliveira *et al.*, 2017). Con estos resultados podemos observar que el rango de óptimo de inanición es dentro del periodo de 7 a 14 días, en donde se obtuvieron

mejores resultados de polidispersividad mediante el análisis de espectroscopia UV-Vis, por esto es por lo que se tomó la decisión de trabajar con muestras de TP2 y TG de la síntesis 6 que mostraron una curva más definida en comparación con las otras síntesis, al igual se utilizó una muestra de la síntesis 3 como muestra para comparar los resultados.

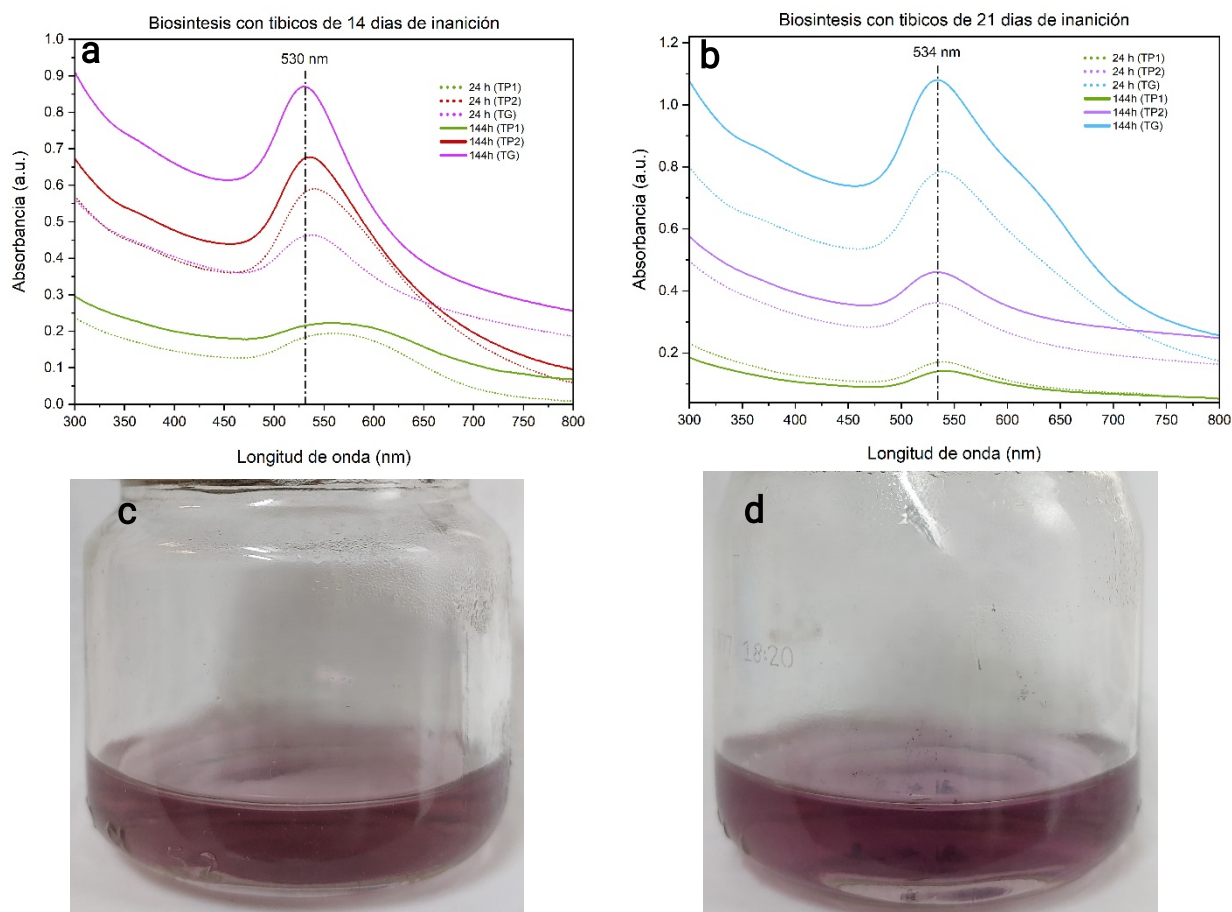


Figura 25. Espectros UV-Vis de la a) tercera y b) cuarta síntesis de nanopartículas de oro empleando el sobrenadante de tibicos con 14 y 21 días de inanición respectivamente, c) y d) nanopartículas sintetizadas.

7.2.1.7 Biosíntesis con aislados del sobrenadante de tibicos

Con la finalidad de establecer un punto de comparación y comprender mejor el proceso de biosíntesis de nanopartículas de oro utilizando tibicos, se utilizó una mezcla de los microorganismos aislados del sobrenadante de tibicos después de 5 días de inanición, para esto se preparó una muestra, añadiendo 250 μL de la solución de HAuCl_4 al 4%, por cada 100 mL de volumen del sobrenadante de tibicos compuesto por las 18 cepas aisladas de los tibicos (tabla 11). El proceso de reducción de las nanopartículas de Au^{3+} a Au^0 fue seguido a través de

espectroscopia UV-Vis por hasta 144 horas.

En la figura 23 se muestra el espectro de UV-Vis, alrededor de la región de ~550 nm se aprecia una banda de absorción poco definida a las 24 h de biosíntesis, mientras que a las 144 h se presenta una banda más definida lo que indica que las cepas utilizadas tienen la capacidad de producir los metabolitos encargados de la biosíntesis, sin embargo al comparar las curvas obtenidas mediante cepas y mediante el consorcio completo (figura 24), se observa como la curva obtenida con el consorcio esta más definida posiblemente debido a la mayor homogeneidad de formas y tamaños de las nanopartículas biosintetizadas a diferencia de las obtenidas con las cepas que es una curva más ancha

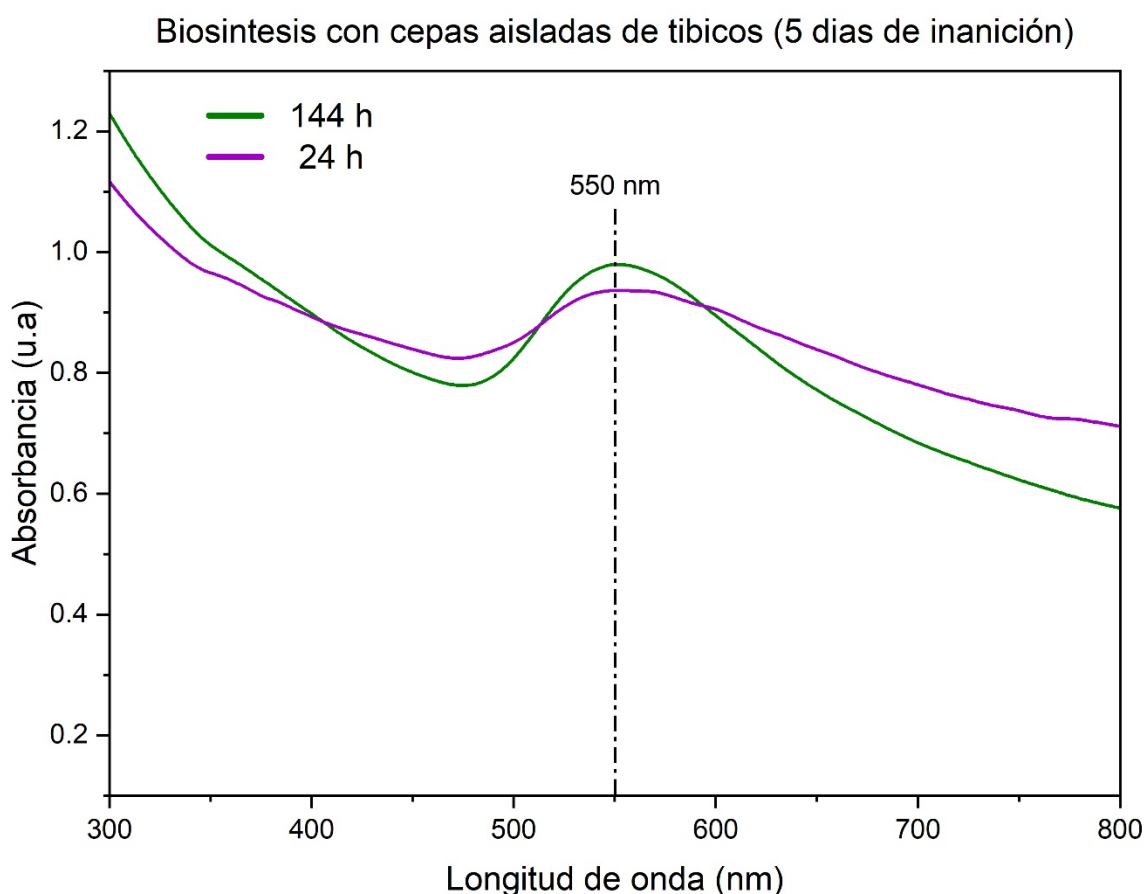


Figura 26. Espectros UV-Vis en función del tiempo, de la síntesis de nanopartículas de oro empleando microorganismos aislados del sobrenadante de tibicos, después de un proceso de inanición de 5 días.

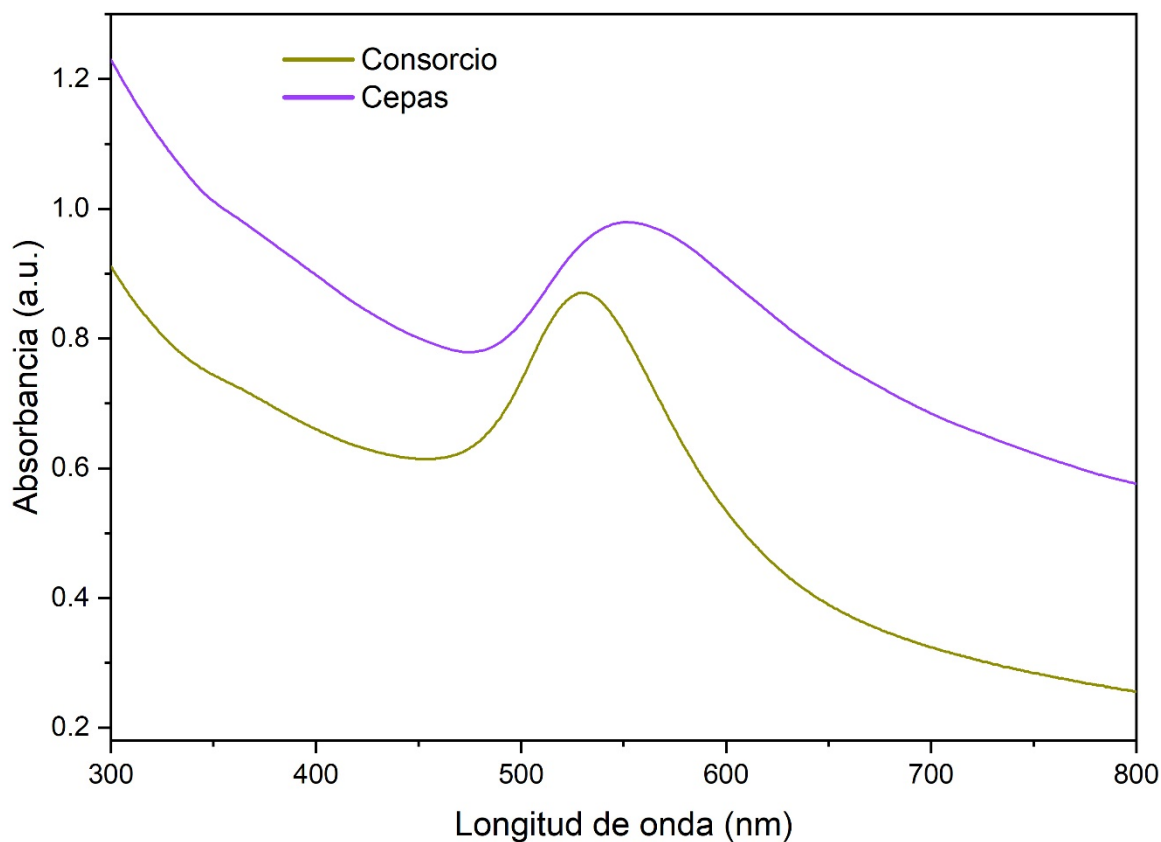


Figura 27. Espectros UV-Vis en función del tiempo, de la síntesis de nanopartículas de oro empleando microorganismos aislados del sobrenadante de tibicos, después de un proceso de inanición de 5 días en comparación con la síntesis con el consorcio completo.

7.3 Análisis espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Para la caracterización estructural y morfológica, se seleccionaron las nanopartículas obtenidas de las reacciones de biosíntesis 3 (CC) y de la cinética a los 14 días para los lotes TP2 y TG. Esta elección se basó en la observación de una coloración roja intensa en las suspensiones, característica de nanopartículas de oro esféricas (Murphy *et al.*, 2007), y en los perfiles de absorción obtenidos por UV-Vis, que mostraron una banda plasmónica única y bien definida. Estas muestras fueron sometidas a análisis FT-IR y TEM para determinar su composición, morfología y tamaño.

Se utilizó FTIR para determinar los grupos funcionales que intervienen en la estabilización de las AuNPs. Los espectros producidos por una reducción del precursor HAuCl_4 utilizando sobrenadantes de tibicos con diferentes tiempos de

inanición, mostraron claramente un gran número de bandas en la región del infrarrojo mediano que va de 4000 a 400 cm^{-1} . En las tres muestras analizadas se obtuvieron como resultado bandas similares, mostrando la predominancia de las moléculas encargadas de estabilizar el sistema de nanopartículas de oro, además de la homogeneidad y reproducibilidad en los resultados de las biosíntesis realizadas.

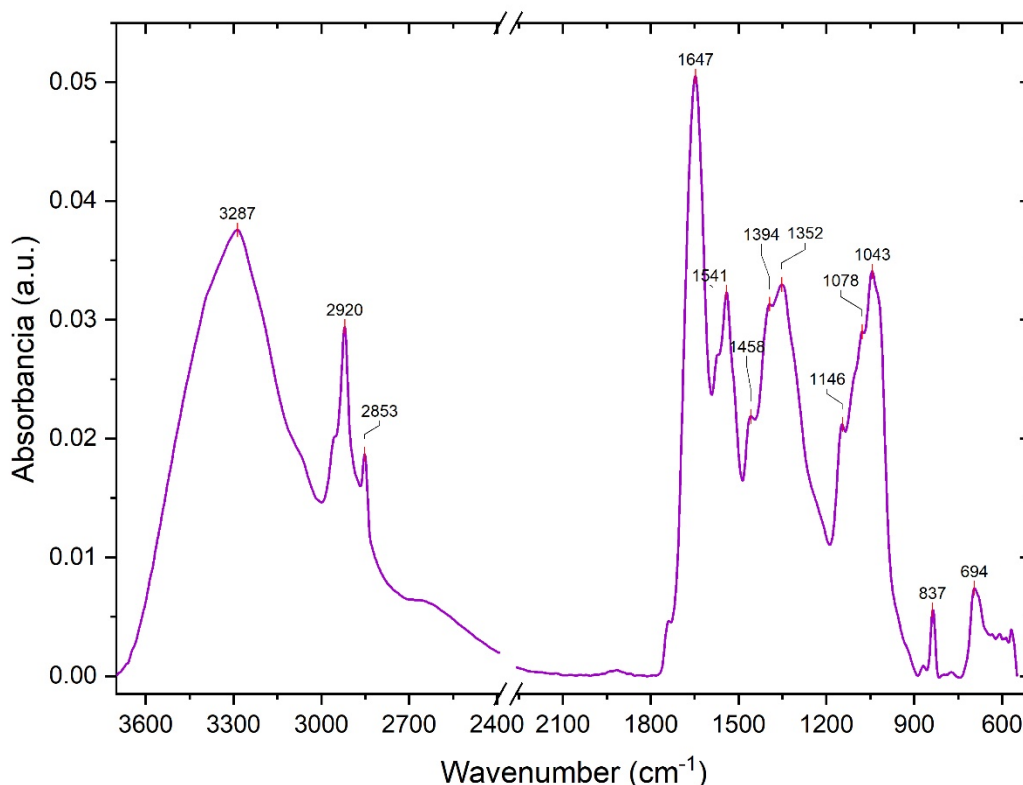


Figura 28. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de nanopartículas de oro biosintetizadas con tibicos de 18 días de inanición y la versión 3 de la biosíntesis (CC).

El análisis del espectro infrarrojo de las nanopartículas de oro obtenidas con la versión 3 de biosíntesis (figura 25) muestra bandas alrededor de 3287 cm^{-1} debido a estiramientos de enlace de los grupos hidroxilo O-H provenientes de ácidos carboxílicos, las bandas en 2920 cm^{-1} y 2853 cm^{-1} se deben al estiramiento de los enlaces C-H de los grupos metileno, mientras la banda intensa a 1647 cm^{-1} pertenecen al estiramiento del enlace C=C en los grupos alquilo, la banda alrededor de 1390 cm^{-1} se debe a estiramientos de enlaces COO, las bandas en 1458 cm^{-1} y 1352 cm^{-1} se deben a estiramientos de enlaces CH, la banda en 1043 cm^{-1} se podría atribuir a enlaces CO, las bandas en 837 cm^{-1} y 694 cm^{-1} se deben al estiramiento de enlaces C-H.

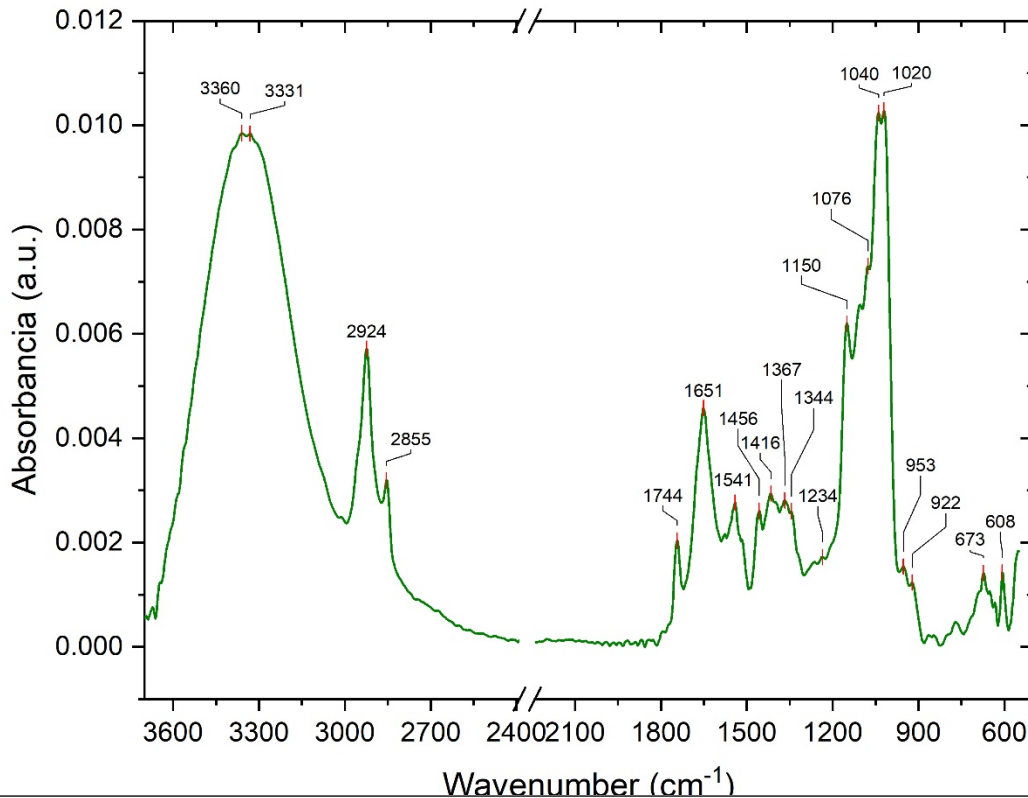


Figura 29. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de nanopartículas de oro biosintetizadas con tibicos del lote TP2 con 14 días de inanicón

El análisis del espectro infrarrojo de las nanopartículas de oro sintetizadas con el lote TP2 de tibicos (figura 26) muestra bandas alrededor de 3360 cm^{-1} y 3330 cm^{-1} debido a estiramientos de enlace de los grupos hidroxilo O-H aportados por ácidos carboxílicos, las bandas en 2924 cm^{-1} y 2855 cm^{-1} se deben al estiramiento de enlace C-H de los grupos metileno, mientras la banda de 1744 cm^{-1} pertenecen al estiramiento del enlace C=O en los grupos carbonilo, la banda intensa en 1651 cm^{-1} se deben a estiramientos de enlaces COC, las bandas en 1456 cm^{-1} y 1416 cm^{-1} se deben a estiramientos de enlaces OH presentes en ácidos carboxílicos, las bandas en 1367 cm^{-1} y 1344 cm^{-1} se deben a estiramientos de enlaces OH, la banda alrededor de 1040 cm^{-1} se podría atribuir a enlaces C-O, las bandas alrededor de 670 cm^{-1} y 610 cm^{-1} se deben a la flexión del enlace C-H, de grupos alquilo.

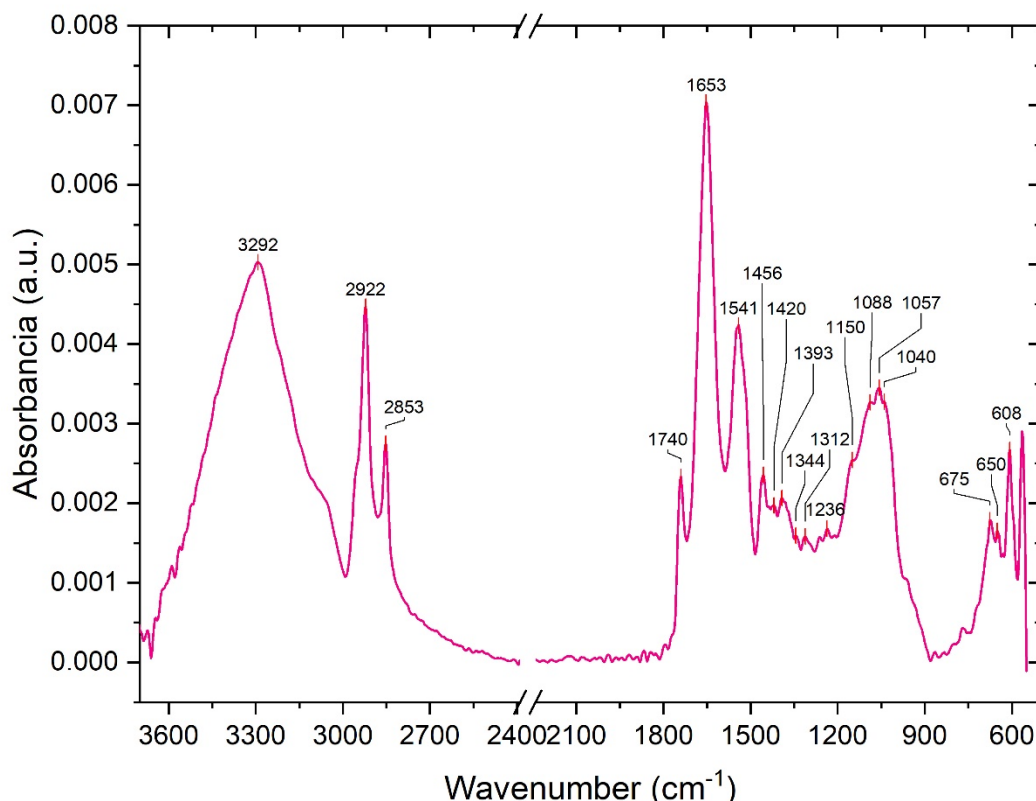


Figura 30. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de nanopartículas de oro biosintetizadas con tibicos del lote TG con 14 días de inanición

Por último, el análisis del espectro infrarrojo de las nanopartículas de oro sintetizadas con el lote de tibicos TG (figura 27) muestra bandas alrededor de 3290 cm^{-1} debido a estiramientos de enlace de los grupos hidroxilo O-H, las bandas en 2922 cm^{-1} y 2853 cm^{-1} se deben al estiramiento de enlace de los grupos metileno, mientras las bandas de 1740 cm^{-1} y 1653 cm^{-1} pertenecen a la tensión del enlace C=O en los grupos carbonilo, las banda en 1540 cm^{-1} se debe a estiramientos de enlaces C=C, las bandas en 1456 cm^{-1} y 1393 cm^{-1} se deben a estiramientos de enlaces OH, las bandas alrededor de 1060 cm^{-1} se podrían atribuir a enlaces C-O, mientras que las bandas alrededor de 650 cm^{-1} se deben a la torsión del enlace C-H.

Para analizar de una mejor manera la consistencia de resultados en las nanopartículas analizadas se superpusieron los espectros FTIR, en los tres análisis realizados se presentan bandas compartidas por los 3 espectros, como se observa en la figura 28. Existen picos típicos para grupos funcionales comunes como el O-H, C=O y C-O, con bandas en $3400\text{-}2400$, $1780\text{-}1700$ y $1320\text{-}1210\text{ cm}^{-1}$, respectivamente (Singh y Srivastava 2015), que permiten reconocer y discernir entre las moléculas presentes en la superficie de las nanopartículas. Estos picos característicos pueden encontrarse en ácidos orgánicos, como el ácido ascórbico,

el ácido salicílico, el ácido cafeico, el ácido tánico, etc. (Waclawek *et al.*, 2018). Por lo tanto, con estos espectros se puede deducir que son ácidos orgánicos (Sujitha & Kannan, 2012; Yang *et al.*, 2014; Bharadwaj *et al.*, 2021; Nadaf *et al.*, 2022) las sustancias químicas que participan como agentes estabilizadores y posiblemente reductores en estas síntesis.

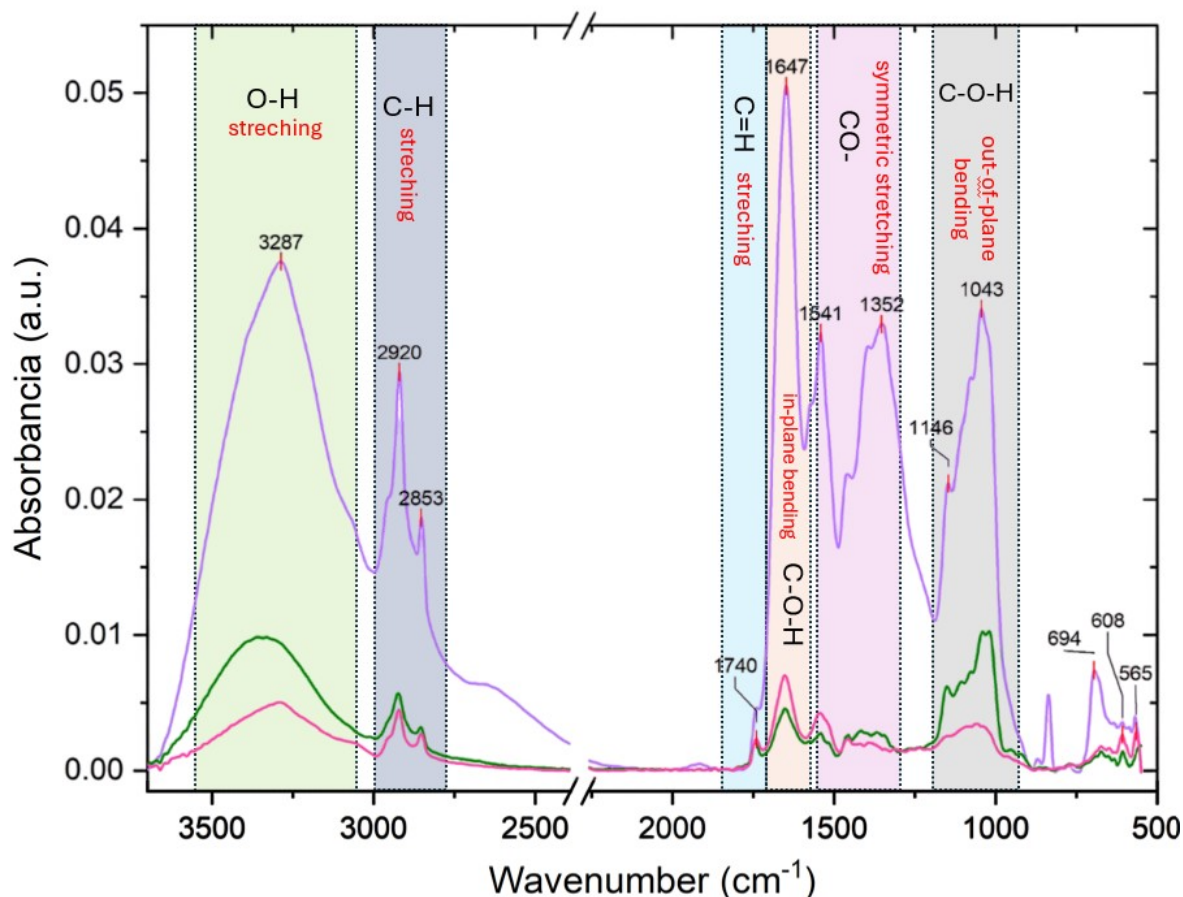


Figura 31. Análisis de los espectros infrarrojos obtenidos de nanopartículas de oro biosintetizadas con diferentes lotes después de un proceso de inanición.

7.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La morfología y distribución del tamaño de las nanopartículas de oro se analizaron usando microscopía electrónica de transmisión (TEM), con el equipo JEOL ARM-200F.

Las micrografías TEM de las nanopartículas de oro obtenidas mediante los lotes CC, TP2 y TG se muestran en la Figura 29 (a-c); respectivamente. El análisis TEM confirmó la biosíntesis de nanopartículas de oro y mostró una morfología clara de las AuNPs. A su vez se observa que las AuNPs formadas presentan una forma casi esférica, siendo en gran parte esféricas. Sin embargo, también se formaron nanopartículas triangulares, cúbicas y amorfas, las cuales se encuentran resaltadas en la figura 29. La formación de nanotriángulos se puede atribuir a la

rápida reducción, ensamblaje y síntesis de nanopartículas esféricas a temperatura ambiente, así como al reordenamiento y agregación de AuNPs de menor tamaño (Osonga *et al.*, 2016).

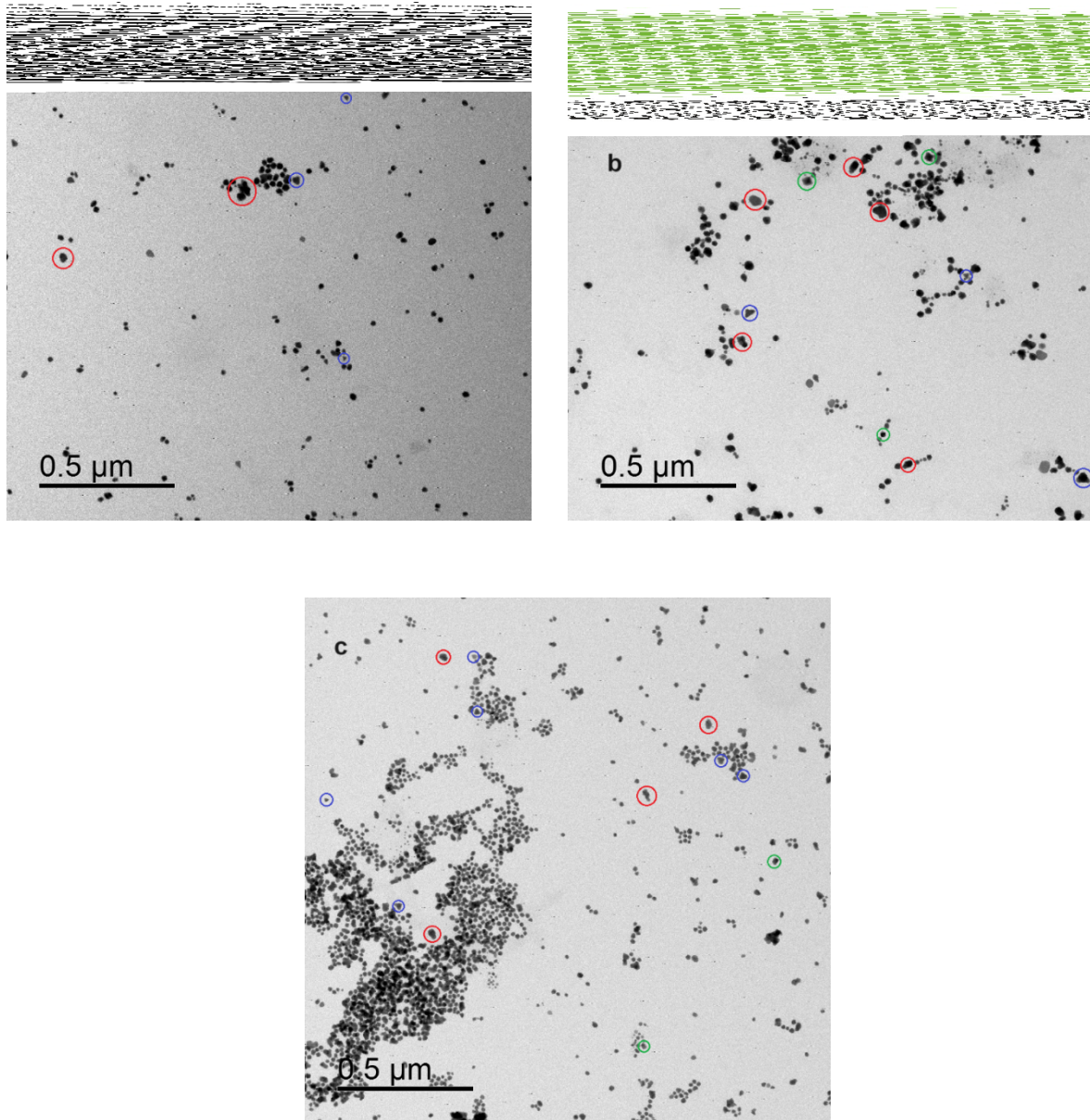


Figura 32. Micrografías TEM a 500 nm de la formación de AuNPs empleando diversos lotes de tibicos. Se resaltan algunas de las distintas morfologías obtenidas, en rojo AuNPs amorfas, en azul nanotriángulos y en verde nanocubos, a) nanopartículas sintetizadas mediante la versión 3 (CC), b) nanopartículas sintetizadas con el lote TP2 de tibicos, c) nanopartículas sintetizadas por el lote TG de tibicos.

Las nanopartículas son del orden de 2-37 nm, 2-42 nm y 2-47 nm para CC, TP2 y TG respectivamente. Se puede observar claramente que se obtuvo una mezcla de nanoprismas; estructuras esféricas, triangulares y amorfas (figura 29). Se determinó que el tamaño medio de las AuNPs obtenidas por CC (figura. 30a) era de 17.7 ± 4.9 nm con una polidispersidad de 28%. Las AuNPs derivadas de TP2 (figura 30b) tenían un tamaño medio de 22.7 ± 6 nm y polidispersidad de 26%. Como se muestra en la figura 30c, el tamaño medio de las AuNPs obtenidas mediante TG fue de 14.2 ± 2.5 nm, con una polidispersidad de 18%.

Como se observa en los espectros obtenidos mediante espectroscopia UV-Vis, de las NPs sintetizadas, la presencia de una sola banda de absorción entre 500 y 600 nm indica la formación de nanopartículas esféricas, sin embargo, las bandas no se encuentran definidas, mostrándose inclusive anchas debido a la presencia de diversas formas y tamaños en la misma muestra.

Esto concuerda con las imágenes TEM (Fig. 29(a-c)), que mostraban las formas de las AuNPs en cada proceso de biosíntesis. Estas dos técnicas de microscopia permiten confirmar las suposiciones echas sobre la presencia de distintas formas y tamaños de nanopartículas presentes en la solución. Además, se confirma que el sobrenadante de tibicos tiene una excelente capacidad para reducir y estabilizar los iones de oro para formar AuNPs, así como para prevenir su agregación.

También puede observarse que la polidispersidad es menor para las AuNPs sintetizadas con el lote TG, siendo del 18%, el resultado parece indicar que las AuNPs son más estables al obtenerse de este tipo de tibicos más activos como lo son los del lote TG, morfológicamente estos tibicos presentan gránulos pequeños.

Se igual manera de forma preliminar se realizaron análisis de la composición química superficial de las AuNPs obtenidas por los tres lotes, mediante análisis de espectroscopio de rayos X de energía dispersiva (EDS), los cuales muestran la presencia de oro confirmando la formación de nanopartículas de oro, pero además de confirma lo obtenido mediante FTIR que es la presencia de carbono y oxígeno, posiblemente proveniente de los ácidos orgánicos que estabilizan las nanopartículas.

Las nanopartículas de oro, en sus diversas formas, han demostrado un gran potencial en múltiples aplicaciones biomédicas. Los nanocubos, por ejemplo, se destacan como agentes de contraste para la detección óptica in vivo de tumores y como potentes agentes fototérmicos gracias a su elevada conversión fototérmica (Chen et al., 2005). Por otro lado, los nanotriángulos ofrecen una plataforma versátil para la liberación controlada de fármacos y el desarrollo de biosensores (Yu et al., 2022). Las nanoesferas, debido a su alta biocompatibilidad y capacidad de funcionalización, se utilizan ampliamente como vehículos de liberación de fármacos, agentes de diagnóstico y plataformas para la ingeniería de tejidos (Hu et al., 2020).

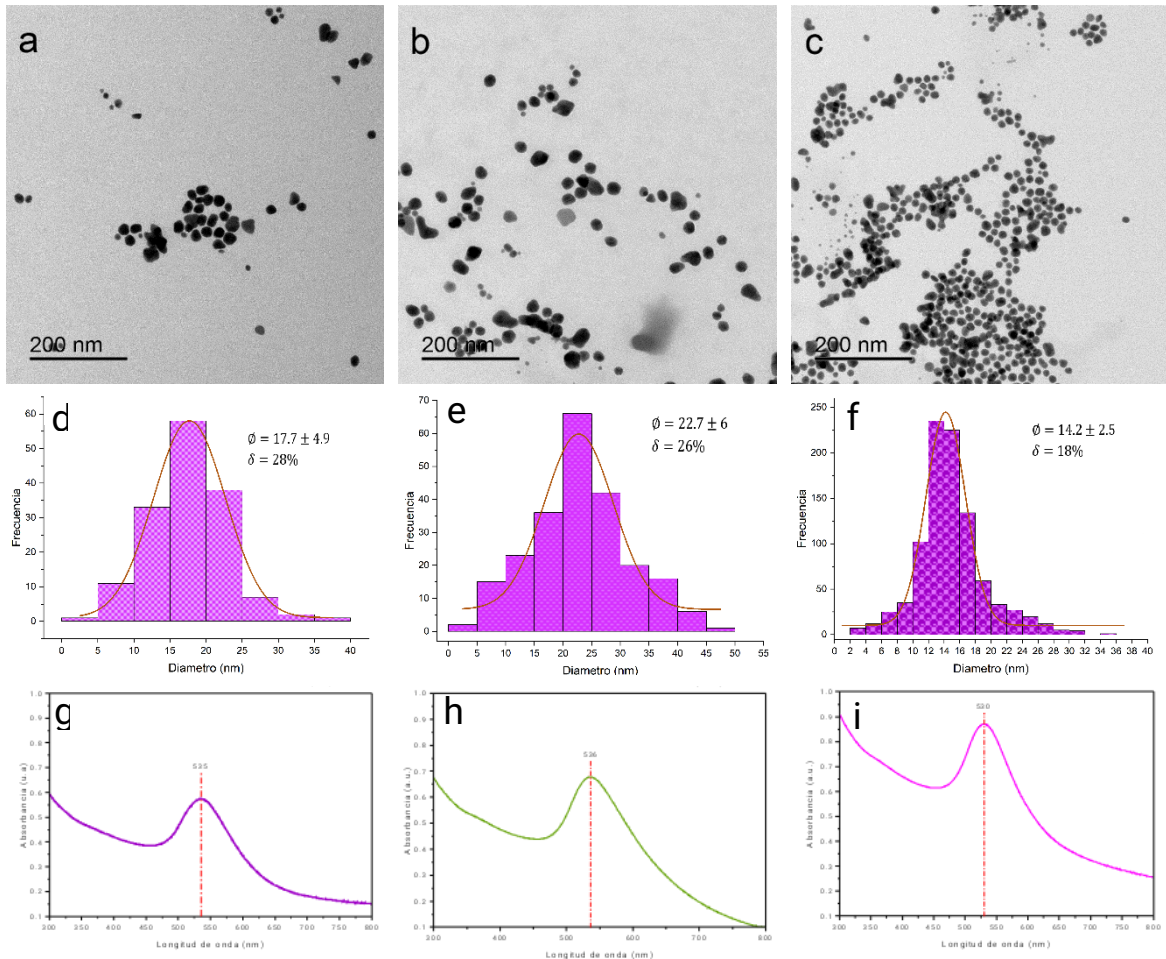


Figura 33. (a-c) Micrografías TEM de NP's de oro biosintetizadas con diferentes lotes de tibicos, el método de síntesis 3, TP2 y TG, respectivamente. (d-f) Histogramas de los tamaños de las nanopartículas de oro sintetizadas. (g-i) Espectros UV-Vis del método 3 y los lotes TP2 y TG, respectivamente.

7.4 Análisis EDS

Mediante espectroscopía de rayos X dispersiva de energía (EDS), se llevó a cabo un análisis elemental de las nanopartículas, revelando una alta abundancia de carbono y oxígeno en su superficie, como se observa en la figura 31. Estos resultados, corroborados por espectroscopía FT-IR, sugieren la presencia de biomoléculas, principalmente grupos carboxílicos, que actuarían como agentes reductores y/o estabilizantes de las nanopartículas de oro (Nurakhmetova *et al.*, 2020). La detección de oro mediante EDS confirma exitosamente la biosíntesis de las nanopartículas de oro.

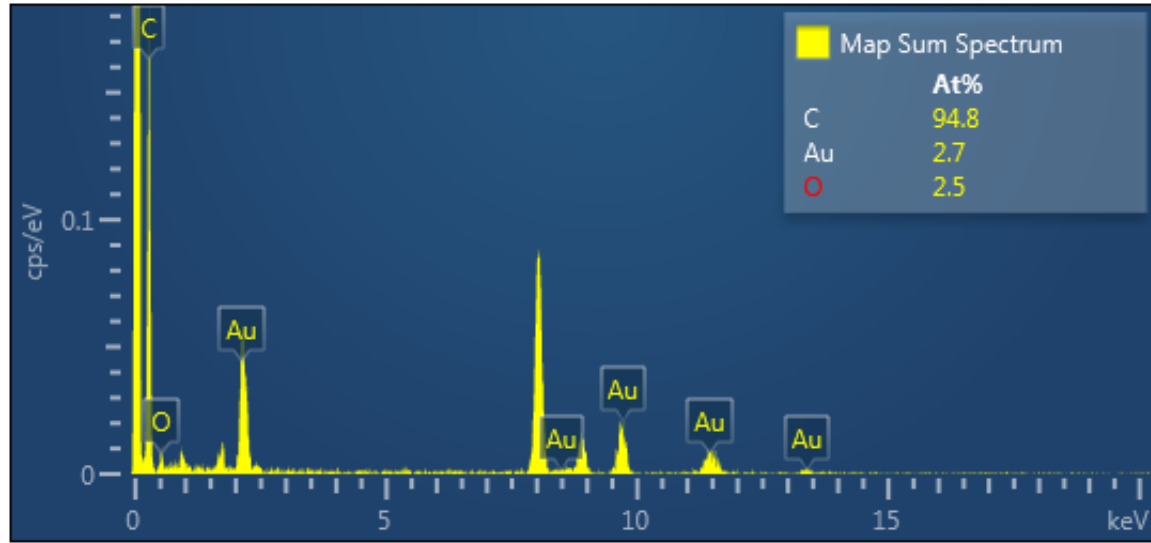


Figura 34. Espectroscopía de rayos X dispersiva de energía (EDS) de las nanopartículas biosintetizadas con tibicos.

Los hallazgos de esta investigación demuestran el potencial de los consorcios microbianos de tibicos como sistemas biológicos versátiles para la síntesis sostenible de nanopartículas metálicas. La capacidad, tanto de los consorcios naturales como los artificiales, para biosintetizar AuNPs sugiere que los mecanismos de biosíntesis involucrados son robustos y pueden ser adaptados a diferentes condiciones de cultivo.

Futuras investigaciones podrían centrarse en: (1) optimizar las condiciones de biosíntesis para aumentar la producción y controlar el tamaño y la forma de las nanopartículas; (2) evaluar y comparar la capacidad de los microorganismos aislados en la biosíntesis de nanopartículas frente al consorcio; (3) identificar los genes y enzimas clave involucrados en los mecanismos de biosíntesis; (4) explorar la aplicación de estos consorcios en la síntesis de otras nanopartículas metálicas y bimetalicas; y (5) evaluar las propiedades catalíticas, ópticas y biomédicas de las nanopartículas biosintetizadas.

8. Conclusiones

Estos resultados indican que los consorcios microbianos de túbicos son capaces de sintetizar nanopartículas de oro con propiedades controladas y reproducibles.

En este estudio, se realizó el aislamiento y selección de microorganismos a partir de consorcios microbianos de túbicos, revelando una notable diversidad microbiana.

Se ensambló un consorcio microbiano artificial para la biosíntesis de nanopartículas de oro (AuNPs). Este consorcio sintético permitió la biosíntesis de nanopartículas de oro.

Se caracterizaron las AuNPs biosintetizadas mediante las técnicas espectroscópicas y microscópicas de UV-Vis, FT-IR y TEM.

Los espectros de UV-Vis mostraron una banda de absorción característica en la región del visible, indicando la formación de nanopartículas metálicas de tamaño nanométrico.

Los análisis de FTIR revelaron la presencia de grupos funcionales característicos de biomoléculas, como carboxilos, sugiriendo una interacción entre las nanopartículas y las biomoléculas secretadas por los microorganismos.

Las micrografías TEM confirmaron la morfología predominantemente esférica de las AuNPs, con un tamaño promedio de 14-23 nm y una distribución de tamaño relativamente estrecha.

9. Referencias

1. Abalaka, M. E., Daniyan, S. Y., Adeyemo, S. O., & Damisa, D. (2014). The Antibacterial Efficacy of Gold Nanoparticles Derived from *Gomphrena celosioides* and *Prunus amygdalus* (Almond) Leaves on Selected Bacterial Pathogens. *Zenodo (CERN European Organization For Nuclear Research)*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1091954>
2. Abdalhamed, A. M., Ghazy, A. A., Ibrahim, E. S., Arafa, A. A., & Zeedan, G. S. G. (2021). Therapeutic effect of biosynthetic gold nanoparticles on multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* species isolated from ruminants. *Veterinary World*, 3200-3210. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.3200-3210>
3. Abid, N., Khan, A. M., Shujait, S., Chaudhary, K., Ikram, M., Imran, M., Haider, J., Khan, M., Khan, Q., & Maqbool, M. (2022). Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Advances In Colloid And Interface Science*, 300, 102597. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102597>
4. Abu-Tahon, M. A., Ghareib, M., & Abdallah, W. E. (2020). Environmentally benign rapid biosynthesis of extracellular gold nanoparticles using *Aspergillus flavus* and their cytotoxic and catalytic activities. *Process Biochemistry*, 95, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.015>
5. Adebayo, E. A., Oladipo, I. C., Badmus, J. A., & Lateef, A. (2021). Beneficial Microbes as Novel Microbial Cell Factories in Nanobiotechnology: Potentials in Nanomedicine. En *Materials horizons* (pp. 315-342). https://doi.org/10.1007/978-981-33-4777-9_11
6. Agnihotri, M., Joshi, S. G., Kumar, A., Zinjarde, S., & Kulkarni, S. K. (2009). Biosynthesis of gold nanoparticles by the tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Materials Letters*, 63(15), 1231-1234. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2009.02.042>
7. Ahmed, S., Annu, A., Ikram, S., & S, S. Y. (2016). Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. *Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology*, 161, 141-153. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.04.034>
8. Ahmed, A., Rauf, A., Hemeg, H. A., Qureshi, M. N., Sharma, R., Aljohani, A. S. M., Alhumaydhi, F. A., Khan, I., Alam, A., & Rahman, M. M. (2022). Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using *Opuntia dillenii* Aqueous Extracts: Characterization and Their Antimicrobial Assessment. *Journal Of Nanomaterials*, 2022, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2022/4804116>
9. Akhtar, N., & Pathak, K. (2017). Probiotics as a Tool to Biosynthesize Metallic Nanoparticles: Research Reports and Patents Survey. *Recent Patents On Drug Delivery & Formulation*, 11(1). <https://doi.org/10.2174/1872211311666170313124335>
10. Akintelu, S. A., Olugbeko, S. C., & Folorunso, A. S. (2020). A review on synthesis, optimization, characterization and antibacterial application of gold nanoparticles synthesized from plants. *International Nano Letters*, 10(4), 237-248. <https://doi.org/10.1007/s40089-020-00317-7>
11. Ali, S. A., Jalal, M., Ahmad, H., Umar, K., Ahmad, A., Alshammari, M. B., & Khan, H. M. (2022). Biosynthesis of Gold Nanoparticles and Its Effect against *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 27(24), 8685. <https://doi.org/10.3390/molecules27248685>
12. Almatroudi, A. (2020). Silver nanoparticles: synthesis, characterisation and biomedical applications. *Open Life Sciences*, 15(1), 819-839. <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0094>
13. Álvarez-Chimal, R., & Arenas-Alatorre, J. Á. (2023). Green Synthesis of Nanoparticles: A Biological Approach. En *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1002203>

14. Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2015). Fermented Foods: Composition and Health effects. En *Elsevier eBooks* (pp. 649-655). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00285-3>
15. Apud, G. R., Kristof, I., Ledesma, S. C., Stivala, M. G., & Fernandez, P. A. A. (2024). Health-promoting peptides in fermented beverages. *Revista Argentina de Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.02.003>
16. Ariski, R. T., Lee, K. K., Kim, Y., & Lee, C. (2023). The Impact of pH and Temperature on the Green Gold Nanoparticles Preparation Using Jeju Hallabong Peel Extract for Biomedical Applications. *Preprint*. <https://doi.org/10.20944/preprints202309.1459.v1>
17. Ayyoub, S., Al-Trad, B., Aljabali, A. A., Alshaer, W., Zoubi, M. S. A., Omari, S., Fayyad, D., & Tambuwala, M. M. (2022). Biosynthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Dittrichia viscosa* and in vivo assessment of its anti-diabetic efficacy. *Drug Delivery And Translational Research*, 12(12), 2993-2999. <https://doi.org/10.1007/s13346-022-01163-0>
18. Azzazy, H. M., Mansour, M. M., Samir, T. M., & Franco, R. (2012). Gold nanoparticles in the clinical laboratory: principles of preparation and applications. *Clinical Chemistry And Laboratory Medicine*, 50(2). <https://doi.org/10.1515/cclm.2011.732>
19. Bansal, S., Kumar, V., Karimi, J., Singh, A. P., & Kumar, S. (2020). Role of gold nanoparticles in advanced biomedical applications. *Nanoscale Advances*, 2(9), 3764-3787. <https://doi.org/10.1039/d0na00472c>
20. Barabadi, H., Honary, S., Mohammadi, M. A., Ahmadpour, E., Rahimi, M. T., Alizadeh, A., Naghibi, F., & Saravanan, M. (2017). Green chemical synthesis of gold nanoparticles by using *Penicillium aculeatum* and their scolicidal activity against hydatid cyst protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Environmental Science And Pollution Research International*, 24(6), 5800-5810. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8291-8>
21. Barnawi, N., Allehyani, S., & Seoudi, R. (2022). Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles and its application in eliminating nickel from water. *Journal Of Materials Research And Technology*, 17, 537-545. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.12.013>
22. Bhambure, R., Bule, M. V., Shaligram, N. S., Kamat, M. Y., & Singhal, R. S. (2009). Extracellular Biosynthesis of Gold Nanoparticles using *Aspergillus niger* – its Characterization and Stability. *Chemical Engineering & Technology*, 32(7), 1036-1041. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800647>
23. Bhandari, Y., Varma, S., Sawant, A., Beemagani, S., Jaiswal, N., Chaudhari, B. P., & Vamkudoth, K. R. (2023). Biosynthesis of gold nanoparticles by *Penicillium rubens* and catalytic detoxification of ochratoxin A and organic dye pollutants. *International Microbiology*, 26(4), 765-780. <https://doi.org/10.1007/s10123-023-00341-5>
24. Bharadwaj, K. K., Rabha, B., Pati, S., Sarkar, T., Choudhury, B. K., Barman, A., Bhattacharjya, D., Srivastava, A., Baishya, D., Edinur, H. A., Kari, Z. A., & Noor, N. H. M. (2021). Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Plant Extracts as Beneficial Prospect for Cancer Theranostics. *Molecules*, 26(21), 6389. <https://doi.org/10.3390/molecules26216389>
25. Bharde, A., Kulkarni, A., Rao, M. N., Prabhune, A., & Sastry, M. (2007). Bacterial Enzyme Mediated Biosynthesis of Gold Nanoparticles. *Journal Of Nanoscience And Nanotechnology*, 7(12), 4369-4377. <https://doi.org/10.1166/jnn.2007.891>
26. Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 45(3), 198-207. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860>
27. Buzea, C., Pacheco, I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>
28. Cai, H., Wang, F., & Xue, S. (2023). Novel biosynthetic AuNPs as the efficient catalyst for organic

- contaminants degradation: one-step preparation, degradation kinetics and mechanism. *Research On Chemical Intermediates*, 49(7), 3045-3063. <https://doi.org/10.1007/s11164-023-05026-2>
29. Camas, M., Çelik, F., Camas, A. S., & Özalp, H. (2018). Biosynthesis of gold nanoparticles using marine bacteria and Box–Behnken design optimization. *Particulate Science And Technology*, 37(1), 31-38. <https://doi.org/10.1080/02726351.2017.1287794>
 30. Castro, L., Blázquez, M., González, F., Muñoz, J., & Ballester, A. (2010). Extracellular biosynthesis of gold nanoparticles using sugar beet pulp. *Chemical Engineering Journal*, 164(1), 92-97. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.08.034>
 31. Çevik, T., Aydoğdu, N. S., Özdemir, N., & Taş, T. (2019). The Effect of Different Sugars on Water Kefir Grains. *Turkish Journal Of Agriculture: Food Science And Technology*, 7, 40-45. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7isp1.40-45.2687>
 32. Chamkouri, N., Koolivand, Z., Niazvand, F., & Mojaddami, A. (2023). Phytochemical analysis, characterization, and biosynthesis of gold nanoparticles, zinc oxide nanoparticles, and gold-zinc oxide nanocomposites from phoenix dactylifera L. seeds: Biological evaluation. *Inorganic Chemistry Communications*, 156, 111146. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.111146>
 33. Chen, J., Wiley, B., Li, Z., Campbell, D., Saeki, F., Cang, H., Au, L., Lee, J., Li, X., & Xia, Y. (2005). Gold Nanocages: Engineering Their Structure for Biomedical Applications. *Advanced Materials*, 17(18), 2255-2261. <https://doi.org/10.1002/adma.200500833>
 34. Chen, F., Li, J., Sun, J., & Ji, Y. (2011). Biosynthesis of gold nanoparticles by biosorption using *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. *Chemical Engineering Journal*, 175, 70-75. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.041>
 35. Chen, J., Li, Y., Fang, G., Cao, Z., Shang, Y., Alfarraj, S., Alharbi, S. A., Li, J., Yang, S., & Duan, X. (2021). Green synthesis, characterization, cytotoxicity, antioxidant, and anti-human ovarian cancer activities of *Curcuma kwangsiensis* leaf aqueous extract green-synthesized gold nanoparticles. *Arabian Journal Of Chemistry*, 14(3), 103000. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103000>
 36. Chokriwal, A., Mohan, M., & Singh, A. (2014). Biological Synthesis of Nanoparticles Using Bacteria and Their Applications. *American Journal Of PharmTech Research*, 4(6), 38-61. https://www.researchgate.net/publication/299410541_Biological_Synthesis_of_Nanoparticles_Using_Bacteria_and_Their_Applications
 37. Coma, M. E., Peltzer, M. A., Delgado, J. F., & Salvay, A. G. (2019). Water kefir grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. *European Polymer Journal*, 120, 109234. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109234>
 38. Debnath, R., Purkayastha, D. D., Hazra, S., Ghosh, N. N., Bhattacharjee, C. R., & Rout, J. (2016). Biogenic synthesis of antioxidant, shape selective gold nanomaterials mediated by high altitude lichens. *Materials Letters*, 169, 58-61. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.01.072>
 39. Dehvari, K., Pazouki, M., & Hosseinnia, A. (2019). Stimuli-responsive Biosynthesis of Gold Nanoparticles: Optimization, Kinetics, and Thermodynamics of Biosorption. *International Journal Of Engineering. Transactions B: Applications*, 32(11). <https://doi.org/10.5829/ije.2019.32.11b.01>
 40. Deshpande, R., Basavaraja, S., Mahesh, B., Balaji, S., Manjunath, S. Y., & Venkataraman, A. (2009). Biosynthesis of Stable Polyshaped Gold Nanoparticles from Microwave-Exposed Aqueous Extracellular Anti-malignant Guava (*Psidium guajava*) Leaf Extract. *Nanobiotechnology*, 5(1-4), 34-41. <https://doi.org/10.1007/s12030-009-9030-8>
 41. Deshpande, R., Bedre, M. D., Basavaraja, S., Sawle, B. D., Manjunath, S. Y., & Venkataraman, A. (2010). Rapid biosynthesis of irregular shaped gold nanoparticles from macerated aqueous extracellular dried clove buds (*Syzygium aromaticum*) solution. *Colloids And Surfaces B:*

Biointerfaces, 79(1), 235-240. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.04.003>

42. Diegoli, S., Manciuola, A. L., Begum, S., Jones, I. P., Lead, J. R., & Preece, J. A. (2008). Interaction between manufactured gold nanoparticles and naturally occurring organic macromolecules. *The Science Of The Total Environment*, 402(1), 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.04.023>
43. Doan, V., Thieu, A. T., Nguyen, T., Nguyen, V., Cao, X., Nguyen, T. L., & Le, V. T. (2020). Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using Litsea cubeba Fruit Extract for Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol. *Journal Of Nanomaterials*, 2020, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2020/4548790>
44. Du, L., Jiang, H., Liu, X., & Wang, E. (2007). Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by Escherichia coli DH5 α and its application on direct electrochemistry of hemoglobin. *Electrochemistry Communications*, 9(5), 1165-1170. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2007.01.007>
45. Du, L., Liu, X., & Feng, J. (2010). Rapid extra-/intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by the fungus Penicillium sp. *Journal Of Nanoparticle Research*, 13(3), 921-930. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0165-2>
46. Elahi, N., Kamali, M., & Baghersad, M. H. (2018). Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, 184, 537-556. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088>
47. El-Bendary, M. A., Afifi, S., Moharam, M. E., Elsoud, M. M. A., & Gawdat, N. A. (2022). Optimization of Bacillus subtilis NRC1 growth conditions using response surface methodology for sustainable biosynthesis of gold nanoparticles. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25324-w>
48. El-Deeb, N. M., Khattab, S. M., Abu-Youssef, M. A. M., & Badr, A. M. A. (2022). Green synthesis of novel stable biogenic gold nanoparticles for breast cancer therapeutics via the induction of extrinsic and intrinsic pathways. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15648-y>
49. El-Naggar, N. E., Rabei, N. H., Elmansy, M. F., Elmessiry, O. T., El-Sherbeny, M. K., El-Saidy, M. E., Sarhan, M., & Helal, M. G. (2023). Artificial neural network approach for prediction of AuNPs biosynthesis by Streptomyces flavolimosus, characterization, antitumor potency in-vitro and in-vivo against Ehrlich ascites carcinoma. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39177-4>
50. Fahmy, S. A., Fawzy, I. M., Saleh, B. M., Issa, M. Y., Bakowsky, U., & Azzazy, H. M. E. (2021). Green Synthesis of Platinum and Palladium Nanoparticles Using Peganum harmala L. Seed Alkaloids: Biological and Computational Studies. *Nanomaterials*, 11(4), 965. <https://doi.org/10.3390/nano11040965>
51. Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate Polymers*, 189, 296-303. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037>
52. Fiorda, F. A., De Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., De Souza Vandenberghe, L. P., & Soccol, C. R. (2017). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiology*, 66, 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>
53. Gänzle, M. G., Monnin, L., Zheng, J., Zhang, L., Coton, M., Sicard, D., & Walter, J. (2023). Starter Culture Development and Innovation for Novel Fermented Foods. *Annual Review Of Food Science And Technology*, 15(1). <https://doi.org/10.1146/annurev-food-072023-034207>
54. García-Díez, J., & Saraiva, C. (2021). Use of Starter Cultures in Foods from Animal Origin to Improve Their Safety. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 18(5), 2544. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052544>

55. Ghosh, P. S., Han, G., De, M., Kim, C. K., & Rotello, V. M. (2008). Gold nanoparticles in delivery applications☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *60*(11), 1307-1315. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.016>
56. Ghosh, S., Ahmad, R., Zeyaulah, M., & Khare, S. K. (2021). Microbial Nano-Factories: Synthesis and Biomedical Applications. *Frontiers In Chemistry (Lausanne)*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.626834>
57. Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Daniel, W. L., Massich, M. D., Patel, P. C., & Mirkin, C. A. (2010). Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angewandte Chemie International Edition*, *49*(19), 3280-3294. <https://doi.org/10.1002/anie.200904359>
58. Golhani, D., Khare, A., Krishna, B. G., Jain, V., & Mokka, J. R. (2020). Microbes induced biofabrication of nanoparticles: a review. *Inorganic And Nano-Metal Chemistry*, *50*(10), 983-999. <https://doi.org/10.1080/24701556.2020.1731539>
59. Guan, X., Chen, G., & Shang, C. (2007). ATR-FTIR and XPS study on the structure of complexes formed upon the adsorption of simple organic acids on aluminum hydroxide. *Journal Of Environmental Sciences*, *19*(4), 438-443. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(07\)60073-4](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(07)60073-4)
60. Gudikandula, K., Vadapally, P., & Singara, M. A. (2017). Biogenic synthesis of silver nanoparticles from white rot fungi: Their characterization and antibacterial studies. *OpenNano (New York)*, *2*, 64-78. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2017.07.002>
61. Gultiz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2011). The microbial diversity of water kefir. *International Journal Of Food Microbiology*, *151*(3), 284-288. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016>
62. Guria, M. K., Majumdar, M., & Bhattacharyya, M. (2016). Green synthesis of protein capped nano-gold particle: An excellent recyclable nano-catalyst for the reduction of nitro-aromatic pollutants at higher concentration. *Journal Of Molecular Liquids*, *222*, 549-557. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.07.087>
63. Güzel-Seydim, Z. B., Gökırmaklı, Ç., & Greene, A. K. (2021). A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends In Food Science And Technology*, *113*, 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>
64. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Analytical Chemistry*, *79*(11), 4215-4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>
65. Harris, H. W., Sánchez-Andrea, I., McLean, J. S., Salas, E. C., Tran, W. T., El-Naggar, M. Y., & Nealson, K. H. (2018). Redox Sensing within the Genus *Shewanella*. *Frontiers In Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02568>
66. Hasan, E. A., El-Hashash, M. A., Zahran, M. K., & El-Rafie, H. M. (2022). Comparative study of chemical composition, antioxidant and anticancer activities of both *Turbinaria decurrens* Bory methanol extract and its biosynthesized gold nanoparticles. *Journal Of Drug Delivery Science And Technology*, *67*, 103005. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.103005>
67. He, S., Guo, Z., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, J., & Gu, N. (2007). Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodospseudomonas capsulata*. *Materials Letters*, *61*(18), 3984-3987. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.01.018>
68. Hosny, M., & Fawzy, M. (2021). Instantaneous phytosynthesis of gold nanoparticles via *Persicaria salicifolia* leaf extract, and their medical applications. *Advanced Powder Technology*, *32*(8), 2891-2904. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2021.06.004>
69. Hu, X., Zhang, Y., Ding, T., Liu, J., & Zhao, H. (2020). Multifunctional Gold Nanoparticles: A Novel Nanomaterial for Various Medical Applications and Biological Activities. *Frontiers In*

70. Huang, J., Wang, W., Lin, L., Li, Q., Lin, W., Li, M., & Mann, S. (2009). A General Strategy for the Biosynthesis of Gold Nanoparticles by Traditional Chinese Medicines and Their Potential Application as Catalysts. *Chemistry-An Asian Journal*, 4(7), 1050-1054. <https://doi.org/10.1002/asia.200900064>
71. Husseiny, M. I., Elaziz, M. A., Badr, Y., & Mahmoud, M. A. (2007). Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 67(3-4), 1003-1006. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2006.09.028>
72. Indiaro, R., Indriana, L. P. A., Andoyo, R., Subroto, E., & Nurhadi, B. (2021). Bottom-up nanoparticle synthesis: a review of techniques, polyphenol-based core materials, and their properties. *European Food Research & Technology*, 248(1), 1-24. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03867-y>
73. Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal Of Drug Delivery Science And Technology*, 53, 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>
74. Ji, G., & Silver, S. (1995). Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *Journal Of Industrial Microbiology*, 14(2), 61-75. <https://doi.org/10.1007/bf01569887>
75. Jia, H., Gao, X., Chen, Z., Liu, G., Zhang, X., Yan, H., Zhou, H., & Zheng, L. (2012). The high yield synthesis and characterization of gold nanoparticles with superior stability and their catalytic activity. *CrystEngComm*, 14(22), 7600. <https://doi.org/10.1039/c2ce25840d>
76. Joyner, R. P., Tang, J. H., Helenius, J., Dultz, E., Brune, C., Holt, L. J., Huet, S., Müller, D. J., & Weis, K. (2016). A glucose-starvation response regulates the diffusion of macromolecules. *eLife*, 5. <https://doi.org/10.7554/elife.09376>
77. Kamala, P. M., & Iyer, P. (2020). Antiproliferative effects on tumor cells of the synthesized gold nanoparticles against Hep2 liver cancer cell line. *Egyptian Liver Journal*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s43066-020-0017-4>
78. Karpushkin, E. A., Aleksandrov, Y. D., Gibalova, A., Abakumov, A. M., Lopatina, L. I., & Sergeyev, V. G. (2018). Preparation of gold nanoparticles via direct interaction of tetrachloroauric acid with DNA. *Colloid And Polymer Science*, 297(3), 433-444. <https://doi.org/10.1007/s00396-018-4448-y>
79. Keskin, C., Atalar, M. N., Baran, M. F., & Baran, A. (2021). Artemisia absinthium Bitki Ekstraktından Altın Nanopartiküllerin Çevre Dostu Hızlı Sentezi ve Antimikrobiyal Aktivitelerin Uygulanması. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(1), 365-375. <https://doi.org/10.21597/jist.779169>
80. Khan, M. A. R., Mamun, M. S. A., Habib, M. A., Islam, A., Mahiuddin, M., Karim, K. M. R., Naime, J., Saha, P. K., Dey, S. K., & Ara, M. H. (2022). A review on gold nanoparticles: Biological synthesis, characterizations, and analytical applications. *Results In Chemistry*, 4, 100478. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100478>
81. Kikuchi, F., Kato, Y., Furihata, K., Kogure, T., Imura, Y., Yoshimura, E., & Suzuki, M. (2016). Formation of gold nanoparticles by glycolipids of *Lactobacillus casei*. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep34626>
82. Kim, D., Thomas, S., & Fogler, H. S. (2000). Effects of pH and Trace Minerals on Long-Term Starvation of *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied And Environmental Microbiology*, 66(3), 976-981. <https://doi.org/10.1128/aem.66.3.976-981.2000>
83. Kim, T., Kim, M., Lee, J., & Hur, H. (2018). Biosynthesis of Nanomaterials by *Shewanella* Species for Application in Lithium Ion Batteries. *Frontiers In Microbiology*, 9.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02817>

84. Kitching, M., Ramani, M., & Marsili, E. (2014). Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up. *Microbial Biotechnology*, 8(6), 904-917. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12151>
85. Korakli, M., & Vogel, R. F. (2006). Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 71(6), 790-803. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0469-4>
86. Koul, B., Poonia, A. K., Yadav, D., & Jin, J. (2021). Microbe-Mediated Biosynthesis of Nanoparticles: Applications and Future Prospects. *Biomolecules*, 11(6), 886. <https://doi.org/10.3390/biom11060886>
87. Krishnaraj, C., Muthukumar, P., Ramachandran, R., Balakumaran, M. D., & Kalaichelvan, P. T. (2014). *Acalypha indica* Linn: Biogenic synthesis of silver and gold nanoparticles and their cytotoxic effects against MDA-MB-231, human breast cancer cells. *Biotechnology Reports*, 4, 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.08.002>
88. Krishnaraj, C., Song, S., & Yun, S. (2019). Effect of size and shape controlled biogenic synthesis of gold nanoparticles and their mode of interactions against food borne bacterial pathogens. *Arabian Journal Of Chemistry*, 12(8), 1994-2006. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.041>
89. Kumar, D. R., Saini, N., Jain, N., Sareen, R., & Pandit, V. (2013). Gold nanoparticles: an era in bionanotechnology. *Expert Opinion On Drug Delivery*, 10(3), 397-409. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.749854>
90. Kuyukina, M. S., Makarova, M., Ившина, И. Б., Казымов, К. П., & Osovetsky, B. (2022). Biosynthesis and Characterization of Gold Nanoparticles Produced Using *Rhodococcus Actinobacteria* at Elevated Chloroauric Acid Concentrations. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(21), 12939. <https://doi.org/10.3390/ijms232112939>
91. Laureys, D., Van Jean, A., Dumont, J. P., & De Vuyst, L. (2017). Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 101(7), 2811-2819. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8084-5>
92. Lee, K. X., Shameli, K., Miyake, M., Khairudin, N. B. B. A., Mohamad, S. E., Hara, H., Nordin, M. F. B. M., & Yew, Y. P. (2017). Gold Nanoparticles Biosynthesis: A Simple Route for Control Size Using Waste Peel Extract. *IEEE Transactions On Nanotechnology*, 16(6), 954-957. <https://doi.org/10.1109/tnano.2017.2728600>
93. Lengke, M. F., Sanpawanitchakit, C., & Southam, G. (2011). Biosynthesis of Gold Nanoparticles: A Review. En *Springer eBooks* (pp. 37-74). https://doi.org/10.1007/978-3-642-18312-6_3
94. Liang, S., Wang, X., Li, C., & Liu, L. (2024). Biological Activity of Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides and Their Applications in the Food and Pharmaceutical Industries. *Foods*, 13(11), 1621. <https://doi.org/10.3390/foods13111621>
95. Lindsey, M. (2024). Cross-Cultural Differences in Food Preferences and Consumption Patterns. *Journal Of Food Sciences*, 5(1), 30-42. <https://doi.org/10.47941/jfs.1841>
96. Liu, L., & Choi, S. (2021). Enhanced biophotovoltaic generation in cyanobacterial biophotovoltaics with intracellularly biosynthesized gold nanoparticles. *Journal Of Power Sources*, 506, 230251. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2021.230251>
97. Liu, Q., Kim, Y., Im, G., Zhu, J., Wu, Y., Liu, Y., & Bhang, S. H. (2020). Inorganic Nanoparticles Applied as Functional Therapeutics. *Advanced Functional Materials*, 31(12). <https://doi.org/10.1002/adfm.202008171>
98. López-Lorente, Á. I., & Mizaikoff, B. (2016). Recent advances on the characterization of

- nanoparticles using infrared spectroscopy. *TrAC. Trends In Analytical Chemistry*, *84*, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.012>
99. Lu, H., Tang, S., Yun, G., Li, H., Zhang, Y., Qiao, R., & Li, W. (2020). Modular and Integrated Systems for Nanoparticle and Microparticle Synthesis—A Review. *Biosensors*, *10*(11), 165. <https://doi.org/10.3390/bios10110165>
 100. Lynch, K. M., Wilkinson, S., Daenen, L., & Arendt, E. K. (2021). An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *International Journal Of Food Microbiology*, *345*, 109128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>
 101. Malatesta, M. (2016). Transmission electron microscopy for nanomedicine: novel applications for long-established techniques. *European Journal Of Histochemistry*, *60*(4). <https://doi.org/10.4081/ejh.2016.2751>
 102. Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M. G., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., & Hutkins, R. W. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion In Biotechnology*, *44*, 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>
 103. Markus, J., Mathiyalagan, R., Kim, Y., Abbai, R., Singh, P., Ahn, S., Perez, Z. E. J., Hurh, J., & Yang, D. C. (2016). Intracellular synthesis of gold nanoparticles with antioxidant activity by probiotic *Lactobacillus kimchicus* DCY51 T isolated from Korean kimchi. *Enzyme And Microbial Technology*, *95*, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.08.018>
 104. Martínez-Torres, A., Gutiérrez-Ambrocio, S., Heredia-del-Orbe, P., Villa-Tanaca, L., & Hernández-Rodríguez, C. (2016). Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations. *International Journal Of Food Science & Technology*, *52*(2), 559-571. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13312>
 105. Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E., & Frias, J. (2016). Bioactive Peptides in Fermented Foods. En *Elsevier eBooks* (pp. 23-47). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802309-9.00002-9>
 106. Mavrocordatos, D., Pronk, W., & Boller, M. (2004). Analysis of environmental particles by atomic force microscopy, scanning and transmission electron microscopy. *Water Science & Technology*, *50*(12), 9-18. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0690>
 107. Meti, R. S., Neelagund, S. E., Urs, D., Krishnappa, D. K., & Kotresh, K. R. (2023). Biosynthesis, mosquito larvicidal potential, and anticancer activities of gold nanoparticles from *Acacia sinuata* seed extract. *Biomedicine*, *43*(02), 684-689. <https://doi.org/10.51248/.v43i02.2706>
 108. Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Caviedes, M., & Ramírez-Cárdenas, L. (2014). Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. *Avances En Ciencias E Ingenierías*, *6*(1). <https://doi.org/10.18272/aci.v6i1.160>
 109. Mondal, N. K., Chowdhury, S., Mondal, N. K., Shaikh, W. A., Debnath, P., & Chakraborty, S. (2021). Insecticidal and fungicidal performance of bio-fabricated silver and gold nanoparticles. *International Journal Of Environmental Science And Technology*, *19*(3), 1573-1592. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03181-w>
 110. Morgan, E., Wupperfeld, D., Morales, D. P., & Reich, N. O. (2019). Shape Matters: Gold Nanoparticle Shape Impacts the Biological Activity of siRNA Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, *30*(3), 853-860. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00004>
 111. Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2008). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, *43*(2), 134-179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>
 112. Mughal, B., Zaidi, S. Z. J., Zhang, X., & Hassan, S. U. (2021). Biogenic Nanoparticles: Synthesis, Characterisation and Applications. *Applied Sciences*, *11*(6), 2598.

<https://doi.org/10.3390/app11062598>

113. Muhialdin, B. J., Zawawi, N., Razis, A. F. A., Bakar, J., & Zarei, M. (2021). Antiviral activity of fermented foods and their probiotics bacteria towards respiratory and alimentary tracts viruses. *Food Control*, *127*, 108140. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108140>
114. Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S. R., Khan, M. I., Parishcha, R., Ajaykumar, P. V., Alam, M. S., Kumar, R., & Sastry, M. (2001). Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis. *Nano Letters*, *1*(10), 515-519. <https://doi.org/10.1021/nl0155274>
115. Murphy, C. J., Gole, A. M., Hunyadi, S. E., Stone, J. W., Sisco, P. N., Alkilany, A., Kinard, B. E., & Hankins, P. (2008). Chemical sensing and imaging with metallic nanorods. *Chemical Communications*, *5*, 544-557. <https://doi.org/10.1039/b711069c>
116. Murphy, C. J., Gole, A., Stone, J. W., Sisco, P. N., Alkilany, A. M., Goldsmith, E. C., & Baxter, S. D. (2008). Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. *Accounts Of Chemical Research*, *41*(12), 1721-1730. <https://doi.org/10.1021/ar800035u>
117. Murray, A. J., Zhu, J., Wood, J., & Macaskie, L. E. (2017). A novel biorefinery: Biorecovery of precious metals from spent automotive catalyst leachates into new catalysts effective in metal reduction and in the hydrogenation of 2-pentyne. *Minerals Engineering*, *113*, 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2017.08.011>
118. Nadaf, S. J., Jadhav, N. R., Naikwadi, H. S., Savekar, P. L., Sapkal, I. D., Kambli, M. M., & Desai, I. A. (2022). Green synthesis of gold and silver nanoparticles: Updates on research, patents, and future prospects. *OpenNano*, *8*, 100076. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100076>
119. Nair, B., & Pradeep, T. (2002). Coalescence of Nanoclusters and Formation of Submicron Crystallites Assisted by Lactobacillus Strains. *Crystal Growth & Design*, *2*(4), 293-298. <https://doi.org/10.1021/cg0255164>
120. Nandhini, J. T., Ezhilarasan, D., & Rajeshkumar, S. (2020). An ecofriendly synthesized gold nanoparticles induces cytotoxicity via apoptosis in HepG2 cells. *Environmental Toxicology*, *36*(1), 24-32. <https://doi.org/10.1002/tox.23007>
121. Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Sajjadi, M., & Issaabadi, Z. (2019). An Introduction to Nanotechnology. En *Interface Science and Technology* (pp. 1-27). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813586-0.00001-8>
122. Nejad, M. S., Najafabadi, N. S., Aghighi, S., Pakina, E., & Zargar, M. (2022). Evaluation of Phoma sp. Biomass as an Endophytic Fungus for Synthesis of Extracellular Gold Nanoparticles with Antibacterial and Antifungal Properties. *Molecules*, *27*(4), 1181. <https://doi.org/10.3390/molecules27041181>
123. Nurakhmetova, Z. A., Azhkeyeva, A. N., Klassen, I. A., & Tatykhanova, G. S. (2020). Synthesis and Stabilization of Gold Nanoparticles Using Water-Soluble Synthetic and Natural Polymers. *Polymers*, *12*(11), 2625. <https://doi.org/10.3390/polym12112625>
124. Oliveira, J. P., Prado, A. R., Keijok, W. J., Ribeiro, M. R., Pontes, M. J., Nogueira, B. V., & Guimarães, M. C. (2017). A helpful method for controlled synthesis of monodisperse gold nanoparticles through response surface modeling. *Arabian Journal Of Chemistry*, *13*(1), 216-226. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.04.003>
125. Öner, E. T., Hernández, L., & Combie, J. (2016). Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances*, *34*(5), 827-844. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.002>
126. Osman, M. S., Bashah, N. A. A., Amri, N., Kasmir, S. I., Safri, A. I. D., Ariff, M. A. M., & Yaakob,

- N. (2018). Biosynthesis of gold nanoparticles using aqueous extracts of Mariposa Cristia Vespertillonis: influence of pH on its colloidal stability. *Materials Today: Proceedings*, 5(10), 22050-22055. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.07.067>
127. Osonga, F. J., Yazgan, I., Kariuki, V., Luther, D., Jimenez, A., Le, P., & Sadik, O. A. (2016). Greener synthesis and characterization, antimicrobial and cytotoxicity studies of gold nanoparticles of novel shapes and sizes. *RSC Advances*, 6(3), 2302-2313. <https://doi.org/10.1039/c5ra22906e>
 128. Oza, G., Pandey, S., Mewada, A., Kalita, G., & Sharon, M. (2012). Facile biosynthesis of gold nanoparticles exploiting optimum pH and temperature of fresh water algae chlorella pyrenoidusa. *Pelagia Research Library*, 3(3), 1405-1412. https://www.researchgate.net/publication/230707309_Facile_biosynthesis_of_gold_nanoparticles_exploiting_optimum_pH_and_temperature_of_fresh_water_algae_Chlorella_pyrenoidusa
 129. Panda, T., & Deepa, K. (2011). Biosynthesis of Gold Nanoparticles. *Journal Of Nanoscience And Nanotechnology*, 11(12), 10279-10294. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.5021>
 130. Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., De Angelis, M., Gobetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J. A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Turrone, F., Van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., & Kok, J. (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 80(3), 837-890. <https://doi.org/10.1128/mubr.00076-15>
 131. Parlindungan, E., May, B. K., & Jones, O. A. H. (2019). Metabolic Insights Into the Effects of Nutrient Stress on Lactobacillus plantarum B21. *Frontiers In Molecular Biosciences*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00075>
 132. Patil, M. P., Kang, M., Niyonizigiye, I., Singh, A., Kim, J., Seo, Y. B., & Kim, G. (2019). Extracellular synthesis of gold nanoparticles using the marine bacterium Paracoccus haeundaensis BC74171T and evaluation of their antioxidant activity and antiproliferative effect on normal and cancer cell lines. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 183, 110455. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110455>
 133. Patra, J. K., Kwon, Y., & Baek, K. (2016). Green biosynthesis of gold nanoparticles by onion peel extract: Synthesis, characterization and biological activities. *Advanced Powder Technology*, 27(5), 2204-2213. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2016.08.005>
 134. Peng, G., Huma, Z., Umair, M., Hussain, I., & Javed, I. (2020). Nanosilver at the interface of biomedical applications, toxicology, and synthetic strategies. En *Elsevier eBooks* (pp. 119-139). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816960-5.00008-2>
 135. Philip, D. (2010). Green synthesis of gold and silver nanoparticles using Hibiscus rosa sinensis. *Physica. E, Low-dimensional Systems And Nanostructures (Print)*, 42(5), 1417-1424. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2009.11.081>
 136. Pidoux, M. (1989). The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from Lactobacillus hilgardii producing a polysaccharide gel. *MIRCEN Journal Of Applied Microbiology And Biotechnology*, 5(2), 223-238. <https://doi.org/10.1007/bf01741847>
 137. Pinto, R. J., Lucas, J. M., Morais, M. P., Santos, S. A., Silvestre, A. J. D., Marques, P. A., & Freire, C. S. (2017). Demystifying the morphology and size control on the biosynthesis of gold nanoparticles using Eucalyptus globulus bark extract. *Industrial Crops And Products*, 105, 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.003>
 138. Poole, C. P., Jones, F. J., & Owens, F. J. (2003). Introduction to Nanotechnology. *Materials Today*, 6(9), 41. [https://doi.org/10.1016/s1369-7021\(03\)00928-3](https://doi.org/10.1016/s1369-7021(03)00928-3)
 139. Qin, H., Wu, H., Shen, K., Liu, Y., Li, M., Wang, H., Qiao, Z., & Mu, Z. (2022). Fermented Minor

- Grain Foods: Classification, Functional Components, and Probiotic Potential. *Foods*, 11(20), 3155. <https://doi.org/10.3390/foods11203155>
140. Qu, Y., Li, X., Lian, S., Dai, C., Jv, Z., Zhao, B., & Zhou, H. (2018). Biosynthesis of gold nanoparticles using fungus *Trichoderma* sp. WL-Go and their catalysis in degradation of aromatic pollutants. *Iet Nanobiotechnology*, 13(1), 12-17. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5177>
 141. Qu, Y., Lian, S., Shen, W., Li, Z., Yang, J., & Zhang, H. (2019). Rod-shaped gold nanoparticles biosynthesized using Pb²⁺-induced fungus *Aspergillus* sp. WL-Au. *Bioprocess And Biosystems Engineering*, 43(1), 123-131. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02210-w>
 142. Radhakrishnan, R., Mani, U., Gnanamani, A., & Shanmugavel, M. (2021). Myco-Fabricated Gold Nanoparticles from *Aspergillus tamarii* MTCC5152, its Characterization and Dye Biodegradation. *Applied Microbiology*, 52-62. <https://doi.org/10.37256/amtt.222021792>
 143. Rajasree, S. R., & Suman, T. Y. (2012). Extracellular biosynthesis of gold nanoparticles using a gram negative bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Asian Pacific Journal Of Tropical Disease*, 2, S796-S799. [https://doi.org/10.1016/s2222-1808\(12\)60267-9](https://doi.org/10.1016/s2222-1808(12)60267-9)
 144. Rajeshkumar, S., Balusamy, S. R., Kumar, V., Menon, S., Thangavelu, L., & Perumalsamy, H. (2021). Biosynthesis of gold nanoparticles using marine microbe (*Vibrio alginolyticus*) and its anticancer and antioxidant analysis. *Journal Of King Saud University - Science*, 33(1), 101260. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101260>
 145. Rajeshkumar, S., & Bharath, L. (2017). Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles – A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. *Chemico-biological Interactions*, 273, 219-227. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.06.019>
 146. Rattanawongwiboon, T., Soontaranon, S., Hemvichian, K., Lertsarawut, P., Laksee, S., & Picha, R. (2022). Study on particle size and size distribution of gold nanoparticles by TEM and SAXS. *Radiation Physics And Chemistry*, 191, 109842. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2021.109842>
 147. Rauf, A., Ahmad, T., Khan, A., Maryam, Uddin, G., Ahmad, B., Mabkhot, Y. N., Bawazeer, S., Riaz, N., Malikovna, B. K., Almarhoon, Z. M., & Al-Harrasi, A. (2021). Green synthesis and biomedical applications of silver and gold nanoparticles functionalized with methanolic extract of *Mentha longifolia*. *Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology*, 49(1), 194-203. <https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1890099>
 148. Reddy, A. S., Chen, C., Chen, C., Jean, J., Chen, H., Tseng, M., Fan, C., & Wang, J. (2010). Biological Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Mediated by the Bacteria *Bacillus Subtilis*. *Journal Of Nanoscience And Nanotechnology*, 10(10), 6567-6574. <https://doi.org/10.1166/jnn.2010.2519>
 149. Riaz, S., Rana, N. F., Hussain, I., Tanweer, T., Nawaz, A., Mena, F., Janjua, H. A., Alam, T., Batool, A., Naeem, A., Hameed, M., & Ali, S. M. (2020). Effect of Flavonoid-Coated Gold Nanoparticles on Bacterial Colonization in Mice Organs. *Nanomaterials*, 10(9), 1769. <https://doi.org/10.3390/nano10091769>
 150. Rizwan, D., Masoodi, F. A., Wani, S. M., & Mir, S. A. (2023). Bioactive peptides from fermented foods and their relevance in COVID-19 mitigation. *Food Production Processing and Nutrition*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s43014-023-00165-w>
 151. Romero-Luna, H. E., Peredo-Lovillo, A., Hernández-Mendoza, A., Hernández-Sánchez, H., Cauch-Sánchez, P. I., Ribas-Aparicio, R. M., & Dávila-Ortíz, G. (2020). Probiotic Potential of *Lactobacillus paracasei* CT12 Isolated from Water Kefir Grains (Tibicos). *Current Microbiology*, 77(10), 2584-2592. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02016-0>
 152. Rotimi, L., Ojemaye, M. O., Okoh, O. O., Sadimenko, A., & Okoh, A. I. (2019). Synthesis,

- characterization, antimalarial, antitrypanocidal and antimicrobial properties of gold nanoparticle. *Green Chemistry Letters And Reviews*, 12(1), 61-68. <https://doi.org/10.1080/17518253.2019.1569730>
153. Saira, F., Saleemi, S., Razzaq, H., & Qureshi, R. (2021). Spectrophotometric analysis of stability of gold nanoparticles during catalytic reduction of 4-nitrophenol. *Turkish Journal Of Chemistry*, 45(1), 82-91. <https://doi.org/10.3906/kim-2004-52>
 154. Sanghi, R., & Verma, P. (2010). pH Dependant Fungal Proteins In The 'green' Synthesis Of Gold Nanoparticles. *Advanced Materials Letters*, 1(3), 193-199. <https://doi.org/10.5185/amlett.2010.5124>
 155. Şanlıer, N., Gökçen, B. B., & Sezgin, A. C. (2017). Health benefits of fermented foods. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 59(3), 506-527. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1383355>
 156. Santos, P. S. S. D., Almeida, J., Pastoriza-Santos, I., & Coelho, L. (2021). Advances in Plasmonic Sensing at the NIR–A Review. *Sensors*, 21(6), 2111. <https://doi.org/10.3390/s21062111>
 157. Santra, T. S., Tseng, F., & Barik, T. K. (2015). Green Biosynthesis of Gold Nanoparticles and Biomedical Applications. *American Journal Of Nano Research And Application*, 2(6), 5. <https://doi.org/10.11648/j.nano.s.2014020602.12>
 158. Sardar, R., Funston, A. M., Mulvaney, P., & Murray, R. W. (2009). Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. *Langmuir*, 25(24), 13840-13851. <https://doi.org/10.1021/la9019475>
 159. Sekar, V., Al-Ansari, M. M., Narenkumar, J., Al-Humaid, L., Arunkumar, P., & Agilan, S. (2022). Synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) with improved anti-diabetic, antioxidant and antimicrobial activity from *Physalis minima*. *Journal Of King Saud University - Science*, 34(6), 102197. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102197>
 160. Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., & Roy, N. C. (2013). The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Mediators Of Inflammation*, 2013, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2013/237921>
 161. Shirzadi-Ahodashti, M., Mizwari, Z. M., Mohammadi-Aghdam, S., Ahmadi, S., Ebrahimzadeh, M. A., & Mortazavi-Derazkola, S. (2023). Optimization and evaluation of anticancer, antifungal, catalytic, and antibacterial activities: Biosynthesis of spherical-shaped gold nanoparticles using *Pistacia vera* hull extract (AuNPs@PV). *Arabian Journal Of Chemistry*, 16(1), 104423. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104423>
 162. Si, A., Pal, K., Kralj, S., El-Sayyad, G., De Souza, F., & Narayanan, T. (2020). Sustainable preparation of gold nanoparticles via green chemistry approach for biogenic applications. *Materials Today Chemistry*, 17, 100327. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2020.100327>
 163. Silver, S. (1996). Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. *Gene*, 179(1), 9-19. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(96\)00323-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(96)00323-x)
 164. Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends In Biotechnology*, 34(7), 588-599. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>
 165. Singh, P. K., & Kundu, S. (2013). Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using Bacteria. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 84(2), 331-336. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0230-6>
 166. Singh, A. K., & Srivastava, O. N. (2015). One-Step Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Black Cardamom and Effect of pH on Its Synthesis. *Nanoscale Research Letters*, 10(1).

<https://doi.org/10.1186/s11671-015-1055-4>

167. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). Principles of Instrumental Analysis. Cengage Learning.
168. Srivastava, S. K., Yamada, R., Ogino, C., & Kondo, A. (2013). Biogenic synthesis and characterization of gold nanoparticles by Escherichia coli K12 and its heterogeneous catalysis in degradation of 4-nitrophenol. *Nanoscale Research Letters*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1556-276x-8-70>
169. Steinkraus, K. H. (1997). Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*, 8(5-6), 311-317. [https://doi.org/10.1016/s0956-7135\(97\)00050-9](https://doi.org/10.1016/s0956-7135(97)00050-9)
170. Sterritt, R. M., & Lester, J. (1980). Interactions of heavy metals with bacteria. *Science Of The Total Environment*, 14(1), 5-17. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(80\)90122-9](https://doi.org/10.1016/0048-9697(80)90122-9)
171. Stuart, B. H. (2004). Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. En *Analytical techniques in the sciences*. <https://doi.org/10.1002/0470011149>
172. Sujitha, M. V., & Kannan, S. (2012). Green synthesis of gold nanoparticles using Citrus fruits (Citrus limon, Citrus reticulata and Citrus sinensis) aqueous extract and its characterization. *Spectrochimica Acta Part A Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 102, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.042>
173. Suzuki, S. W., Onodera, J., & Ohsumi, Y. (2011). Starvation Induced Cell Death in Autophagy-Defective Yeast Mutants Is Caused by Mitochondria Dysfunction. *PLoS ONE*, 6(2), e17412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017412>
174. Sylvestre, J.-P., Poulin, S., Kabashin, A. V., Sacher, E., Meunier, M., & Luong, J. H. T. (2004). Surface Chemistry of Gold Nanoparticles Produced by Laser Ablation in Aqueous Media. *Journal Of Physical Chemistry Letters*, 108(43). <https://doi.org/10.1021/jp047134>
175. Talari, A. C. S., Martinez, M. A. G., Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2016). Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 52(5), 456-506. <https://doi.org/10.1080/05704928.2016.1230863>
176. Tamang, J. P., Cotter, P. D., Endo, A., Han, N. S., Kort, R., Liu, S., Mayo, B., Westerik, N., & Hutkins, R. W. (2020). Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 19(1), 184-217. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12520>
177. Tiede, K., Boxall, A. B. A., Tear, S. P., Lewis, J., David, H., & Hasselov, M. (2008). Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Additives & Contaminants. Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 25(7), 795-821. <https://doi.org/10.1080/02652030802007553>
178. Tikariha, S., Singh, S., Banerjee, S., & Vidyarthi, A. S. (2012). Biosynthesis Of Gold Nanoparticles, Scope And Application: A Review. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 3(6). https://www.researchgate.net/publication/268406834_Biosynthesis_of_gold_nanoparticles_scope_and_application_A_review
179. Tomar, A., & Garg, G. (2012). Short Review on Application of Gold Nanoparticles. *Global Journal Of Pharmacology*, 7(1), 34-38. <https://doi.org/10.5829/idosi.gjp.2013.7.1.66173>
180. Ünlüer, N., Gül, A., & Hameş, E. E. (2023). Statistical optimization and characterization of monodisperse and stable biogenic gold nanoparticle synthesis using Streptomyces sp. M137-2. *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, 39(8). <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03661-w>

181. Vairavel, M., Ezhilarasan, D., & Shanmugam, R. (2020). An eco-friendly synthesis of *Enterococcus* sp.-mediated gold nanoparticle induces cytotoxicity in human colorectal cancer cells. *Environmental Science And Pollution Research*, 27(8), 8166-8175. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07511-x>
182. Waclawek, S., Gončuková, Z., Adach, K., Fijałkowski, M., & Černík, M. (2018). Green synthesis of gold nanoparticles using *Artemisia dracunculus* extract: control of the shape and size by varying synthesis conditions. *Environmental Science And Pollution Research*, 25(24), 24210-24219. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2510-4>
183. Wadekar, P. P. (2017). A REVIEW ON GOLD NANOPRTICLES SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION. *Universal Journal Of Pharmaceutical Research*, 2(4), 65-69. <https://doi.org/10.22270/ujpr.v2i4.rw5>
184. Waghmare, S. S., Deshmukh, A. M., & Sadowski, Z. (2014). Biosynthesis, optimization, purification and characterization of gold nanoparticles. *African Journal Of Microbiology Research*, 8(2), 138-146. <https://doi.org/10.5897/ajmr10.143>
185. Wang, R., Xu, X., Puja, A. M., Perumalsamy, H., Balusamy, S. R., Kim, H., & Kim, Y. (2021). Gold Nanoparticles Prepared with *Phyllanthus emblica* Fruit Extract and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Can Induce Apoptosis via Mitochondrial Impairment with Inhibition of Autophagy in the Human Gastric Carcinoma Cell Line AGS. *Nanomaterials*, 11(5), 1260. <https://doi.org/10.3390/nano11051260>
186. Williams, D. B., & Carter, C. B. (1996). The transmission electron microscope. En Springer eBooks (pp. 3-17). https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2519-3_1
187. Wood, J. M., & Wang, H. (1983). Microbial resistance to heavy metals. *Environmental Science & Technology*, 17(12), 582A-590A. <https://doi.org/10.1021/es00118a717>
188. Woźniak, A., Malankowska, A., Nowaczyk, G., Grześkowiak, B. F., Tuśnio, K., Słomski, R., & Jurga, S. (2017). Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications. *Journal Of Materials Science: Materials In Medicine*, 28(6). <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5902-y>
189. Wypij, M., Jędrzejewski, T., Trzczińska-Wencel, J., Ostrowski, M., Rai, M., & Golińska, P. (2021). Green Synthesized Silver Nanoparticles: Antibacterial and Anticancer Activities, Biocompatibility, and Analyses of Surface-Attached Proteins. *Frontiers In Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.632505>
190. Yang, N., WeiHong, L., & Hao, L. (2014). Biosynthesis of Au nanoparticles using agricultural waste mango peel extract and its in vitro cytotoxic effect on two normal cells. *Materials Letters*, 134, 67-70. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.07.025>
191. Yeh, Y., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, 4(6), 1871-1880. <https://doi.org/10.1039/c1nr11188d>
192. Yi, S., Xia, L., Lenaghan, S. C., Sun, L., Huang, Y., Burriss, J. N., Stewart, C. N., & Zhang, M. (2013). Bio-Synthesis of Gold Nanoparticles Using English ivy (*Hedera helix*). *Journal Of Nanoscience And Nanotechnology*, 13(3), 1649-1659. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7183>
193. Ying, J. Y., Zheng, Y., Zhang, H., & Fu, L. (2019). Room temperature biosynthesis of gold nanoparticles with *Lycoris aurea* leaf extract for the electrochemical determination of aspirin. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*, 19(2), 585-592. <https://doi.org/10.24275/rmiq/mat741>
194. Yu, X., Wang, Z., Cui, H., Wu, X., Chai, W., Wei, J., Chen, Y., & Zhang, Z. (2022). A Review on Gold Nanotriangles: Synthesis, Self-Assembly and Their Applications. *Molecules*, 27(24), 8766. <https://doi.org/10.3390/molecules27248766>

195. Zannini, E., Lynch, K. M., Nyhan, L., Sahin, A. W., Riordan, P. O., Luk, D., & Arendt, E. K. (2022). Influence of Substrate on the Fermentation Characteristics and Culture-Dependent Microbial Composition of Water Kefir. *Fermentation*, 9(1), 28. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010028>
196. Zhang, X., He, X., Wang, K., Wang, Y., Li, H., & Wang, T. (2009). Biosynthesis of Size-Controlled Gold Nanoparticles Using Fungus, *Penicillium* sp. *Journal Of Nanoscience And Nanotechnology*, 9(10), 5738-5744. <https://doi.org/10.1166/jnn.2009.1287>
197. Zhang, S., & Wang, C. (2023). Precise Analysis of Nanoparticle Size Distribution in TEM Image. *Methods And Protocols*, 6(4), 63. <https://doi.org/10.3390/mps6040063>
198. Zook, J. M., Rastogi, V., MacCuspie, R. I., Keene, A. M., & Fagan, J. A. (2011). Measuring Agglomerate Size Distribution and Dependence of Localized Surface Plasmon Resonance Absorbance on Gold Nanoparticle Agglomerate Size Using Analytical Ultracentrifugation. *ACS Nano*, 5(10), 8070-8079. <https://doi.org/10.1021/nn202645b>
199. Zuhrotun, A., Oktaviani, D. J., & Hasanah, A. N. (2023). Biosynthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using Phytochemical Compounds. *Molecules*, 28(7), 3240. <https://doi.org/10.3390/molecules28073240>

10. Anexos

10.1. Formulación de los medios de cultivo

10.1.1. Medio de cultivo piloncillo para tibicos

Se pesó 5 g de piloncillo y se agregó 50 mL de agua de garrafón y 50 mL de agua mineral para obtener una concentración de 5% P/V, éste medio se puso en un frasco de 413 mL y se le adicionaron 21 g de tibicos.

10.1.2. Glicerol

Se preparo una solución de glicerol al 30% para conservar las cepas aisladas en criorefrigeración a -70 °C, se midió 100 mL de agua destilada por cada 30 mL de glicerol a utilizar y se esterilizo la solución en autoclave.

10.1.3. GYM

Compuesto	Cantidad (gramos)
Glucosa	4
Extracto de levadura	4
Extracto de malta	10
Carbonato de calcio	2
Agar	12
Cantidades para 1 litro de medio	

10.1.4. YPD

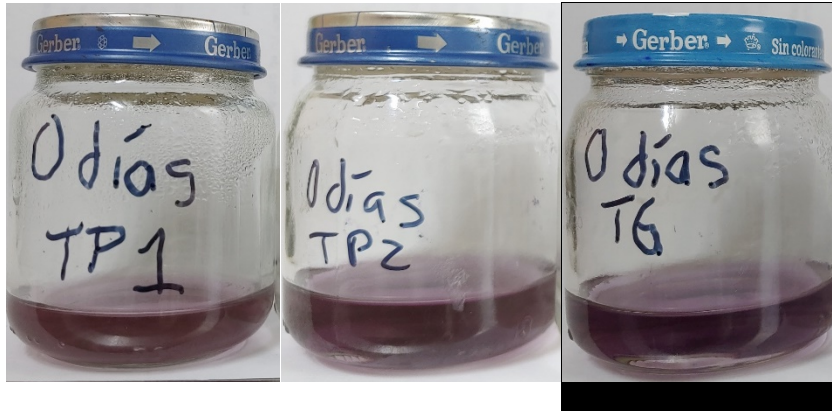
Compuesto	Cantidad (gramos)
Extracto de levadura	10
Peptona de caseína	20
Dextrosa	20
Agar	12
Cantidades para 1 litro de medio	

10.1.5. GYC

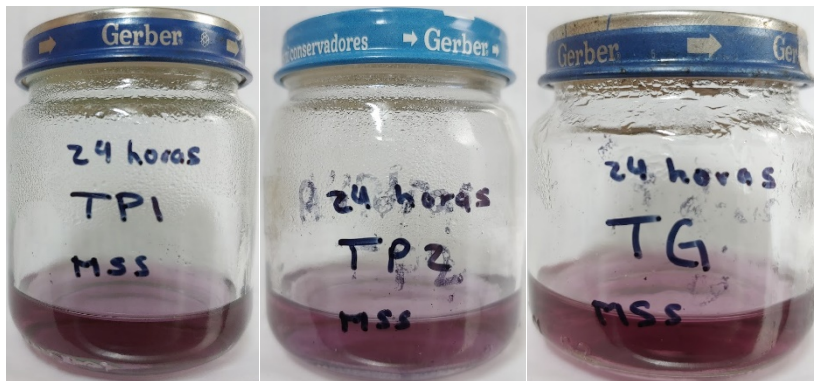
Compuesto	Cantidad (gramos)
Extracto de levadura	10
Dextrosa	50
Carbonato de calcio	30
Agar	12
Cantidades para 1 litro de medio	

10.2. Fotos de las nanopartículas obtenidas en la biosíntesis V-Cinética a los diferentes tiempos de inanición

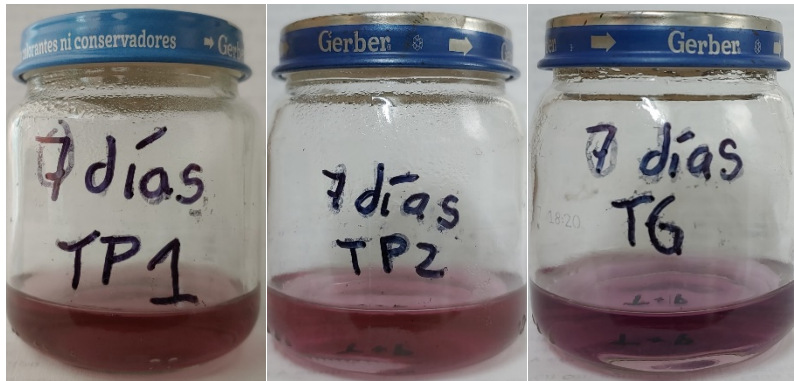
10.2.1. 2 horas inanición



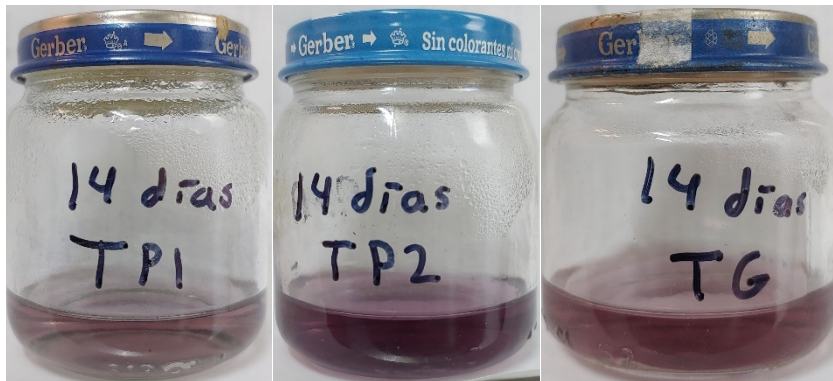
10.2.2. 1 día inanición



10.2.3. 7 días inanición



10.2.4. 14 días inanición



10.2.5. 21 días inanición

