



*Instituto de Ciencias
Centro de Investigaciones en Dispositivos Semiconductores
Posgrado en Dispositivos Semiconductores*

“Estudio de compósitos de celulosa bacteriana asistida por Nanopartículas de oro”

Presenta:

Natanael Victoriano Huerta # Matrícula 219570201

Dirigida por:

Dr. Salvador Alcántara Iniesta
Director

Dra. Blanca Susana Soto Cruz
Co director

Dr. Marlon Rojas López
Co Director Externo

Generación
2019 – 2022

©BUAP, Diciembre 2024.
Todos los derechos reservados.

Beca CONACyT # 625256

Tabla de contenido

Contenido

Tabla de contenido	1
Resumen.....	4
Capítulo 1	6
Introducción	6
1.1 Justificación.....	10
1.2 Objetivo General	10
1.3 Objetivos particulares.....	11
Capítulo 2. Marco Teórico	12
2.1 Celulosa bacteriana	12
2.1.1 Metabolismo bacteriano.....	15
2.1.2 Cristalinidad.....	23
2.1.3 Espectroscopia FTIR de la celulosa bacteriana.....	24
2.2 Nanopartículas de oro	27
2.2.1 Métodos de obtención.....	28
2.2.2 Mecanismo de síntesis de nanopartículas (AuNPs) de oro coloidales por reducción.....	30
2.2.3 Nucleación	32
2.2.4 Teoría de nucleación de LaMer	32

2.2.5 Síntesis Verde de nanopartículas de oro (AuNp's).....	34
Capítulo 3. Desarrollo Experimental	37
3.1 Medio de cultivo para crecimiento de celulosa bacteriana mediante Kombucha	37
3.2 Esterilización de medios de cultivo	38
3.3 Obtención de celulosa bacteriana a partir de medio líquido	38
3.4 Lavado y secado de celulosa bacteriana	40
3.4.1 Materiales para lavado y secado de celulosa bacteriana	40
3.4.2 Lavado de celulosa bacteriana.	40
3.4.3 Secado de celulosa bacteriana.....	41
3.4.4 Síntesis verde para la obtención de nanopartículas de oro.....	42
Capítulo 4. Resultados y discusión	43
4.1 Obtención de membranas de celulosa bacteriana	43
4.2 Peso y grosor de las muestras de celulosa bacteriana	46
4.3 Morfología de la celulosa bacteriana mediante microscopía electrónica de barrido	50
4.4 Espectroscopía FTIR de membranas de celulosa bacteriana	53
4.5 Espectroscopia UV-visible de nanopartículas de oro obtenidas mediante té negro.	60
4.6 <i>Análisis de SEM de compósitos de Celulosa Bacteriana con Nanopartículas de Oro (CB-AuNps).</i>	62
Capítulo 5. Conclusiones	65
Anexo 1.....	67

Anexo 2.....	68
Referencias.....	69

Resumen

En este trabajo se realizó el estudio y la obtención de compósitos de celulosa bacteriana (CB) con nanopartículas de oro (AuNPs). Se usó un consorcio microbiano conocido como Kombucha para la formación de celulosa bacteriana usando medios de cultivo a base de té negro para investigar la cinética de crecimiento usando como fuente de carbono la sacarosa, a su vez, se realizó una variación del porcentaje de sacarosa en 5, 10, 15 y 20 % correspondiente a 50, 100, 150 y 200 (g/l) identificado como lote CB. Se trabajó con otro medio, en el cual, además de variar la sacarosa se añadió cacao identificado como CBCA. Tanto para el lote CB como para el lote CBCA se obtuvieron mayores grosores y pesos durante el crecimiento a medida que se aumenta el porcentaje de sacarosa; por otro lado, en el lote CB obtuvieron membranas sin purificar con pesos entre 6.2 a 12.66 g con grosores de 3.18 a 4.63 mm respectivamente, mientras que en el lote CBCA los pesos van de 7.51 a 16.61 g con grosores de 2.5 a 8.35 mm.

Las muestras secas cuyos pesos y grosores eran similares fueron analizadas con espectroscopia FTIR observándose que conforme se aumentó la sacarosa en el medio de cultivo, se tenía un decaimiento en el índice de bandas de hidrógeno, así como un aumento en el índice del orden lateral, además de que el índice de cristalinidad total también tuvo una tendencia creciente, comparando entre CB y CBCA nos indica que aumenta el porcentaje de celulosa I α aumenta, la cual tiene menos impurezas como hemicelulosa y lignina, que como en cualquier polímero puede reflejar mayores propiedades como flexibilidad, absorción de agua y tolerancia a la temperatura.

Se llevó a cabo la obtención de nanopartículas de oro mediante métodos de síntesis verde, utilizando el té negro *Camelia Sinensis* como reductor. Se realizó una infusión variando en proporciones de 1.0, 0.5, 0.2 y 0.05 % correspondientes a 0.5, 2, 5 y 10 (g/l), obteniendo picos en UV-Vis desde 534 a 568 nm, lo cual sugiere la formación de nanopartículas de oro, debido a la aparición de la banda de resonancia de plasmón superficial longitudinal transversal (TSPR). Además, en la síntesis verde el porcentaje de té resultó ser un factor crucial en la formación de las AuNPs, puesto que en el proceso se deben filtrar las partículas grandes de las hojas, dejando solo partículas pequeñas de los fitoquímicos, indicando que un mayor porcentaje de té implica una mayor cantidad de residuos. Estos hallazgos podrían tener aplicaciones en el desarrollo de nuevos materiales compuestos con propiedades mejoradas para diversas aplicaciones tecnológicas y biomédicas.

Abstract

In this study, bacterial cellulose (BC) composites with gold nanoparticles (AuNPs) were synthesized to investigate their formation kinetics. Variations in the carbon source using sucrose were performed, and the effect of cocoa addition as a nutrient was evaluated. It was observed that increasing the sucrose concentration resulted in thicker BC layers, indicating higher cellulose production by the bacteria. Furthermore, the samples with added cocoa exhibited improved properties compared to those without cocoa.

Additionally, a green synthesis approach was employed for the formation of gold nanoparticles, with variations in the percentage of tea used. It was found that reducing the amount of tea led to a more pronounced luminescence peak, suggesting successful formation of AuNPs. These results indicate that the formation kinetics of BC can be controlled by varying the carbon source, and the addition of cocoa as a nutrient enhances the material's properties. Moreover, the green synthesis proved effective in the formation of AuNPs, with the percentage of tea being a crucial factor for their luminescence. These findings could have implications in the development of new composite materials with improved properties for various technological and biomedical applications.

Palabras clave

Celulosa bacteriana, biopolímero, Nanopartículas de oro, Síntesis verde.

Capítulo 1

Introducción

En la actualidad el desarrollo de equipos electrónicos se ha desarrollado principalmente en diversos tipos de materiales sólidos cristalinos, policristalinos, amorfos, los cuales tienen aplicaciones en los campos de electrónica, optoelectrónica, medicina, óptica, micro óptica, diagnóstico médico, entre otros [1, 2]. En su mayoría los diversos dispositivos son basados silicio cristalino (c-Si) el cual se puede clasificar como material 3D, mediante diferentes técnicas se pueden modificar obleas de c-Si para obtener diferentes nanomateriales 0D (puntos cuánticos, nanopartículas de silicio), 1D (nanohilos de silicio) o 2D(siliceno).

Aunque el silicio cristalino sigue siendo el material dominante en la industria de los dispositivos electrónicos, y sus ventajas están en su rendimiento y disponibilidad; el avance es tal, que ahora la exigencia se enfoca en la miniaturización y en el desarrollo de equipos electrónicos flexibles utilizados en teléfonos celulares, pantallas enrollables, pantallas táctiles, sensores, celdas solares e incluso dispositivos para almacenar energía [3, 4].

En este sentido, los materiales compuestos comparados con el cristalino tienen ventajas; las propiedades mecánicas son superiores, por su mayor resistencia a la tracción y resistencia al impacto; flexibles y elásticas superiores; su conductividad eléctrica también puede ajustarse con nanomateriales o algunos otros materiales y ligeros.

La mayoría de estos materiales (también llamados compósitos), pueden servir de matriz trabajando en conjunto con un material de refuerzo o relleno, usualmente para aumentar la resistencia mecánica, rigidez, conductividad térmica y resistividad eléctrica, entre otros. [5, 6]

Un compósito es un material formado por la combinación de dos o más componentes diferentes, que tienen propiedades distintas y se mantienen separados a nivel macroscópico. Los componentes individuales se conocen como fase matriz y fase dispersa, donde la fase matriz actúa como el material de soporte y la fase dispersa se encuentra distribuida dentro de la matriz. Estructuralmente, es un material con propiedades mecánicas y físicas que se mejoran enormemente en comparación con las propiedades del material por separado.

Los compuestos pueden tener una amplia variedad de formas y configuraciones, como partículas dispersas en una matriz, fibras incrustadas en una matriz, laminados con capas alternas de diferentes materiales, entre otros. La distribución y la orientación de las fases en el material pueden ser controladas durante el proceso de fabricación para optimizar las propiedades deseadas del compósito.

Dado que el compósito es un material formado por la combinación de diferentes componentes, donde uno de ellos puede ser un polímetro (la matriz) y el otro, algún otro material (fase dispersa); entenderemos que los polímeros del griego [polys] "mucho" y [meros] "parte" o "segmento" son macromoléculas, es decir moléculas grandes, mismas que se forman por la unión de moléculas más pequeñas comúnmente conocidas como monómeros; la unión de las macromoléculas permite una gran variedad de microestructuras (por ejemplo, cadenas lineales o ramificadas, redes densamente interconectadas, etc.) [7].

Por otro lado, la IUPAC define polímero como una sustancia compuesta de moléculas caracterizadas por la repetición múltiple de una o más especies de átomos o grupos de átomos (unidades constitucionales repetitivas) unidas a cada uno en cantidades suficientes para proporcionar un conjunto de propiedades que no varíen notablemente con la adición de una o algunas de las unidades constitucionales repetidas [8–10].

Lo polímeros pueden obtenerse de forma sintética (nylon, polietileno, etc.) o natural (celulosa, lana, seda, caucho, etc.); muestran un alta constante dieléctrica y pueden ser considerados como materiales conductores o semiconductores; esto fue observado en 1977 cuando las investigaciones de Hediki Shirikawa, Alan Macdiarmid y Allan Heeger sobre el poliacetileno, reforzaron el concepto de que los materiales orgánicos no necesariamente son aislantes, sino que pueden ser dopados [10].

Asimismo, las investigaciones en polímeros permitieron identificar a la celulosa como un material que contaba con ventajas importantes, era abundante en la Tierra y se encontraba disponible en forma de biomasa y puede ser sintetizada por organismos, como plantas, algas, bacterias o animales [11–16]. Otra ventaja era por sus propiedades químicas, tiene alta resistencia mecánica, es biodegradable y biocompatible. Adicionalmente, puede ser modificado químicamente para alterar sus propiedades haciéndolo compatible con otros polímeros, con los cuales puede mezclarse (polietileno, polipropileno, polyester, y otros) mejorando sus propiedades para otras aplicaciones específicas.

La investigación actual de la celulosa se ha orientado a ampliar el número de aplicaciones y mejorar sus propiedades, en este sentido, existen diferentes tipos de celulosa, a) celulosa nanocristalina, b) celulosa bacteriana, c) celulosa microcristalina y d) celulosa de origen vegetal. Dentro de las más comunes se encuentran las celulosas de origen vegetal como son la madera, el algodón y las plantas; sin embargo, su forma de síntesis hace que existan diversas impurezas y defectos como poca o escasa cristalinidad, una opción a estas limitaciones es la celulosa bacteriana (CB), la cual es una forma de celulosa reportada en la literatura que crece debido a las bacterias pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina*[15, 17]. En particular la bacteria *Gluconacetobacter Xylinus* y sus subgéneros como la *Komagataeibacter xylinus* presentan una amplia habilidad para producir CB[18].

La celulosa bacteriana presenta una estructura única y un alto índice de cristalinidad debido a que está formada por enlaces covalentes entre el carbono 1 y el 4 (β_{1-4}) conformando una cadena lineal; asociadas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, las cuales forman una estructura de microfibrillas (figura 1) [16]. La capa delgada resultante presenta una estructura 3D porosa, de alta cristalinidad, capacidad de absorción de agua, y aislante, debido a estas propiedades puede ser usada en el desarrollo de compósitos de matriz polimérica (CMP) o polímeros conjugados, si es infiltrada por nanopartículas, hojuelas o algún otro relleno conductor o aislante, mejorando sus propiedades físicas, químicas o eléctricas [18–20]. Actualmente se han investigado diversos compósitos de CB asistida por diferentes rellenos enfocados a aplicaciones de electrodos o dieléctricos con posibles aplicaciones a células fotovoltaicas, diodos emisores de luz y almacenamiento de datos, baterías, sensores químicos, biosensores, etc. [20]. Además, la obtención, puede ser a temperatura ambiente, de bajo coste y temperatura de degradación entre 200-300 °C [21–24]

Actualmente, entre los trabajos más importantes de CB usado como electrodo, se han estudiado películas de CB con polipirrol conductor [25–28], óxido de grafeno [29], nanopartículas de oro(AuNPs)[30] o nanotubos de carbono[31], mismos que tienen aplicaciones al desarrollo de supercapacitores flexibles[31– 35].

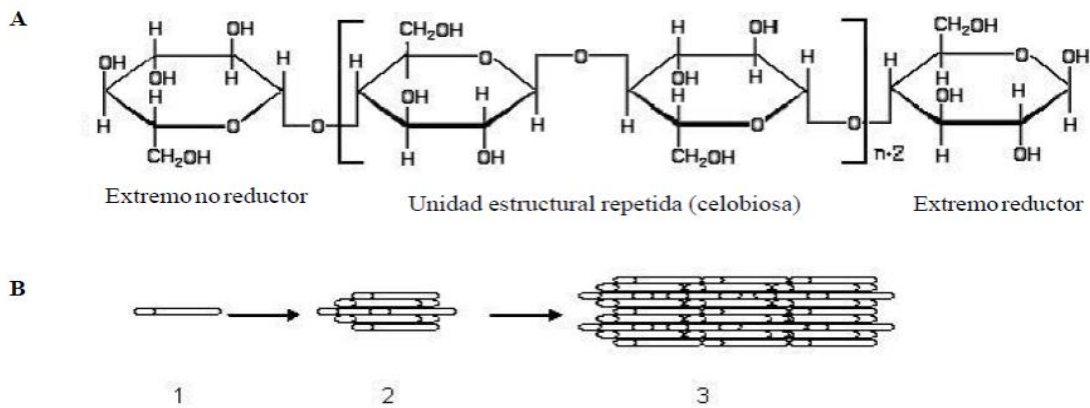


Figura 1. (A) Estructura de la CB. (B) Microestructuras de CB: 1) Cadena lineal de CB, 2) Microfibrilla de CB, 3) Paquete de microfibrillas (Figura obtenida de referencia [6]).

Existen varias posibilidades para producir celulosa bacteriana, las cuales dependen de factores como la escala de producción y disponibilidad de recursos. Dentro de las más comunes, está la de fermentación en laboratorio y cultivo en superficies estáticas, en ésta se busca cultivar las bacterias productoras de celulosa en un medio de cultivo líquido o sólido en condiciones controladas. Se utilizan cepas específicas de bacterias del género *Gluconacetobacter*, como la *Gluconacetobacter Xylinus*. Sin embargo, los protocolos para su preparación y manipulación son muy exigentes dado que se necesita garantizar la calidad y la seguridad en los procesos. Las precauciones y cuidados que deben seguirse son: 1) higiene de laboratorios exhaustiva para evitar la contaminación de los cultivos; (área de trabajo en todo momento estéril, campanas de flujo laminar y ambiente controlado para manipular las muestras) 2) la preparación y manipulación de los medios de cultivo se realiza bajo rigurosas medidas de esterilización y el uso de agua destilada de alta calidad para evitar contaminación cruzada; 3) controlar la temperatura y las condiciones de crecimiento, implicando el uso de incubadoras, así como monitorización de pH y oxígeno, entre los más importantes.

En este estudio, se exploró el uso del kombucha, una bebida fermentada naturalmente, como medio de bajo costo para la producción de celulosa bacteriana. Se investigó la optimización de las condiciones de cultivo, como la concentración de nutrientes y la duración del cultivo, para mejorar el rendimiento y la calidad de las muestras obtenidas. Se espera que sean útiles para su aplicación en diversos materiales, pues dentro de las características puede incluir propiedades mecánicas superiores, biocompatibilidad, capacidad de absorción de agua y capacidad de formar películas delgadas y flexibles.

1.1 Justificación

Los nanomateriales están en el centro de la innovación en diversas disciplinas, desde la medicina hasta la electrónica, comprender cómo las nanopartículas de oro interactúan con la celulosa bacteriana puede abrir nuevas posibilidades en el diseño de materiales avanzados. Actualmente la celulosa bacteriana es aplicada tanto en las industrias del papel, textil, alimentaria, cosmética y la medicina. Las nanopartículas de oro poseen propiedades ópticas y electrónicas únicas a nivel nanométrico, que al combinarlas con la celulosa bacteriana, se pueden lograr compuestos con propiedades aún más destacadas, lo que puede tener implicaciones en áreas como la detección y sensores, además, pueden tener aplicaciones prometedoras en el campo biomédico como, por ejemplo, utilizarse en sistemas de liberación controlada de fármacos, terapias de imagenología o incluso en tratamientos para enfermedades específicas. Esta investigación combina conocimientos en nanotecnología, biotecnología y materiales, fomentando la colaboración entre diferentes disciplinas, lo que puede llevar a avances significativos y al desarrollo de soluciones innovadoras.

1.2 Objetivo General

"El objetivo de esta investigación es explorar rutas de crecimiento de la celulosa bacteriana para obtener membranas con las mejores propiedades, para comprender sus rutas de crecimiento, y posteriormente conjugarlas con nanopartículas de oro sintetizadas mediante un proceso de síntesis verde utilizando té negro como agente reductor, buscando caracterizar exhaustivamente con el fin de evaluar sus propiedades morfológicas, ópticas y sus áreas potenciales de aplicabilidad a biotecnología y semiconductores."

1.3 Objetivos particulares

- **Optimizar el Proceso de Síntesis y Fabricación: de la Celulosa Bacteriana:** Buscar formas de mejorar y escalar el proceso de producción para la celulosa bacteriana considerando factores como la eficiencia, reproducibilidad, economía y amabilidad con el medio ambiente.
- **Evaluar el efecto del Tratamiento con NaOH en la Celulosa:** Mediante este punto se busca evaluar el impacto del tratamiento de la celulosa bacteriana con NaOH 1M en sus propiedades morfológicas y químicas midiendo la variación en la masa y posteriormente evaluar la eficacia del lavado para remover impurezas o residuos.
- **Obtención de Nanopartículas de Oro mediante síntesis verde:** Mediante este paso se busca optimizar el proceso de síntesis verde de las nanopartículas de oro, considerando variables clave como tiempo, temperatura y concentración de reactantes, además, de que se espera ser de bajo coste y amable con el medio ambiente.
- **Obtención de compósitos de Celulosa Bacteriana asistida por Nanopartículas de Oro:** Lo que se busca es investigar la interacción entre la celulosa bacteriana y las nanopartículas de oro, mediante una técnica experimental de deposición In-Situ, analizando posibles cambios en las propiedades de la celulosa después de la interacción con las nanopartículas.
- **Evaluación de Propiedades Físicas, Químicas y morfológicas de las muestras obtenidas:** con este objetivo se determinará las propiedades físicas, químicas y morfológicas de las muestras obtenidas en el trabajo, tanto de la celulosa bacteriana como de las nanopartículas de oro, así como los compósitos CB-AuNp's mediante caracterizaciones ópticas y morfológicas.

Capítulo 2. Marco Teórico

Actualmente el campo para encontrar materiales enfocados al área de los compósitos es amplia, y un material ya trabajado para el área es la celulosa bacteriana, la cual es de enorme interés debido a sus propiedades como alta elasticidad, ya que está compuesta por fibras y aunque es un polímero altamente aislante que puede ser conjugado con diferente tipos de rellenos conductores o aislantes como nanopartículas, nanohilos modificando sus propiedades ópticas, morfológicas y eléctricas entre otros.

2.1 Celulosa bacteriana

En el campo de la investigación hay una diversidad de materiales de amplias aplicaciones, muchos inorgánicos que dejan un exceso de desechos no biodegradables, no solo cuando su vida útil ha terminado, sino inclusive durante su formación, por lo que un área de investigación más amigable con el medio ambiente es el de los biomateriales poliméricos degradables, que aparte de sus ventajas de descomposición son ideales para diferentes áreas gracias a sus propiedades. En los polímeros biodegradables podemos encontrar a la celulosa, referido en trabajos de investigación como el biomaterial más abundante en la tierra, sintetizado principalmente por plantas y bacterias [37], usado en diferentes áreas como la textil, fabricación de papel, biomedicina, entre otros, como se aprecia además de sus propiedades físicas, químicas, es muy versátil porque es un recurso renovable y se puede obtener mucha biomasa. La celulosa es un biopolímero formado a partir de monómeros de β -d-glucosa unidos por enlaces β (1-4), lo cual debido a la naturaleza del enlace cada molécula está girada 180° entre sí, lo cual hace que varias cadenas paralelas se unen mediante puentes de hidrógeno, formando ramificaciones llamadas microfibrillas las cuales a su vez se unen con otras formando fibrillas y formando fibras como se puede ver en la figura 2, razón por la cual los entramados hacen que estas formaciones de fibras sean rígidas e insolubles al agua [38].

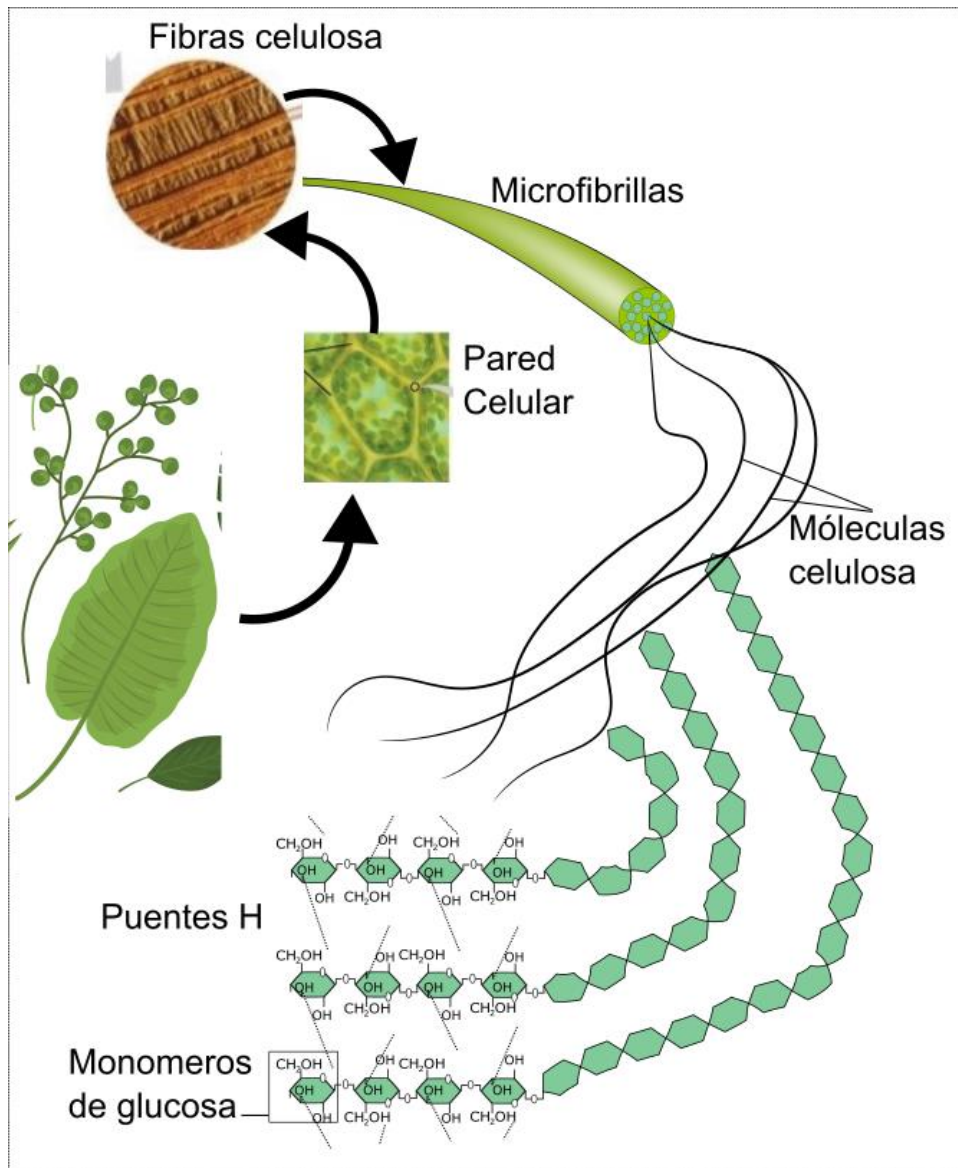


Figura 2. Estructura de celulosa. La celulosa consta de cadenas largas de unidades de β -d-glucosa unidas por enlaces β (1 \rightarrow 4), con unidades alternadas giradas 180 $^\circ$, siendo la celobiosa, la unidad que se repite, además, el polímero forma una cadena lineal. Varias cadenas de celulosa están unidas entre sí para formar una fibrilla de celulosa. La mayor parte de la fibrilla tiene cadenas de celulosa en un orden tridimensional preciso y, por lo tanto, muestra propiedades cristalinas; otras partes son amorfas o no cristalinas.

La celulosa de las plantas cuenta con desventajas, puesto que la pared celular tiene elementos como la hemicelulosa y la lignina, y varía su porcentaje de pureza, comúnmente al estar seca varía de un 40 a 50% de celulosa, 15 a 25% de hemicelulosa, 20 a 25% de lignina y 5 a 10% de otros componentes [39].

Ahora buscando una celulosa abundante con mejores propiedades y un menor tratamiento de purificación se han optado por alternativas como la celulosa bacteriana, un biopolímero con muchas aplicaciones biotecnológicas, muchas en la biomedicina, cosmética, alimentos, electrónica, óptica, entre otros [40], por sus propiedades como alta cristalinidad (60-80 %) [41], alto nivel de pureza en sus microfibrillas [42], biocompatibilidad, biodegradabilidad, resistencia mecánica, alta capacidad de retención de agua y alta modificación química en la biosíntesis. [40], la tabla 1 muestra artículos de crecimiento de celulosa bacteriana con diferentes cepas [112].

Tabla 1. Rendimiento de Celulosa bacteriana para diferentes cepas bacterianas.				
Medio	Cepas bacterianas	Días de incubación	CB producida g/L	Referencias
Glycerol	<i>Gluconacetobacter sp. RKY5</i>	6	4.59	[123]
Caldo de extracto de levadura con glucosa	<i>Acetobacter xylinum K086</i>	7	0.14–0.39	[124]
	<i>Acetobacter xylinum K975</i>		1.11–1.55	
	<i>Acetobacter xylinum K428</i>		0.09–0.22	
	<i>Acetobacter xylinum K1011</i>		0.57–1.46	
	<i>Acetobacter xylinum KX</i>		1.14–1.84	
Glycerol	<i>Acetobacter sp. V6</i>	7	4.98	[125]
Melaza	<i>Komagataeibacter Sucrofermentaris H110</i>	14	8.2 ± 0.2, 8.1 ± 0.2	[126]
Vinaza	<i>Komagataeibacter hansenii C110</i>		9.5 ± 0.1, 9.2 ± 0.1	[127]
Solución de residuos de cítricos	<i>Gluconacetobacter intermedius Cls26</i>	8	7.2	[128]
Medio HS			2.1	
Citricos (Medio HS modificado)			5.7	
Glucosa	<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	2	1.33	[129]
Glucosa (Medio HS modificado)		14	14.72	
Mannitol(Medio HS modificado)		20		
Jugo de cáscara de piña	<i>Gluconacetobacter swingsii</i>	13	2.8	[130]

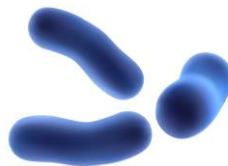
2.1.1 Metabolismo bacteriano

Las bacterias son células procariotas (del griego *pro* "antes ", y *karion* "núcleo") microorganismos que carecen de un núcleo rodeado de membrana. Pertenecen al dominio *Bacteria*, la mayoría en sus paredes celulares contienen peptidoglicano, su forma de reproducción es la fisión binaria, estos organismos pueden ser clasificados en 3 tipos según su forma: cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (bastones rectos o curvos) y espirilos (espirales), con ejemplos que se pueden ver en la figura 3. Los cocos tienen diversas configuraciones, como diplococos, cadenas largas, racimos irregulares, tétradas o sarcinas. Los bacilos presentan variaciones en su longitud, anchura y forma de la punta, pudiendo agruparse en duplas o cadenas después de la división celular. Las espiroquetas son aún más flexibles y poseen una estructura flagelar interna característica, conocida como endoflagelo [45, 46].

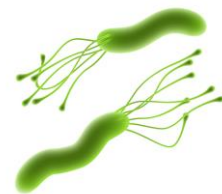
La bacteria más grande hasta el momento es *Thiomargarita* , de diámetros mayores a $500\ \mu\text{m}$, mientras que las más pequeñas están en los grupos filogenéticos, mostrando espiroquetas más delgadas de diámetros de $0,1$ a $0,15\ \mu\text{m}$ y de 5 a $6\ \mu\text{m}$ de longitud [44], otros trabajos ubican el tamaño entre las 0.5 y $3\ \mu\text{m}$, pudiendo llegar en algunos tipos a $10\ \mu\text{m}$ y las bacterias de interés médico oscilan entre 0.4 y $2\ \mu\text{m}$ [45, 46].



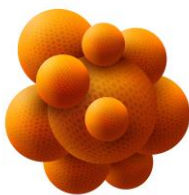
Meningococcus sp.



Lactobacillus sp.



Helicobacter pylori



Staphylococcus sp.



Yersinia pestis



Treponema palidum

(a)

(b)

(c)

Figura 3. (a) Ejemplo de bacterias del tipo coco, es común que este tipo de células existan en pequeños *clústeres*. (b) Ejemplo de bacterias tipo bacilo; es común encontrar flagelos que usan para moverse. (c)Ejemplo de espirilos.

El diagrama en la figura 4 muestra un esquema general de la célula procariota que consta de un nucleoide, citoplasma, Ribosomas, plásmido, una membrana de plasma una pared celular, la cápsula que lo contiene la cual está rodeada tiene un apéndice en la parte inferior llamada flagelo que le permite moverse en medios de cultivos, algunas bacterias también constan de apéndices adicionales denominados fimbrias y pili, estos permiten una adhesión mejor a las paredes del cuerpo que contiene el medio de cultivo, permitiendo una mayor generación de población y supervivencia[48].

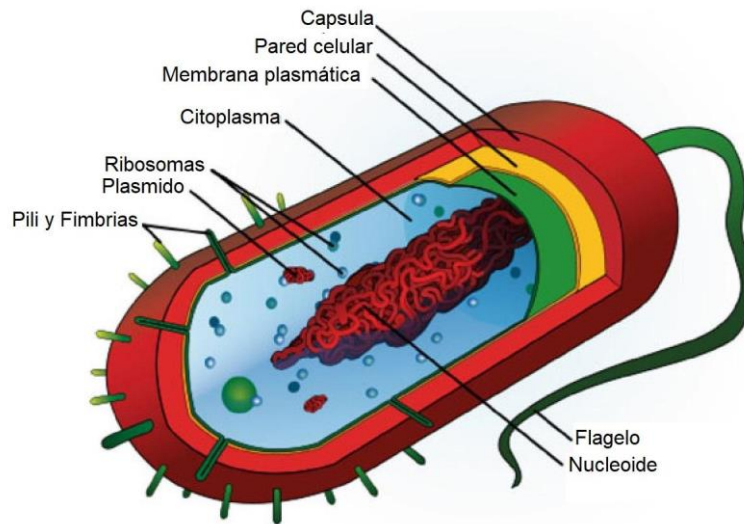


Figura 4. Diagrama de una célula procariota. Imagen obtenida de referencia [48]

La mayor parte de la actividad se da en el citoplasma el cual es un líquido espeso, semitransparente y similar a un gel que reside dentro de la membrana plasmática y contiene orgánulos de membrana, proteínas (principalmente enzimas), carbohidratos, lípidos e iones orgánicos. Aquí se encuentra el nucleoide en el centro, una estructura similar al núcleo de las células eucariotas, generalmente compuesta de una sola molécula de ADN cromosómico circular, compuesta en gran parte por aproximadamente un 60% de ADN, mientras que el resto son proteínas y una pequeña cantidad de ARN, también se aprecian los ribosomas en el citoplasma, donde ocurre la síntesis de proteínas, usando ADN para producir ARN y otros componentes son los plásmidos que transportan genes o metales tóxicos.[49]

Los componentes en el citoplasma están envueltos por una membrana plasmática o celular, compuesta por una bicapa de fosfolípidos incrustada con proteínas que determina qué entra y sale de la célula, separando el interior del entorno exterior. La membrana es selectivamente permeable a iones y moléculas orgánicas

como azúcares y lípidos, facilitando transportar materiales necesarios para sobrevivir. La membrana celular se cubre de la pared celular y es una capa resistente, generalmente flexible, pero a veces bastante rígida, sirve para dar soporte y protección estructural a las células y actúa como mecanismo de filtrado. Su función más importante es actuar como un recipiente a presión, evitando la sobre expansión cuando el agua ingresa a la célula. Las paredes de las células procariotas están formadas principalmente por el material peptidoglicano, el cual consta de unidades disacáridas conectadas por polipéptidos para formar una red, importante en los mecanismos de acción del metabolismo bacteriano. La capa externa llamada cápsula se puede encontrar en bacterias de tipo gram-negativas está compuesto por polisacáridos, pero también puede incluir polipéptidos entre ciertas cepas bacterianas [45, 46].

Clasificando de forma más específica las bacterias, estas pueden distinguirse entre gram-negativas y gram-positivas por su pared celular. La pared celular de las células grampositivas consta de una única capa gruesa de peptidoglicano que rodea la membrana citoplasmática. El peptidoglicano es un polímero que consta de una columna vertebral de residuos alternos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico conectados a cadenas peptídica. La pared celular gramnegativa es más compleja, la capa de peptidoglicano es mucho más delgada y está rodeada por una membrana externa que encierra un espacio periplásmico, que contiene enzimas involucradas en la adquisición de nutrientes, transporte de electrones y protección de toxinas. Por el contrario, las paredes celulares de las arqueas tienen una estructura química variable, que consta de proteínas, glicoproteínas y polisacáridos, pero no contienen peptidoglicano, la figura 5 muestra a detalle las paredes celulares de bacterias gram-negativas y gram-positivas [50].

Pared celular Gram-negativa

Pared celular Gram-positiva

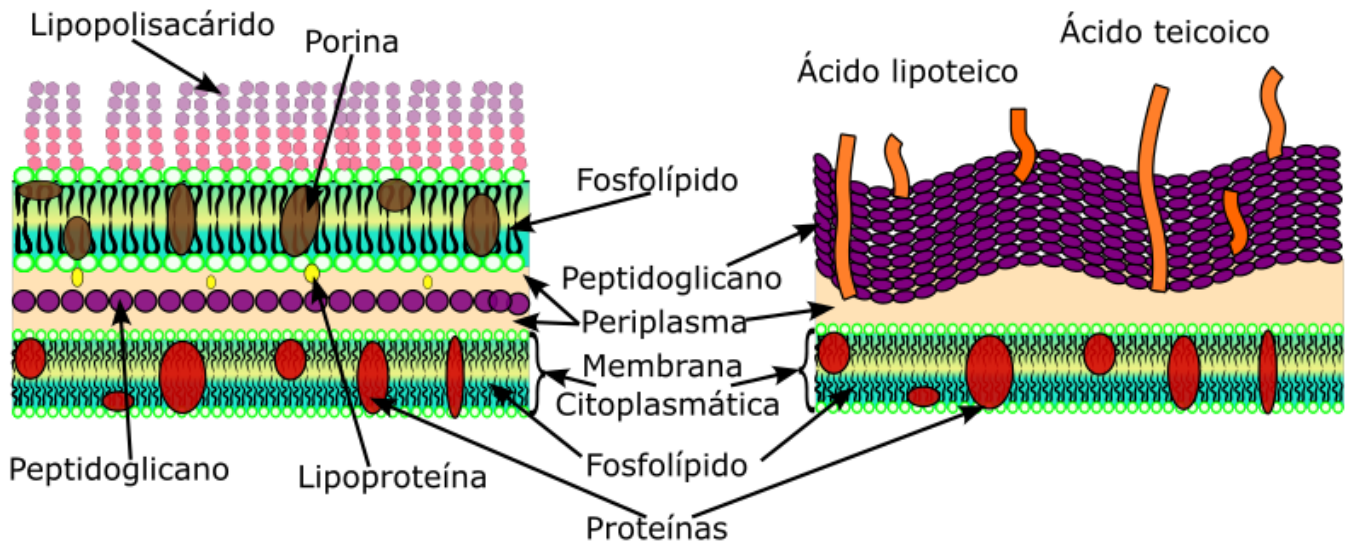


Figura 5. Paredes celulares de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

La reproducción mediante fisión binaria es un método de división celular donde la célula se divide en dos mitades por cualquier plano de división. La célula duplica su tamaño, duplica el material genético y finalmente se divide en dos. En primer lugar, la duplicación del ADN se produce con la ayuda de la acción de proteínas y enzimas. Luego, el ADN se segrega a los polos extremos de la célula para que permanezca intacto durante la división y cada célula recibe un complemento de genes mientras se conserva la alta fidelidad. El sitio de escisión encuentra el ensamblaje del aparato de división que está compuesto por FtsZ que es un homólogo de tubulina eucariota, es decir, es una proteína de división celular clave en la mayoría de los procariontes, una clase de proteínas que forman una estructura anular en el centro de la célula con sus monómeros [51]. Gradualmente, los nuevos materiales de la pared celular se acumulan después de la invaginación de la envoltura celular y se producen dos copias de células idénticas.[52]

La reproducción mediante fisión binaria es caracterizada por la progresión geométrica rigiéndose por la siguiente ecuación [53]:

$$G = t/n \tag{1}$$

Donde G es la tasa de generación, t el tiempo y n es el número de generaciones.

También hay que tomar en cuenta los siguientes parámetros:

B = cantidad de bacterias al inicio de un intervalo de tiempo.

b = cantidad de bacterias al final de un intervalo de tiempo.

$b = B \times 2^n$ (ecuación que describe el crecimiento por fisión binaria), donde la solución para n será:

$$\log b = \log B + n \log 2 \quad (2)$$

Despejando queda

$$n = \frac{\log b - \log B}{\log 2} \quad (3)$$

$$n = \frac{\log b - \log B}{0.301} \quad (4)$$

Finalmente queda

$$n = 3.3 \log \left(\frac{b}{B} \right) \quad (5)$$

Por lo tanto, la solución para G es:

$$G = \frac{t}{n \cdot 3.3 \log (b/B)} \quad (6)$$

La gráfica de la figura 6 muestra cómo es que crece la población de bacterias.



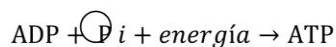
Figura 6. Gráfica de crecimiento poblacional de bacterias. Imagen de referencia [54]

Una vez vista su reproducción y su estructura, es necesario analizar el metabolismo bacteriano, que en este caso tanto reciclan elementos utilizados previamente por otros organismos, como que puede haber bacterias que viven de sustancias inorgánicas, conociéndose como bacterias quimioautótrofas. El término metabolismo designa la totalidad de las reacciones químicas que se producen en un organismo vivo, dado que las reacciones liberan o consumen energía.

En el metabolismo hay reacciones catabólicas, referentes a reacciones químicas reguladas por enzimas que liberan energía, es decir, degradación de compuestos complejos para su conversión en compuestos más simples, mientras que por otro lado están las reacciones anabólicas, las cuales también son reguladas por enzimas, pero en este caso forman moléculas complejas a partir de moléculas simples. De las reacciones catabólicas se obtienen moléculas simples y liberación de energía para darse las reacciones anabólicas. El ejemplo más común es el de la síntesis de ATP (adenosín trifosfato), la molécula productora de energía en las especies conocidas, definiéndose como un nucleótido libre, formado por una base nitrogenada, siendo adenina, un azúcar y tres grupos fosfato en unión éster, es decir, el ATP produce energía ya que su hidrólisis es una reacción exergónica, al liberarse un fosfato inorgánico, la reacción es la siguiente



La energía liberada por reacciones catabólicas se usa para recombinar ADP y P_i obteniéndose ATP:



Las reacciones catabólicas sintetizan ATP mientras las anabólicas degradan ATP, como se muestra en el diagrama de la figura 7.

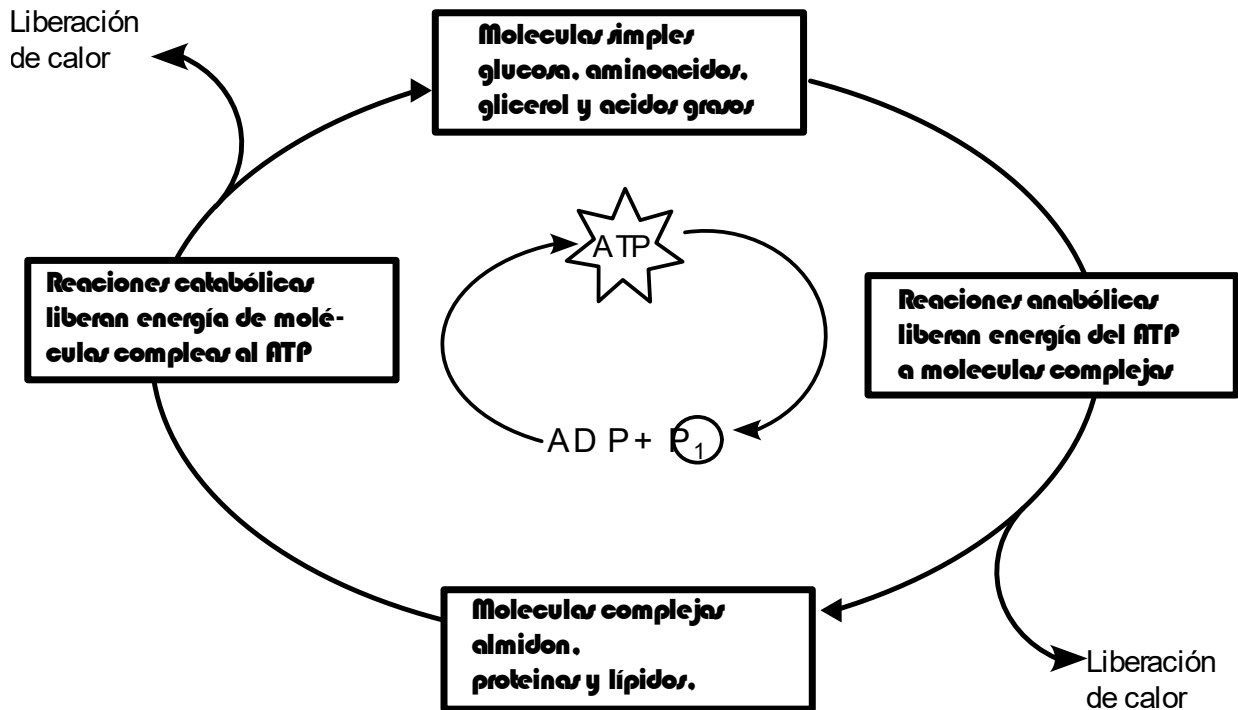


Figura 7. Función del ATP en el acoplamiento de reacciones anabólicas y catabólicas. Gráfica de referencia [55]

Las reacciones hasta ahora analizadas necesitan de enzimas, la mayoría consisten en una fracción proteínica llamada apoenzima y una fracción no proteica llamada cofactor, que si es una molécula orgánica se denomina coenzima, la apoenzima y el cofactor forman una holoenzima, o una enzima completa como se ve en la figura 8, estas actúan sobre una sustancia química denominada sustrato catalizando una sola reacción, por ejemplo, la sacarosa (azúcar de mesa) es el sustrato de la enzima sacarasa. Se obtendría complejo enzima-sustrato denominado la unión temporal de la enzima y los reactivos, que, comparado con reacciones químicas sin enzimas, se reduce la energía necesaria para que haya una reacción, las enzimas se involucran en los procesos de metabolismo y las ribozimas actúan específicamente sobre cadenas de RNA de las que eliminan segmentos para luego empalmar los segmentos residuales.

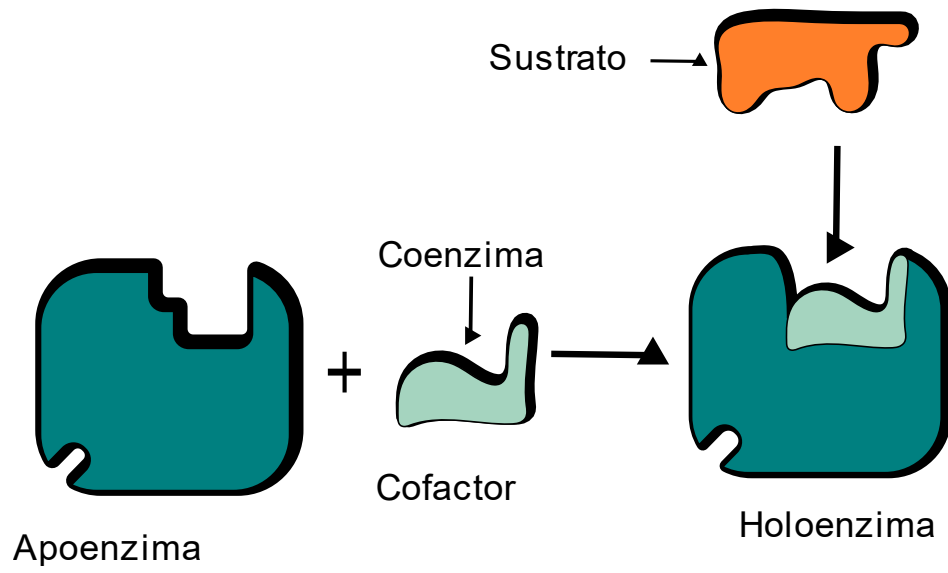


Figura 8. Componentes de una holoenzima. Apoenzima (fracción proteica) + cofactor (fracción no proteica, puede ser un ión metálico o una molécula orgánica) + Sustrato (reactivo sobre el cual actúa la enzima).

2.1.2 Cristalinidad

La cristalinidad de un polímero se refiere al grado en que hay regiones donde las cadenas de polímero están alineadas entre sí [56]. La cristalinidad de la celulosa es una propiedad inherente que gobierna sus propiedades mecánicas, afinidad por el agua y accesibilidad a los reactivos químicos. Dado que la cristalinidad es el resultado del enlace de hidrógeno entre cadenas, los cambios en la cristalinidad reflejan disminuciones o aumentos en este enlace.

Ya que la celulosa bacteriana consiste en una red ultrafina de nanofibras de celulosa (3–8 nm) que están altamente orientadas uniaxialmente [57]. Esta estructura 3D resulta en una mayor cristalinidad (60-80 %) de la celulosa bacteriana y propiedades mecánicas y fisicoquímicas extraordinarias, pero aún se pueden encontrar celulosa amorfa, hemicelulosa y lignina.

La hemicelulosa se compone en su mayoría de azúcares distintos de glucosa, pentosas y hexosas, y están ramificadas y de peso molecular mucho menor que la celulosa. Mientras que la lignina sirve como agente endurecedor dentro de las fibras y como barrera contra la degradación enzimática de la pared celular. Se definen como polímeros de red tridimensional de unidades de fenilpropano [58].

Los dominios cristalinos en BC son limitados y se mezclan con regiones no cristalinas o estructura cristalina polimorfas: en madera, celulosa bacteriana, naturaleza (celulosa I); la celulosa II la sintetizan bacterias o algas. Mientras, la celulosa II-IV se pueden obtener a partir de tratamientos químicos de la celulosa I [59].

La celulosa bacteriana nativa existe en dos estructuras cristalinas diferentes, es decir, celulosa Ia y celulosa Ib siendo esta la más pura pudiendo obtener un módulo de Young de 15 a 35 (GPa), tensión de rotura de 200-300 (MPa)[57].

Estas fibras tienen aproximadamente 200 veces el área superficial de las fibras de celulosa vegetal, debido a la nanomorfología única junto con su capacidad para formar enlaces de hidrógeno que explican sus interacciones únicas con el agua, la celulosa bacteriana puede absorber hasta 200 veces su masa seca de agua. Cuando la celulosa bacteriana se utiliza en suspensión, presenta propiedades espesantes pseudoplásticas.

2.1.3 Espectroscopia FTIR de la celulosa bacteriana

El Índice Total de Cristalinidad (TCI) es una medida que se utiliza para evaluar la cristalinidad de materiales poliméricos, como la celulosa en este caso, mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). El TCI se calcula dividiendo la intensidad del pico a una longitud de onda específica, que está relacionada con la cristalinidad, entre la intensidad de otro pico que no representa la cristalinidad. En el caso de la celulosa bacteriana, se utiliza la relación entre la intensidad en los picos a 1373 cm^{-1} y 2900 cm^{-1} .

El pico a 1373 cm^{-1} se asocia a las vibraciones C-H en las regiones cristalinas de la celulosa, mientras que el pico a 2900 cm^{-1} se relaciona con las vibraciones C-H en las regiones amorfas. Al dividir la intensidad de estos dos picos, se obtiene una relación que refleja la proporción de celulosa en estado cristalino con respecto a la celulosa amorfa. Un valor mayor del TCI indica una mayor cristalinidad en el material.[60]

El Índice de Orden Lateral (LOI por sus siglas en inglés, lateral order index) es otro método utilizado para evaluar la cristalinidad y el orden lateral en la estructura de materiales, como la celulosa, a través de la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

En este caso, el LOI se calcula dividiendo la intensidad del pico a una longitud de onda específica, que está relacionada con el orden lateral en la estructura de la celulosa, entre la intensidad de otro pico que no representa dicho orden. En el contexto de la celulosa bacteriana, el LOI se calcula como la relación entre la intensidad de los picos a 1427 cm^{-1} y 895 cm^{-1} . Hurtubise and Krassig [60, 62].

El pico a 1427 cm^{-1} se relaciona con las vibraciones C-H en los grupos metilo de la celulosa, y su intensidad está influenciada por el orden lateral en la estructura cristalina. El pico a 895 cm^{-1} , por otro lado, no está directamente relacionado con la cristalinidad. Al dividir estas dos intensidades, se obtiene una relación que puede proporcionar información sobre la ordenación de los grupos metilo en la estructura de la celulosa.

El LOI es útil para evaluar la organización molecular en las regiones laterales de la cadena de celulosa, lo que puede contribuir a comprender mejor las propiedades físicas y químicas de este material. Como con otros índices de cristalinidad y orden estructural, es importante considerar que el LOI también debe

interpretarse en otras técnicas de caracterización y análisis para una comprensión completa de la estructura y la cristalinidad de la celulosa bacteriana.

La Intensidad de Bandas de Hidrógeno (HBI por sus siglas en inglés, Hydrogen Bonding Index) es otro índice utilizado en la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para evaluar la cristalinidad y la organización de los grupos hidroxilo en materiales como la celulosa, incluida la celulosa bacteriana.

El HBI se calcula dividiendo la intensidad del pico a una longitud de onda específica, relacionado con las vibraciones de los grupos hidroxilo (OH) que están involucrados en enlaces de hidrógeno, entre la intensidad de otro pico que no representa esos enlaces. En el contexto de la celulosa bacteriana, el HBI se calcula como la relación entre la intensidad de los picos a 3350 cm^{-1} y 1337 cm^{-1} [61]. .

El pico a 3350 cm^{-1} está relacionado con las vibraciones de los grupos hidroxilo -OH, que están involucrados en enlaces de hidrógeno en la celulosa. El pico a 1337 cm^{-1} no está relacionado directamente con estos enlaces. Al dividir las intensidades de estos picos, se obtiene una relación que puede indicar la presencia y la fuerza de los enlaces de hidrógeno en la estructura de la celulosa, lo que a su vez está relacionado con la organización y la cristalinidad del material.

El HBI es una herramienta valiosa para evaluar la interacción de los grupos hidroxilo y la formación de enlaces de hidrógeno en la celulosa, al igual que con otros índices, es importante interpretar los resultados en conjunto con otras técnicas y análisis, los picos que usualmente se estudian se muestran en el espectro FTIR de la figura 9, mientras que en la tabla 2 se muestran los picos usuales y su banda a la que pertenecen según diversos trabajos [62,109].

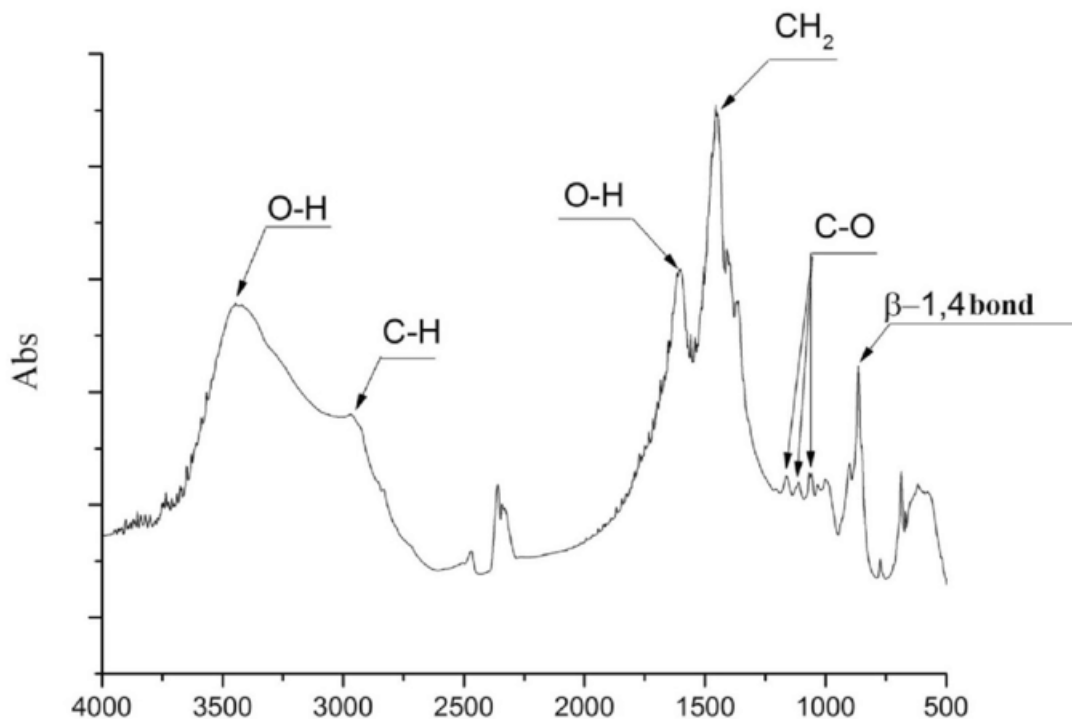


Figura 9. Espectro FTIR Celulosa bacteriana con los picos característicos. [59]

Tabla 2. Grupos funcionales FTIR Celulosa bacteriana.			
Número de onda (cm-1)	Banda (grupo funcional)	Tipo de vibración	Referencias.
3350	OH	Stretching	[131]
2895	C-H simétrica	Stretching	[131]
1724	C=O	Vibración	[131]
1654	OH	Bending	[132]
1506	C=C aromático	Symmetrical stretching	[133]
1423	HCH and OCH in-plane	Bending	[134]
1373	CH en el plano	Bending	[133]
1153	C-O-C asimétrica	Stretching	[132, 135]
1020 - 1030	C-C, C-OH, C-H	Vibración	[132]
994	C-C, C-OH, C-H	Vibración	[134]
895	COC, CCO y CCH	Stretching	[136]
662	C-OH	Bending	[134]
710	Celulosa I α fracción triclinica de celulosa tipo I	Sin dato	[59]
750	Celulosa I β fracción monoclinica de celulosa tipo I	Sin dato	[59]

2.2 Nanopartículas de oro

Los nanomateriales se encuentran en el rango de 1 a 100 nm, sin embargo según el comité científico sobre riesgos para la salud emergentes y recientemente identificados (SCENIHR por sus siglas en inglés SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS) las nanopartículas se pueden clasificar en tres rangos de tamaño: mayores de 500 nm, entre 100 y 500 nm y entre 1 y 100 nm [63]. Dependiendo del tamaño las nanopartículas pueden exhibir propiedades, por ejemplo, si son pequeñas menores o igual al radio de Bohr, las moléculas pueden exhibir confinamiento cuántico, algo mencionado es que las nanopartículas de oro aparecen rojas en solución o coloide, además de que la temperatura de fusión es menor comparada con su forma en bulto. Dependiendo del material, las nanopartículas pueden ser metálicas, dieléctricas, semiconductoras, magnéticas o multiferroicas y se les conoce como coloides al ser dispersadas en agua [64]. Aunque se han obtenido nanopartículas metálicas desde tiempos antiguos con fines estéticos como lo fue la copa de Licurgo [65], se puede decir que se empezaron a estudiar con Michael Faraday en 1857, cuando publicó un trabajo de síntesis de nanopartículas de oro mediante la reducción de una solución de tetracloroaurato de sodio reducido por fósforo en disulfuro de carbono [66, 67], dándose importantes avances en la obtención de nanopartículas de oro mediante el método Turkevich desarrollado en 1951, mejorado por Frens en 1973 [68].

En particular para el tema de la tesis, hay un interés especial en las nanopartículas de oro (AuNPs) las cuales tienen unas propiedades muy generosas, como actividad catalítica, características ópticas y biocompatibilidad [64], lo cual ha cobrado mayor relevancia debido a sus enormes aplicaciones a transistores de efecto de campo [69, 70], transistores de electrón simple [71–73], catálisis [74–76], aplicaciones a la medicina, industria alimentaria, depuración de agua, aplicaciones biológicas, administración de fármacos, la terapia fototérmica y la formación de imágenes, entre otros [77].

2.2.1 Métodos de obtención

Hay muchas técnicas de síntesis de AuNPs, centrándose en el control de su tamaño, forma, solubilidad, estabilidad y funcionalidad, existiendo dos metodologías principales: “Top-Down” (manipulación física) y “Bottom-Up” (transformación química) [64]. La metodología “Top-Down” gira en torno a la fabricación mediante la descomposición de material en bulto o unidades de gran tamaño para lograr estructuras más pequeñas como lo son las nanopartículas cuando se aplica una fuente de energía [78]. La energía puede ser mecánica, química, térmica u otra forma como la irradiación láser. En la ablación láser pulsada (PLA) y la deposición láser pulsada (PLD), la energía es absorbida por el material y se transforma en energía química o térmica para romper los enlaces intermoleculares. Como resultado, se obtienen partículas más pequeñas y suele haber una gran desventaja, pues hay una amplia distribución de tamaños, algo que puede superarse con un haz de iones o litografía, pero eso requeriría que el coste del equipo se elevará [79].

En contraste, la metodología “bottom-up” implica que las estructuras se construyen átomo por átomo o molécula por molécula a través de interacciones covalentes o supramoleculares [78]. El precursor es típicamente un líquido homogénea y partículas de tamaños uniformes y más pequeños diámetros que con metodologías “Bottom-Up” [79]. La figura 10 es un esquema de las metodologías junto con varias técnicas usadas, por lo que en estos temas se explican los métodos del diagrama, más claros existen más técnicas de síntesis de nanopartículas metálicas.

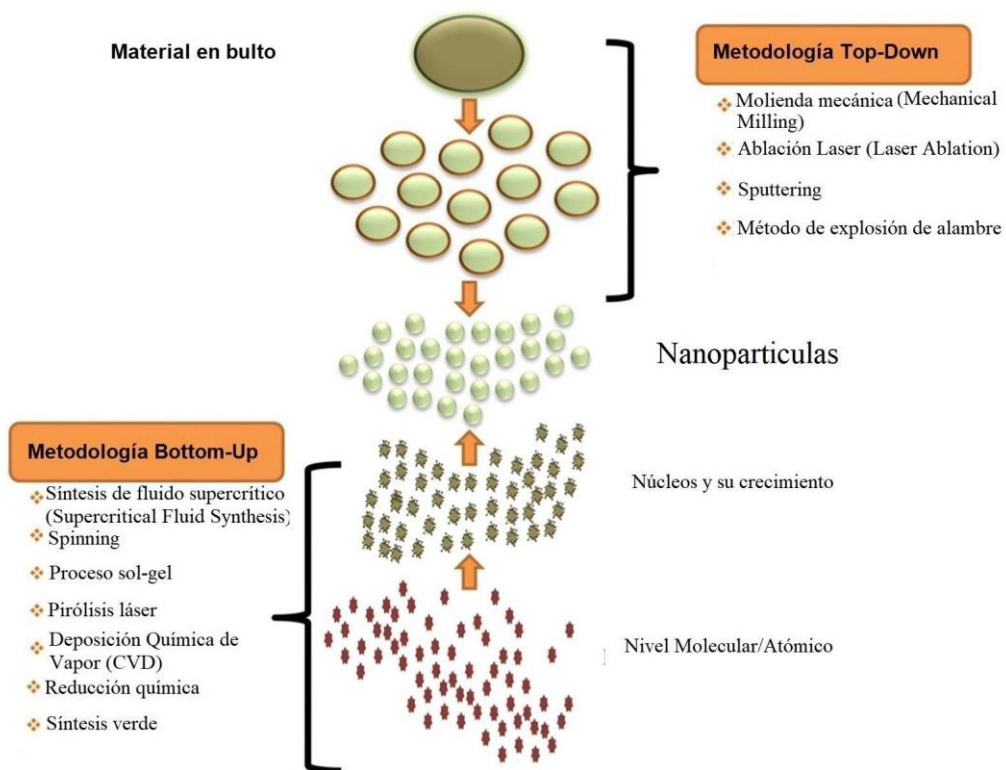


Figura 10. Esquema de metodología Top-Down y Bottom-Up para nanopartículas metálicas. Imagen obtenida de referencia [80]

2.2.2 Mecanismo de síntesis de nanopartículas (AuNPs) de oro coloidales por reducción.

La razón de colocar el tema aparte del método de obtención es debido a que es un tema amplio para analizar a fondo, ya que es el mecanismo de crecimiento que se contempla para la tesis en curso. La figura 12 muestra un diagrama de cómo es que se realiza la reducción química por el método Turkevich, donde la nucleación de iones de oro se realiza mediante la reducción de sales de oro ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$) por un agente reductor, el cual es citrato de trisodio, el cual, además, ayuda a estabilizar la superficie de las nanopartículas, lo que previene la agregación de AuNPs, los diámetros que se pueden obtener se encuentran entre 10 a 20 nm de diámetro además de que este método está limitado por el estrecho rango de tamaño de los AuNP sintetizados, algo que fue mejorado por Frens al variar proporciones de agente reductor [102].

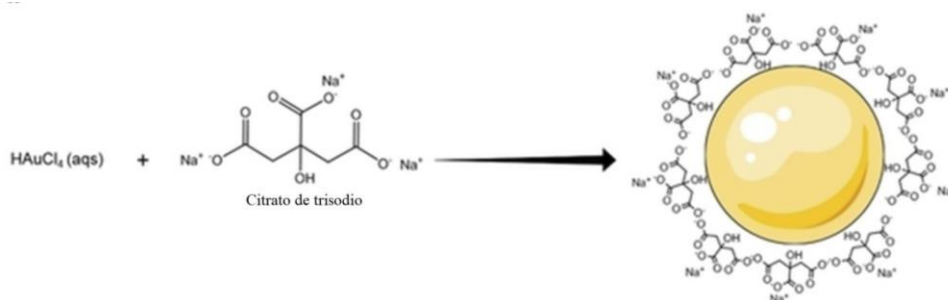


Figura 11. Método Turkevich. Imagen obtenida de referencia [102]

La formación de las nanopartículas metálicas por reducción química se debe a los fenómenos de agregación y coalescencia, además de que el tamaño final depende del aumento de la barrera de agregación con el aumento del tamaño de partícula. El mecanismo general en 3 pasos se puede observar en la figura 13. El paso 1 es la rápida reducción de iones metálicos, donde los átomos se agrupan para formar pequeños *clústeres* como se ve en el paso 2, finalmente en el paso 3 los *clústeres* se juntan por agregación y coalescencia hasta alcanzar un tamaño en el que se estabilizan las nanopartículas

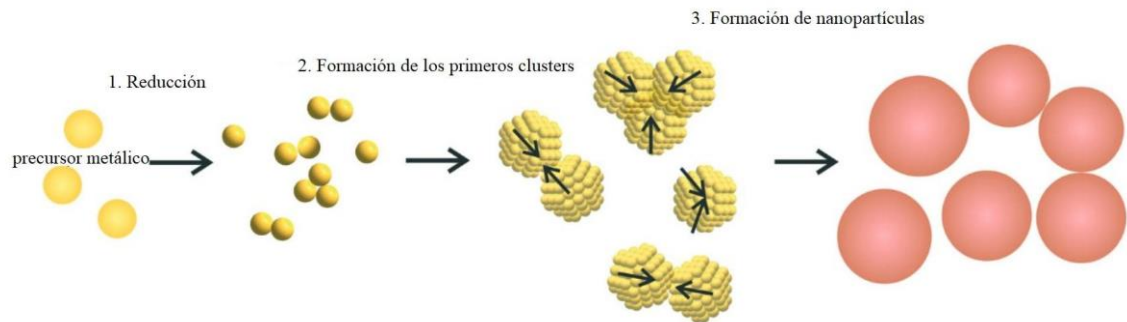


Figura 12. Mecanismo de 3 pasos de crecimiento de nanopartículas debido a la coalescencia. Imagen obtenida de referencia [103]

La figura 14 muestra el diagrama general de una nanopartícula de oro, donde claramente se observa el resultado final de una nanopartícula formada mediante la coalescencia de átomos de oro, formando varias capas, para que no se sigan juntando más átomos de oro, la superficie necesita ligandos orgánicos o tensioactivos, los cuales varían dependiendo del tipo de surfactante, el núcleo metálico determina la dirección cristalina de crecimiento y por lo tanto la estructura predominante [102].

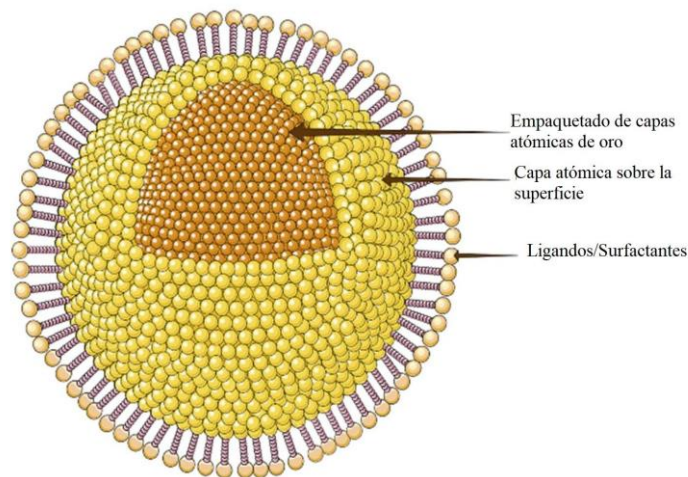


Figura 13. Representación de una partícula de oro obtenida por reducción química. Imagen obtenida de referencia [102]

2.2.3 Nucleación

La nucleación es un modelo puramente termodinámico que describe el proceso del primer paso en una transición de fase de primer orden. Describe la aparición de una nueva fase, el núcleo, en la fase primaria metaestable. La gran mayoría del trabajo teórico disponible sobre nucleación aplicando la termodinámica del equilibrio se basa en la teoría clásica de nucleación desarrollada por Becker y Döring, la cual dice, que un sistema termodinámico tiende a minimizar su energía libre de Gibbs (es decir, la entropía todo el sistema aumenta). Esta teoría termodinámica también fue transferida a procesos de crecimiento de nanopartículas como la teoría de LaMer. El crecimiento posterior a la nucleación se puede explicar a través de diferentes procesos de crecimiento, como el crecimiento limitado por difusión, la agregación o la maduración de Oswald.

La nucleación se divide en heterogénea y homogénea, la que se produce en los sitios de nucleación de superficies sólidas que entran en contacto con el líquido o el vapor se denomina nucleación heterogénea. **Esta** se produce cuando en la formación de nanopartículas en la superficie de las partículas envueltas en la reacción proporcionan sitios de nucleación, que sirven como semillas para la formación. La nucleación homogénea se produce de forma espontánea y aleatoria, requiriendo un estado supercrítico como una sobresaturación.

2.2.4 Teoría de nucleación de LaMer

LaMer y sus colegas en la década de 1950 proponen el concepto de nucleación en ráfagas a partir de su investigación sobre varios aerosoles de aceite e hidrosoles de azufre, en el cual, los núcleos se generan al mismo tiempo debido a la nucleación homogénea y posteriormente crecen sin nucleación adicional, es decir, esta teoría se interpreta como la identificación de una fase homogénea de una heterogénea. El mecanismo se muestra en la gráfica de la figura 15 mostrando los siguientes pasos:

Etapa I (Inducción): la concentración de iones o cationes aumenta y alcanza un nivel crítico de sobresaturación en el que se puede la nucleación homogénea.

Etapa II (Nucleación): La saturación alcanza su máximo pico C_{max} y luego disminuye a C_{min} superando energía de activación para la nucleación, formando los primeros núcleos.

Etapa III (Crecimiento): En esta parte los niveles de saturación caen hasta C_s donde la concentración se mantiene constante, finalizando el período de nucleación, posteriormente los núcleos crecen incorporando iones o cationes de la solución sobre la superficie.

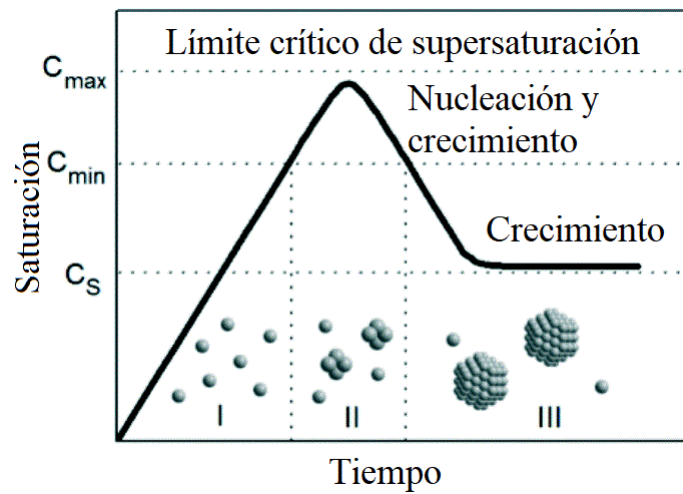


Figura 14. Modelo de nucleación propuesto por LaMer. Gráfica adaptada de referencia [103]

2.2.5 Síntesis Verde de nanopartículas de oro (AuNp's)

Pará la síntesis de nanopartículas de oro (AuNp's) se realizará mediante síntesis verde en la cual haremos énfasis puesto que en cada método para procesar nanopartículas metálicas se tiene una ventaja, sin embargo, en su mayoría deja un exceso de residuos contaminantes al medio ambiente o dan un producto de nanopartículas contaminado que puede requerir de procedimientos para ser biocompatibles.

La síntesis de nanopartículas metálicas mediante extractos de plantas se desarrolla en tres fases principales: la etapa inicial, donde ocurre la reducción de los iones metálicos y la nucleación de los átomos de metal reducido; la fase de activación, donde la agregación facilita la formación de diferentes formas de nanopartículas; y finalmente, la fase de terminación, donde las nanopartículas adoptan la conformación más energéticamente favorable gracias a la estabilización proporcionada por el extracto de planta.

Los metabolitos responsables de esta reducción incluyen terpenoides, ácidos fenólicos, azúcares, alcaloides, polifenoles y proteínas, que desempeñan un papel crucial en la unión y bio-reducción de los iones metálicos. Entre los principales tipos de metabolitos destacan los terpenoides (como el eugenol), flavonoides (como la luteolina y quercetina), aminoácidos como el triptófano y una variedad de fitoquímicos como polifenoles, glutatión, metalotioneínas y ascorbatos.[110]

La síntesis verde se muestra en la figura 11, aquí los extractos pueden ser obtenidos de la naturaleza, como lo son: algas, plantas acuáticas, diferentes tipos de hierbas, hongos, plantas de tierra, levaduras, células humanas, bacterias, probióticos, enzimas, proteínas, vitaminas, entre otros, demostrado producir nanopartículas seguras y no tóxicas de hierro, cobalto, oro, plata, platino, óxido de hierro, óxido de zinc, etc.[99–101]. Dadas las propiedades que se puedan tener se suman a la biocompatibilidad, no solo necesario para dejar menos residuo y a que son de un gran estudio a la medicina y la biotecnología, ya que sirven para biosensores y para diagnóstico y tratamiento de enfermedades. En este trabajo se usó té negro, el cual es conocido por sus fitoquímicos particularmente por los polifenoles (catequinas, antocianinas y ácidos fenólicos) que es un tipo de antioxidante, además de aportar vitaminas B₂, C y E que son compuestos naturales presentes en plantas que han demostrado tener propiedades terapéuticas y antioxidantes.

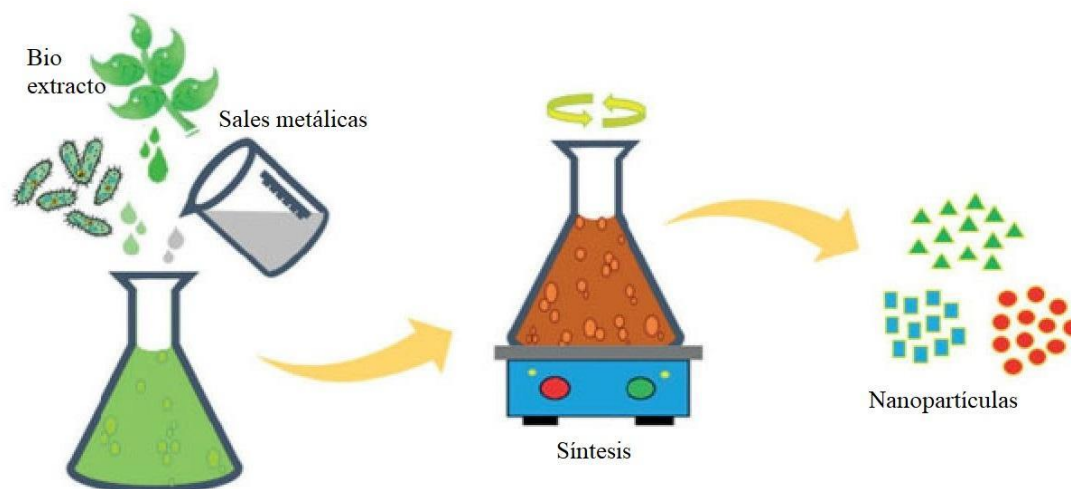


Figura 15. Proceso de reducción química. Figura adaptada de referencia [99].

Este enfoque sostenible y respetuoso con el medio ambiente ofrece múltiples beneficios, como la producción de nanopartículas de oro de alta pureza, menor generación de residuos y la posibilidad de aprovechar las propiedades beneficiosas de los fitoquímicos en las aplicaciones finales de las nanopartículas. Además, la síntesis verde también ofrece la oportunidad de utilizar recursos renovables y promover la economía circular al utilizar subproductos de la industria agrícola, en la tabla 3 se encontrará algunos ejemplos de extractos de plantas [111]. En resumen, el uso de fitoquímicos y la síntesis verde en la producción de nanopartículas de oro ofrece una alternativa más sostenible y abre nuevas posibilidades para desarrollar materiales avanzados con aplicaciones en campos como la medicina, la electrónica y la catálisis.

Tabla 3. Comparativa de diferentes hojas de plantas para la formación de nanopartículas de oro con diferentes tamaños y formas					
Planta	Compuestos reactivos	Sales usadas	Tamaño (nm)	Forma	Referencias
Artemisia vulgaris	Polyphenoles, flavonoides, terpenoides	$HAuCl_4$	50–100	Esfera, triangular, hexagonal	[137]
Clitoria ternatea (Asian pigeonwings)	Alcohol, aminas	$HAuCl_4$	100	varas	[138]

Murraya koenigii Spreng (Hojas de Curry)	quercetin, quercetin-3-glucosida, flavonoides	$HAuCl_4$	20–40	Esfera	[139]
Artocarpus hirsutus (árbol de Yaca)	Polyphenoles, flavonoides, terpenoides	$HAuCl_4$	5–40	Esfera	[140]
Justicia glauca (Thaasi murungai)	Lignans[(+) pinoresinol, (+), medioresinol], alkaloidws, flavonoidws,	$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$	32	Hexagonal, esfera.	[141]
Terminalia arjuna (Árbol de Arjun)	leucoanthocitos-yanidinas,	$HAuCl_4$	20–25	Esfera	[142]
Memecylon umbellatum	polyphenoles, carbohidratos	$HAuCl_4$	15–25	Esfera, triangular, hexagonal	[143]
Mangifera indica	Terpenoides, Flavonoides, Thiamina	$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$	17–20	Esfera	[144]
Oliva	Proteínas, orlopeina, apigenin-7-glucoside,	$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$	50–100	Triangular, esfera,	[145]

Capítulo 3. Desarrollo Experimental

3.1 Medio de cultivo para crecimiento de celulosa bacteriana mediante Kombucha

Se uso como medio de cultivo té negro que está conformado por los reactivos de la tabla 4 como medio de cultivo para crecimiento de CB, el cual ha mostrado buenos resultados en los experimentos realizados mediante el uso de Kombucha.

Tabla 4. Medio de cultivo Té negro	
Té negro	10.0 g/l
Sacarosa	200.0 g/l
Agua destilada	1000.0 ml
Extracto de levadura	10g/l
Peptona	1 g/l

Para crecer la celulosa bacteriana se deben realizar los siguientes pasos:

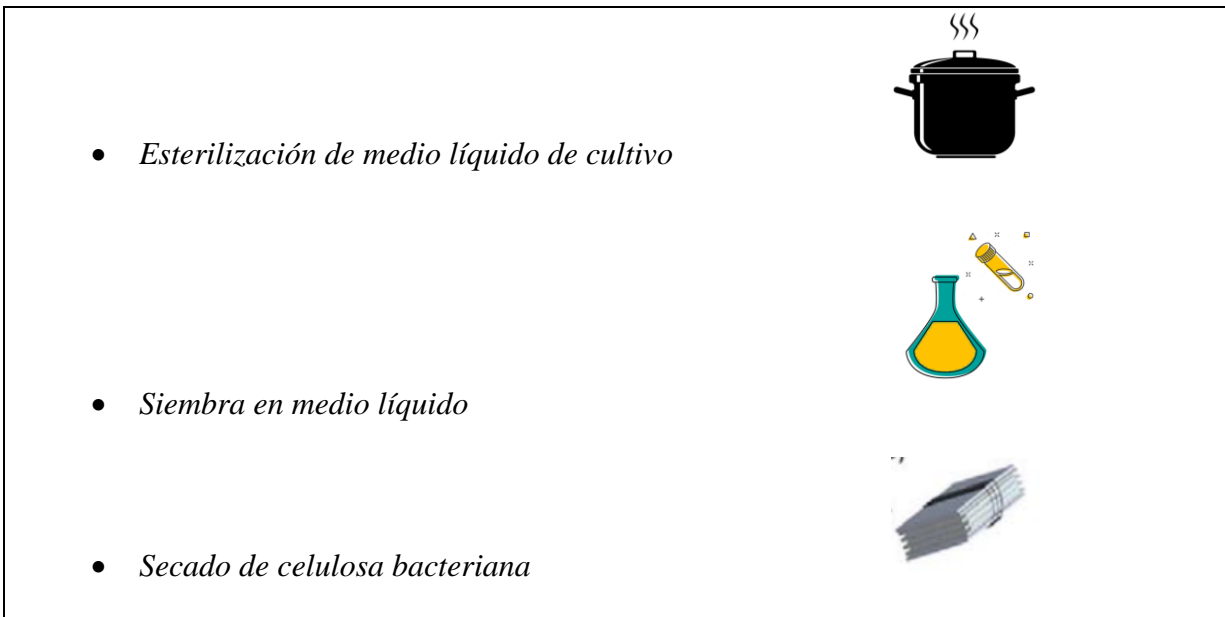


Figura 16. Proceso para obtención celulosa bacteriana.

3.2 Esterilización de medios de cultivo

Es vital esterilizar los medios de cultivo para asegurar la ausencia de organismos no deseados. Para este propósito, se requieren ciertos materiales, como una olla de presión programable 6 en 1 Instant Pot LUX Mini, bolsas de plástico de polipapel y cinta testigo. Cuando se cuenta con los medios de cultivo, que suelen colocarse en matraces Erlenmeyer, se realizan los siguientes pasos. Primero, se introducen los matraces con la mezcla en una bolsa que se cierra adecuadamente y se le coloca cinta testigo. A continuación, se coloca la bolsa con el matraz dentro de la olla a presión programable. Se añade de 750 a 1 litro de agua destilada en la olla y se programa la función de vapor durante 45 minutos a alta temperatura, aproximadamente 110 °C. Al finalizar el ciclo, se abre la puerta de sellado y se retiran los medios de cultivo. Es esencial comprobar que la cinta testigo presenta líneas negras expuestas, indicando la efectividad del proceso de esterilización.

3.3 Obtención de celulosa bacteriana a partir de medio líquido

Los medios líquidos son soluciones acuosas que contienen nutrientes disueltos, utilizados para generar suspensiones con una alta concentración de microorganismos. Estos caldos favorecen el desarrollo bacteriano de células estresadas. EL proceso de obtención de celulosa bacteriana se puede explicar en dos fases, siendo la primera la creación de precultivo, posteriormente se usa el precultivo para el proceso de obtención de celulosa bacteriana que se nos describe en el siguiente diagrama.

Método de obtención de celulosa bacteriana mediante cepa Kombucha
utilizando Té negro como medio de cultivo

Pasos para el precultivo:

1. Preparar una solución de 15 ml de té negro azucarado como medio de cultivo

2. Esterilizar el medio té negro azucarado para garantizar eliminación de organismos no deseados.

3. Añadir 5 ml de té de Kombucha marca Alive a los 15 ml de medio de té negro azucarado

4. Colocar los medios preparados en una incubadora a una temperatura de 26 ± 2 °C durante 7 días. Muestra resultante en la figura 17



Figura 17. Foto de 20 ml del precultivo.

Pasos para el cultivo de celulosa bacteriana:

1. Preparar una solución de 100 ml de medio de cultivo té negro azucarado, variando en 5, 10, 15 y 20 % el contenido de sacarosa correspondiente a 5, 10, 15 y 20 g respectivamente.

2. Esterilizar el medio de cultivo té negro azucarado para garantizar eliminación de organismos

3. Añadir los 20 ml de precultivo al medio de té negro esterilizado.

4. Colocar los medios preparados en una incubadora a una temperatura de 26 ± 2 °C durante 7 días. Medio de cultivo té negro con el inóculo en la figura 18



Figura 18. Foto de cultivo en su primer día.

3.4 Lavado y secado de celulosa bacteriana

3.4.1 Materiales para lavado y secado de celulosa bacteriana

- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Papel cromatográfico o papel filtro
- Caja Petri de vidrio o portaobjetos de vidrio
- Embudo de 100 mm

3.4.2 Lavado de celulosa bacteriana.

Una vez transcurridos los 7 días de crecimiento en el medio líquido, con unas pinzas de teflón estériles se extrae la CB obtenida y se purifica lavándola en 1 Molar de NaOH a 90 °C durante 30 minutos como se observa en la figura 19.



Figura 19. CB lavada a 1 M NaOH a 90 °C durante 30 min.

3.4.3 Secado de celulosa bacteriana

Una vez es lavada la celulosa bacteriana se seca, esta puede obtenerse a diferentes medidas, dependiendo el estudio a realizarse, posteriormente son colocadas encima de hojas de papel filtro, en particular se usaron de marca Eisco Labs, 85 GSM, tamaño de poro de 10 micras y puestas entre dos portaobjetos de vidrio en forma de acordeón como se muestra en a la figura 20, en algunos trabajos antes de realizar el arreglo la celulosa bacteriana se filtra al vacío o mediante gravedad para aumentar la velocidad de secado al disminuir la cantidad de agua.[104].

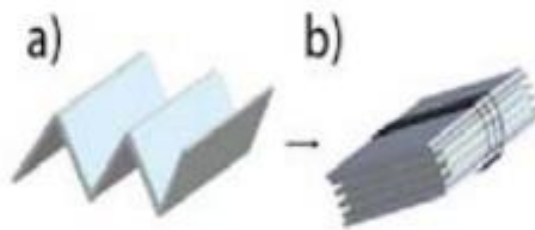


Figura 20. (a) Arreglo de acordeón con papel filtro o cromatográfico. (b) arreglo de celulosa bacteriana húmeda en papel filtro entre dos portaobjetos de vidrio.

Posteriormente la CB se secan a temperatura ambiente, donde las películas son colocadas en configuración de acordeón a temperatura ambiente durante 4 días hasta que se secan completamente [105].

3.4.4 Síntesis verde para la obtención de nanopartículas de oro.

En este método, se utilizó té negro como agente reductor del ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$) en la síntesis de nanopartículas de oro, se probaron diferentes concentraciones de té negro (0.05%, 0.2%, 0.5% y 1%) para evaluar su eficacia en la reducción y estabilización de las nanopartículas. El procedimiento se describe a continuación:

Síntesis Verde de Nanopartículas de Oro.

1. Se calienta 200 ml de agua a 80 °C y se vierte 0.05%, 0.2%, 0.5% y 1% correspondiente a .1, 0.4, 1 y 2 gramos respectivamente de té negro.
2. Se diluye 20 μ l de $HAuCl_4$ en 480 μ l de agua desionizada
3. Se filtra el té negro del paso 1 con papel filtro.
4. Se calienta los 200 ml de té negro hasta llegar a 80 °C
5. Una vez alcanzado los 80 °C se vierte la solución del paso 2 por goteo en el té negro del paso 1.
6. Mantener durante 30 minutos a agitación constante la solución obtenida en el paso 5 y verter en tubos de centrífuga
7. Centrifugar a 9000 rpm a 4°C durante 50 min para precipitar las nanopartículas de oro.
8. Separar con pipeta el líquido acuoso y transparente con pipeta de 1ml, dejando intacto el coloide precipitado en la base del tubo de centrífuga

Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1 Obtención de membranas de celulosa bacteriana

La celulosa bacteriana (CB) es un polímero natural producido por ciertas cepas de bacterias, para el presente trabajo se usó un consorcio microbiano denominado Kombucha, se prepara utilizando un medio de cultivo adecuado que contenga fuentes de carbono, nitrógeno y otros nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano.

La celulosa bacteriana exhibe características morfológicas notables y únicas que la distinguen en el mundo de los biomateriales, su apariencia gelatinosa y tridimensional es evidente en la membrana que la compone, la cual está formada en capas, lo que la convierte en un recurso adaptable a diversas aplicaciones, la característica sobresaliente de la celulosa bacteriana es su capacidad de ser flexible y elástica, una propiedad que le permite ajustarse a diversas formas y usos, desde películas suaves hasta estructuras más robustas y elásticas, su transparencia natural, lo que la convierte en un candidato idóneo para aplicaciones que exijan membranas transparentes y flexibles. La porosidad de la membrana es otro rasgo distintivo, permitiendo el flujo de gases y líquidos a través de ella, para aplicaciones en filtración y otros campos, cuando se observa bajo el microscopio de barrido electrónico (SEM), se revela una microestructura de microfibrillas entrelazadas que subyacen en la celulosa bacteriana, esta disposición microscópica confiere la resistencia mecánica tan inherente a este material.

En el proceso de síntesis de celulosa bacteriana, se realizaron dos lotes, se empleó como formulación de medio de cultivo específicamente diseñada para favorecer el crecimiento y la producción de celulosa, los componentes y sus respectivas concentraciones en el medio fueron los siguientes: té negro en una concentración de 10.0 g/l, proporcionando nutrientes y componentes bioactivos beneficiosos; sacarosa en una concentración de 5, 10, 15 y 20 % correspondiente a 50, 100, 150 y 200 g/l respectivamente, como fuente de carbono para impulsar el crecimiento bacteriano y la producción de celulosa, formando la base del medio; extracto de levadura en una concentración de 10.0 g/l, suministrando nutrientes esenciales como vitaminas y minerales; y peptona en una concentración de 1.0 g/l, una fuente rica en nitrógeno y aminoácidos para promover el desarrollo de celulosa bacteriana y que corresponderá al lote CB, todo

mezclado de manera homogénea en agua destilada la cual es libre de organismos que puedan contaminar el medio de cultivo.

Se realizó el segundo lote CBCA añadiendo cacao en una concentración de 10 g/l, una sustancia adicional poco estudiado en el proceso de síntesis de celulosa bacteriana, enriqueciendo la matriz nutricional y añadiendo compuestos bioactivos, el cacao, con su contenido característico de antioxidantes y nutrientes, puede influir en el crecimiento bacteriano y potencialmente impactar las propiedades de la celulosa bacteriana resultante, como las muestras de la figura 21.



Figura 21. Muestras de celulosa bacteriana crecidas usando té negro como medio de cultivo adicionado con CACAO

Tras el crecimiento de las membranas de celulosa bacteriana para el lote con CBCA y CB, se pasan por una fase crucial de purificación, se someten a un proceso de lavado y limpieza para eliminar residuo de nutrientes, bacterias y otros componentes presentes en el medio de cultivo como las celulosas degradadas, para ello se sumerge en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) con una concentración de 1 molar, y esta solución alcalina actúa efectiva en la eliminación de impurezas y en la purificación de la membrana.

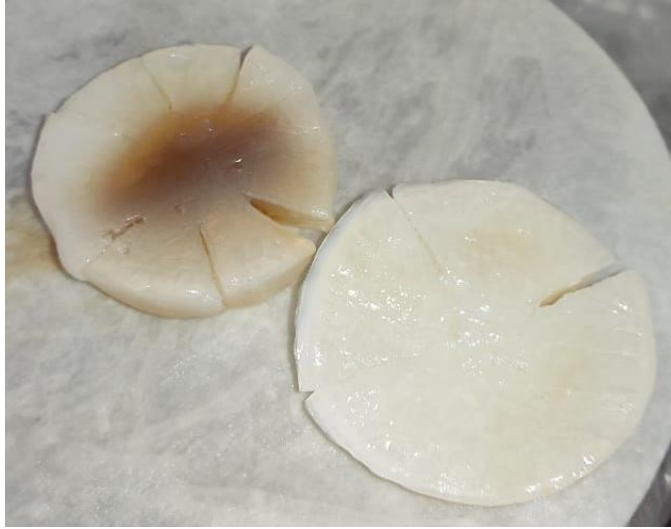


Figura 22. Muestras de Celulosa Bacteriana después de lavado a 1M de NaOH

Una vez completada esta etapa de limpieza, se retira cuidadosamente la membrana de la solución alcalina y se realiza un proceso de secado, que se realiza a temperatura ambiente, permitiendo que la membrana se deshaga de la humedad residual, figura 23. Este proceso de lavado, limpieza y secado es esencial para garantizar que la membrana de celulosa bacteriana esté libre de contaminantes para su posterior empleo.



Figura 23. Membranas de celulosa bacteriana secadas a temperatura ambiente.

4.2 Peso y grosor de las muestras de celulosa bacteriana

Las primeras caracterizaciones se centraron en medir los grosores (figura 24. (a)) y los pesos (figura 24. (b)) de las muestras obtenidas. Estas mediciones resultan cruciales para comprender las propiedades de la celulosa bacteriana producida en diferentes condiciones.

Se observó una relación entre los pesos y grosores de las muestras de celulosa bacteriana y el porcentaje de sacarosa presente en el medio de cultivo. Específicamente, se obtuvo el máximo peso en las muestras con un mayor porcentaje de sustrato, siendo este del 20%. Comparando con los medios de crecimiento sin cacao, se pudo apreciar que las muestras a las cuales se les había agregado cacao presentaban grosores de hasta un 200% mayores. Este podría deberse a que el cacao se conoce por sus altas propiedades debido al su contenido de contenido de teobromina, cafeína y teofilina, fuente de vitaminas como tiamina o B1 y ácido fólico en el extracto de cacao, que aceleran el metabolismo de los microorganismos productores de CB. [113]

Sin embargo, es importante destacar que, al secar las capas de celulosa bacteriana, no se apreció una diferencia significativa en los grosores entre las muestras. No obstante, al realizar análisis más detallados utilizando técnicas como FTIR (Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier) y examinar índices de cristalinidad e índice de celulosa alfa, se pudo observar la contribución y las diferencias en las propiedades estructurales y químicas de las muestras.

El grosor de la celulosa bacteriana influye directamente en sus propiedades mecánicas, como resistencia y elasticidad. Un mayor grosor suele estar asociado con una mayor resistencia y rigidez del material. Estas propiedades son cruciales en aplicaciones donde se requiere una alta resistencia a la tracción, como en la ingeniería de tejidos, la fabricación de biocompuestos y la producción de materiales de construcción sostenibles.

La relación entre el grosor de la celulosa bacteriana y su capacidad para retener agua es un aspecto fundamental que afecta tanto a sus propiedades intrínsecas como a sus aplicaciones prácticas. La celulosa bacteriana es un material biopolimérico producido por ciertos microorganismos, y su estructura altamente organizada consiste en fibrillas entrecruzadas que forman una red tridimensional. Esta estructura da a la celulosa bacteriana propiedades únicas que la hacen valiosa en investigación y desarrollo.

La estructura porosa es una característica distintiva de la celulosa bacteriana. Esta porosidad está relacionada directamente con el grosor del material. Cuanto mayor sea el grosor, mayor será la cantidad de espacio poroso disponible. Esta porosidad y la gran superficie específica resultante son esenciales para su capacidad de absorción y retención de agua. Los poros actúan como sitios de almacenamiento de agua, permitiendo que el material absorba y retenga cantidades significativas de líquido en comparación con otros materiales. Además, la estructura porosa también facilita la circulación de agua a través del material, lo que contribuye a una absorción y distribución uniforme.

La capacidad de retención de líquidos de la celulosa bacteriana la hace valiosa en una amplia gama de aplicaciones. En productos absorbentes, así como para mantener la sequedad y comodidad. En materiales de filtración, la celulosa bacteriana puede atrapar partículas y contaminantes debido a su estructura porosa, permitiendo una purificación eficaz del agua o el aire. En campos como la bioingeniería y la biomédica, la capacidad de la celulosa bacteriana para retener agua es especialmente útil para mantener un ambiente húmedo en cultivos celulares o heridas lo que promueve la cicatrización y el crecimiento celular. [114-116]

Además de su capacidad para retener agua, la celulosa bacteriana también presenta propiedades biocompatibles, biodegradables y mecánicas adecuadas para diversas aplicaciones. Su versatilidad y la posibilidad de ajustar su grosor y porosidad mediante técnicas de fabricación ofrecen oportunidades emocionantes para la innovación en áreas como la medicina regenerativa, la ingeniería de tejidos y la fabricación de dispositivos médicos.

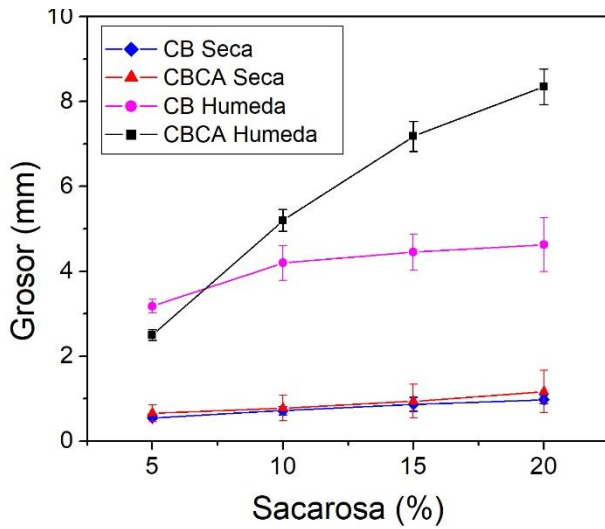
El grosor de la celulosa bacteriana es esencial en la determinación de su volumen y en su capacidad de carga y retención. Un mayor grosor implica que la celulosa bacteriana puede acumular una mayor cantidad de material por unidad de área superficial. Esta propiedad tiene implicaciones significativas en una serie de aplicaciones donde la capacidad de carga y la retención son factores críticos.

En los sistemas de liberación controlada de fármacos, el grosor de la celulosa bacteriana es un factor determinante para la cantidad de fármaco que puede incorporarse y liberarse gradualmente. Un mayor grosor permite una mayor carga de fármacos, lo que puede ser beneficioso en situaciones donde se mantiene una liberación sostenida y controlada de sustancias terapéuticas. La estructura porosa de la celulosa bacteriana actúa como una matriz que retiene los fármacos y permite su liberación gradual a medida que el material se descompone. . [115-116]

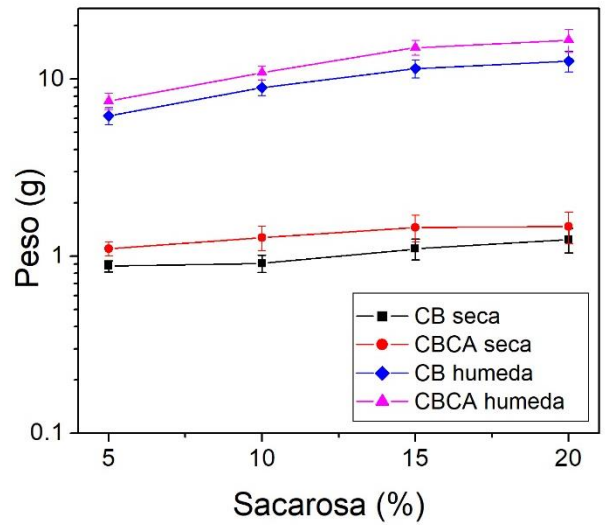
En aplicaciones de cultivos celulares e ingeniería de tejidos, el grosor de la celulosa bacteriana es un aspecto importante en la creación de sustratos para el crecimiento y la proliferación celular. Más material da un entorno más tridimensional y semejante al tejido, lo que puede ser beneficioso para el cultivo de células. La celulosa bacteriana puede actuar como un andamio para el crecimiento celular y la formación de tejido, y un mayor grosor brinda más espacio para que las células se adhieran, se multipliquen y se diferencien.

En el campo de los biosensores, la capacidad de carga de la celulosa bacteriana puede ser aprovechada para inmovilizar biomoléculas, como enzimas o anticuerpos, en su superficie. Esto permite la detección específica de analitos en muestras. Un mayor grosor proporciona una mayor área de superficie para la inmovilización de biomoléculas, lo que puede mejorar la sensibilidad y la capacidad de detección del biosensor. [117-119]

La diferencia de peso en la celulosa bacteriana durante el proceso de secado es de gran importancia y tiene varias implicaciones clave y está directamente relacionada con la eliminación de la humedad presente en la celulosa bacteriana. La determinación precisa del contenido de humedad es fundamental en muchas aplicaciones, ya que la presencia de agua puede afectar las propiedades físicas y químicas del material, también está relacionada con la estabilidad dimensional de la celulosa bacteriana, durante el secado, el agua se evapora y la estructura de la celulosa bacteriana puede experimentar cambios en su volumen y forma. La eliminación adecuada de la humedad por el secado controlado puede minimizar la contracción o expansión no deseada de la celulosa bacteriana, esencial para mantener la integridad y la forma deseada del material en aplicaciones específicas.



(a)



(b)

Figura 24. Gráfica (a) Grosor vs Porcentaje de sacarosa, (b) Peso vs porcentaje de sacarosa de las muestras de celulosa bacteriana sin purificar a los 7 días de crecimiento.

El contenido de humedad residual puede influir en la densidad, porosidad, resistencia, rigidez y otras características del material. Además, el secado adecuado puede influir en la estructura cristalina de la celulosa y en la organización molecular, lo que a su vez puede afectar sus propiedades químicas y su reactividad en diversas aplicaciones.

En resumen, la diferencia de peso durante el secado de la celulosa bacteriana es importante debido a su relación con el contenido de humedad, la estabilidad dimensional, las propiedades físicas y químicas, y los procesos posteriores. Controlar y medir adecuadamente esta diferencia de peso es esencial para garantizar la calidad, la estabilidad y las propiedades deseadas de la celulosa bacteriana en una amplia gama de aplicaciones.

4.3 Morfología de la celulosa bacteriana mediante microscopía electrónica de barrido

Las micrografías SEM de la figura 25 muestran una visión detallada de la morfología característica de las muestras de celulosa bacteriana obtenidas mediante la metodología de cultivo estático. Al examinar las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, se desvela una estructura visualmente impresionante y distintiva en las membranas de celulosa bacteriana.

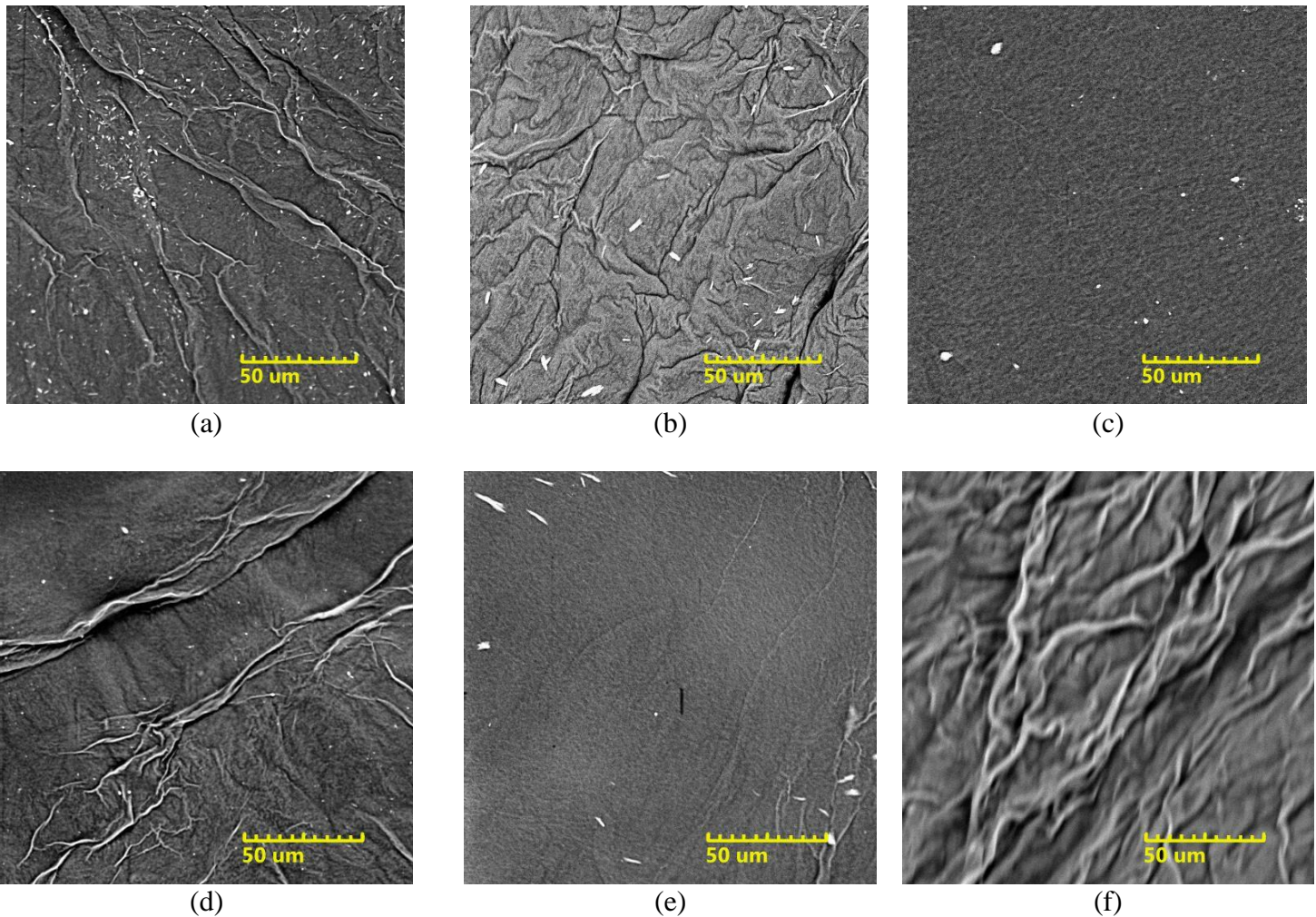


Figura 25. Micrografías SEM de grupo CB con sacarosa a (a) 5%, (b)15% y (c) 20%, grupo CBCA con sacarosa a (d) 5%, (e)15% y (f) 20%

El análisis de las micrografías SEM se realizó mediante el software ImageJ revelando una red altamente compacta de fibras entrelazadas, que se sitúan en un rango de 1,3 a 3,8 micrómetros, según muestra los histogramas de la figura 27, acercándonos y usando la escala en las micrografías como se muestra en la

figura 26, se alcanza a notar lo que se considera es el ancho de las fibras. Esta variedad de diámetros resalta la naturaleza heterogénea de la estructura que se desarrolla durante el cultivo estático.

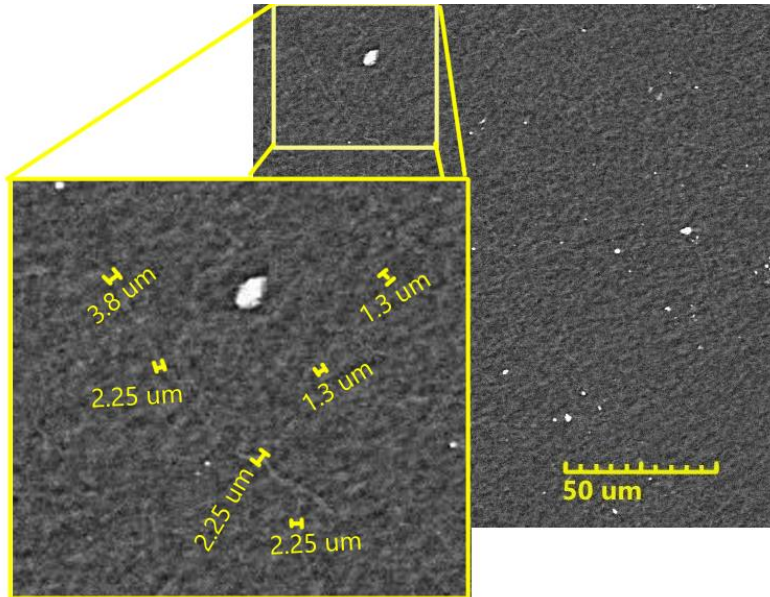
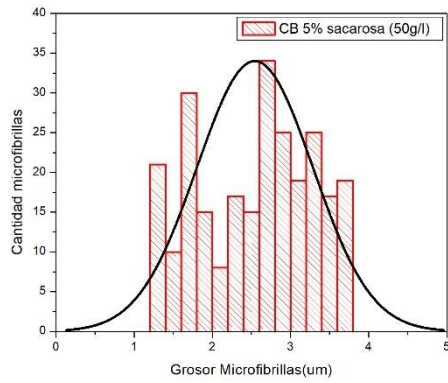


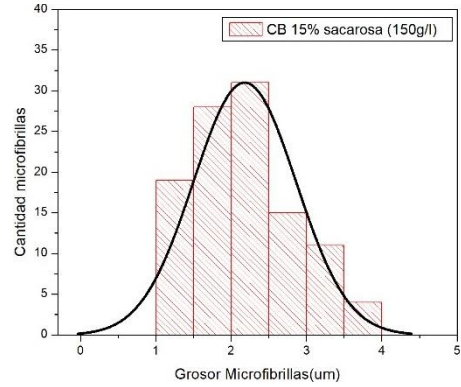
Figura 26. Micrografía SEM de grupo CB con sacarosa a 20%, realizando un zoom donde se muestra cómo se realizaron las mediciones para obtener el diámetro de las microfibrillas de CB.

Estas fibras forman una estructura entrelazada que es típica de las microfibrillas de celulosa formadas bajo condiciones de cultivo estático. La disposición densa de estas fibras es una característica típica de las microfibrillas de celulosa generadas bajo condiciones de cultivo estático. La trama de fibras, tejida de manera tan compleja, es responsable de muchas de las propiedades excepcionales de la celulosa bacteriana, incluyendo su capacidad para retener agua y otros materiales. Muchas de estas microfibrillas están conectadas entre sí mediante puentes de hidrógeno, lo que contribuye a la formación de una estructura de red compacta durante su crecimiento [24].

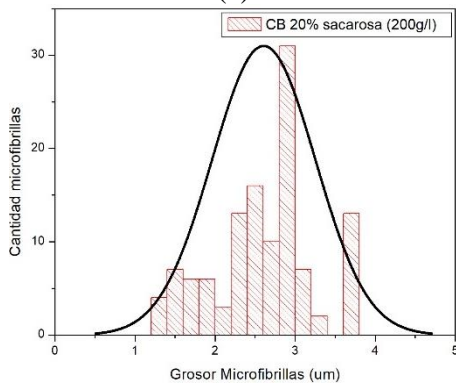
Es interesante destacar que no se observan diferencias morfológicas significativas, esto sugiere que las muestras se mantienen estables y no se ven afectadas por cambios en el contenido de sacarosa. Esta apariencia rugosa se debe a la presencia de compuestos antioxidantes y nutrientes en el té negro y el cacao. Durante la síntesis de la celulosa bacteriana, las moléculas de CB se secretan fuera de la superficie celular por poros durante el crecimiento celular, además de mostrar una apariencia característica de una red densa de fibras interconectadas.



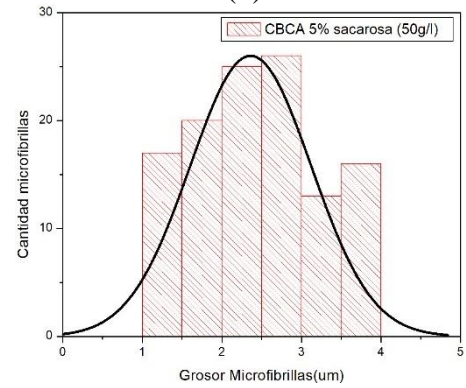
(a)



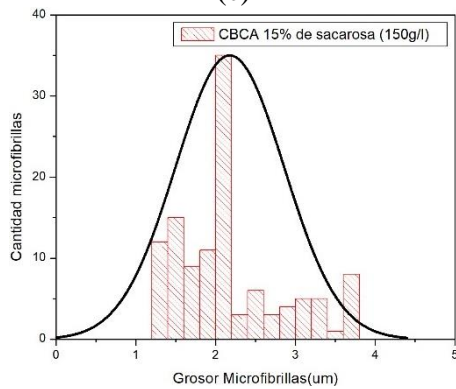
(b)



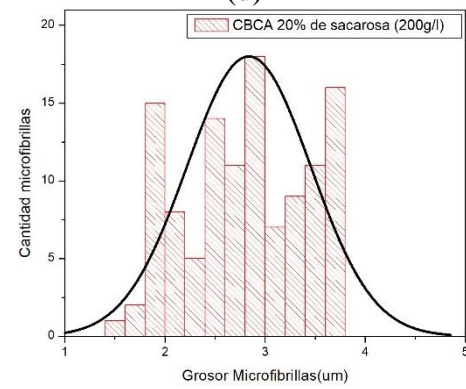
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 27. Histograma de distribución de grosor de microfibrillas de grupo CB con sacarosa a (a) 5%, (b)15% y (c) 20%, grupo CBCA con sacarosa a (d) 5%, (e)15% y (f) 20%

4.4 Espectroscopía FTIR de membranas de celulosa bacteriana

En las gráficas de la figura 28 (a) se ve el espectro FTIR de Celulosa bacteriana usando té negro como medio de cultivo líquido y en la figura 28 (b) el espectro FTIR de las muestras a las que se les añadió CACAO en el cultivo, todas secadas a temperatura ambiente.

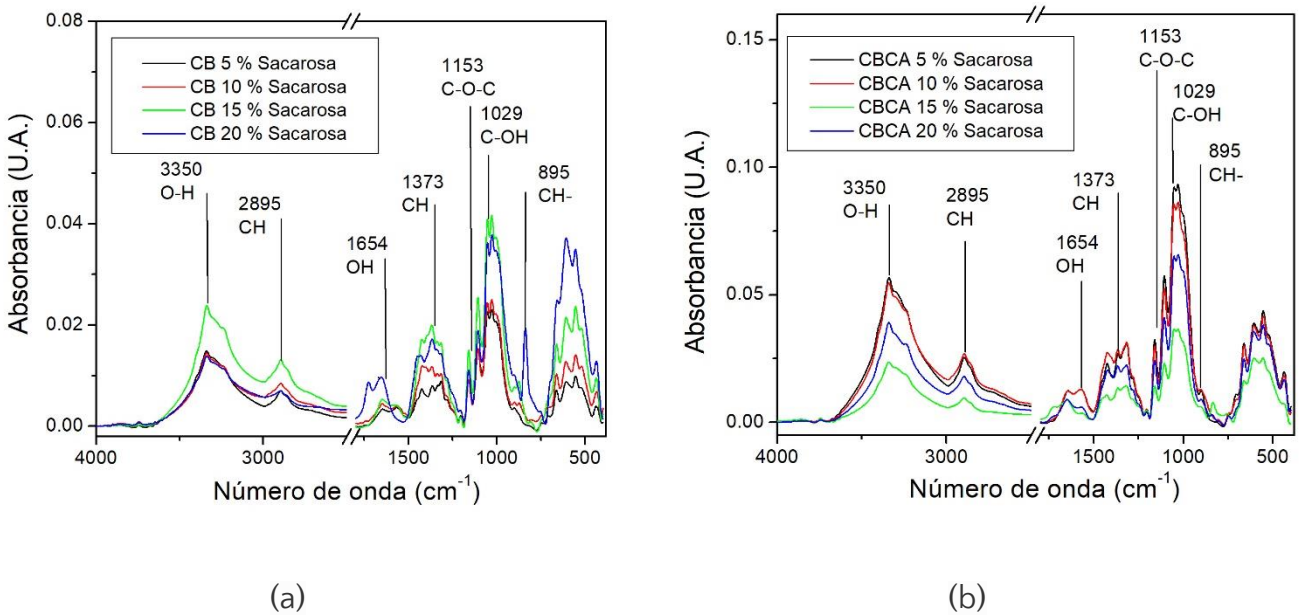


Figura 28. Espectros FTIR de muestras de celulosa bacteriana (a) lote CB, (b) lote CBCA.

A partir de las mediciones de FTIR se obtienen los índices relativos de cristalinidad. Un índice de cristalinidad (CI) es la relación entre la intensidad de un pico relacionado con la cristalinidad y un pico que no representa la cristalinidad dentro del mismo espectro. De los cuales se tiene el índice Total de cristalinidad (TCI) que es la razón de la intensidad de la longitud de onda 1373 cm^{-1} y la intensidad a 2900 cm^{-1} . [60] Intensidad de bandas de Hidrógeno (HBI) que es la razón de las intensidades en el pico 3350 cm^{-1} y el pico 1337 cm^{-1} . [61] y el índice de orden lateral (LOI) que es la razón de intensidades en las longitudes de onda 1427 cm^{-1} entre 895 cm^{-1} . Hurtubise and Krassig [60, 62].

El espectro FTIR de la celulosa bacteriana presenta varias bandas de absorción que proporcionan información sobre su estructura y composición. En primer lugar, una banda en 3340 cm^{-1} se atribuye a los

modos de vibración de extensión de los grupos O-H. Esta banda indica la presencia de enlaces de hidrógeno y la existencia de grupos hidroxilo en la celulosa bacteriana.

Por otro lado, el pico en la banda en 2895 cm^{-1} se origina a partir de los modos de vibración de extensión de los grupos C-H en la membrana de celulosa. Esta banda indica la presencia de enlaces de carbono-hidrógeno en la estructura de la celulosa bacteriana.

El pico en la banda en 1726 cm^{-1} está relacionada con los modos de vibración de extensión del carbonilo que pertenece al grupo aldehído. La presencia de esta banda sugiere la existencia de grupos aldehído en forma de hemiacetal, acetal y/o hidrato en la celulosa bacteriana.

La intensidad de banda en 1651 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de deformación de los grupos O-H de la molécula de agua. Esta banda indica la presencia de agua absorbida en la celulosa bacteriana.

Además, diferentes bandas de absorción en el rango espectral de $1600\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ son sensibles a transformaciones químicas y estructurales. Por ejemplo, las intensidades en las bandas observadas en 1564 , 1427 , 1371 , 1337 y 1313 cm^{-1} son relevantes para determinar los índices de cristalinidad de las muestras de celulosa bacteriana. La intensidad de estas bandas puede proporcionar información sobre el grado de ordenamiento de las cadenas de celulosa y las transformaciones químicas que pueden haber ocurrido en el material.

Además de lo mencionado anteriormente, en el espectro FTIR de la celulosa bacteriana se pueden identificar otras bandas de absorción que brindan información adicional sobre su estructura y composición. Por ejemplo, las bandas de absorción en 1159 , 1107 y 1028 cm^{-1} están asociadas con los modos de vibración de extensión C-O/C-H de los azúcares presentes en la celulosa y los modos de vibración de extensión C-O-C de los enlaces glucosídicos β -(1, 4) entre los azúcares. Estas bandas indican la presencia y la forma en la que los azúcares se encuentran unidos en la estructura de la celulosa bacteriana.

Adicionalmente, la banda de absorción en 895 cm^{-1} también es característica del enlace glucosídico β -(1, 4) presente en la celulosa. Esta banda confirma la presencia de enlaces glucosídicos específicos en la estructura de la celulosa bacteriana.

En cuanto a las bandas de absorción en 750 y 710 cm^{-1} , estas bandas están relacionadas con las fracciones triclinica ($I\alpha$) y monoclinica ($I\beta$) de la celulosa de tipo I. La presencia de estas bandas en el espectro FTIR indica la existencia de diferentes formas cristalinas de celulosa en la estructura de la celulosa bacteriana.

En el caso de las membranas CBCA, se observaron bandas de absorción similares a las de CB, aunque con diferentes intensidades de absorción entre ambos tipos de membranas. Esto sugiere que las membranas CBCA presentan características estructurales y composicionales similares a las membranas de celulosa bacteriana convencionales, pero con algunas variaciones en la intensidad de las bandas de absorción, lo que puede indicar diferencias en la estructura o en la interacción de los componentes en las membranas. Estas variaciones podrían ser atribuidas a factores como la presencia de aditivos o modificaciones en la preparación de las membranas CBCA.

El análisis del índice de cristalinidad total (figura 28. a), muestra que, a mayor sustrato, es decir, sacarosa, mayor, cristalinidad, correlacionando con los resultados anteriores indica también mayor grosor, aunque menor HR [%], también nos indica que las muestras a las que se les adiciono CACAO cuentan con mayores IC, esto es un indicador de mayor calidad, por lo cual se puede decir que esto es debido a las vitaminas proporcionadas como B1, B2, etc. [113]

El índice total de cristalinidad (TCI) se puede analizar mediante el análisis del espectro FTIR de la celulosa bacteriana. El TCI se calcula utilizando la relación entre las intensidades de dos bandas específicas: una en 1371 cm^{-1} y otra en 2895 cm^{-1} , según propuesto por Nelson y O'Connor en 1964 [28].

La Figura 29(a) muestra cómo el TCI aumenta a medida que se incrementa la concentración de sacarosa en el rango del 5% al 20%. Este aumento sugiere un incremento en la cristalinidad o en el grado de regularidad intermolecular en la celulosa bacteriana. Conforme se añade más sacarosa al medio de cultivo para producir la celulosa bacteriana, se observa mayor cristalinidad en el material resultante.

Es interesante destacar que, en el caso del lote CBCA que es la celulosa bacteriana de Kombucha preparada con *Theobroma cacao*, se obtuvo un TCI ligeramente superior al de la celulosa bacteriana de Kombucha convencional (lote CB), alcanzando un valor del 13% para una concentración de sacarosa del 20%. Esto podría atribuirse al contenido de vitaminas y ácido fólico presentes en el extracto de cacao, los cuales

podrían acelerar el metabolismo de los microorganismos productores de celulosa. Estos compuestos bioactivos adicionales podrían influir en la formación y organización de la estructura cristalina de la celulosa bacteriana, lo que se refleja en un mayor TCI.

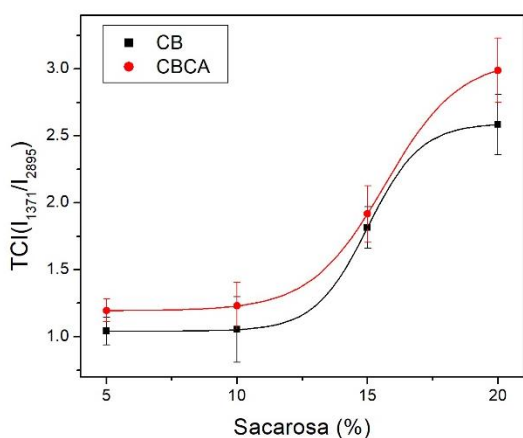
Otro parámetro estructural importante es la intensidad de los enlaces de hidrógeno (HBI), que proporciona información sobre la cantidad y la fuerza de los enlaces de hidrógeno presentes en la celulosa bacteriana. Este parámetro se puede estimar mediante el cálculo de la relación entre las intensidades de dos bandas específicas en el espectro FTIR: una en 3340 cm^{-1} y otra en 1337 cm^{-1} .

La Figura 29(b) muestra que el HBI disminuye a medida que aumenta la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Esta disminución indica que la cristalización de la celulosa aumenta de manera inversamente proporcional a la cantidad de agua (hidrógeno) ligada en el material. En otras palabras, a medida que se agrega más sacarosa al medio de cultivo, se reduce la cantidad de agua ligada a la celulosa bacteriana, lo que favorece la formación de estructuras cristalinas más ordenadas.

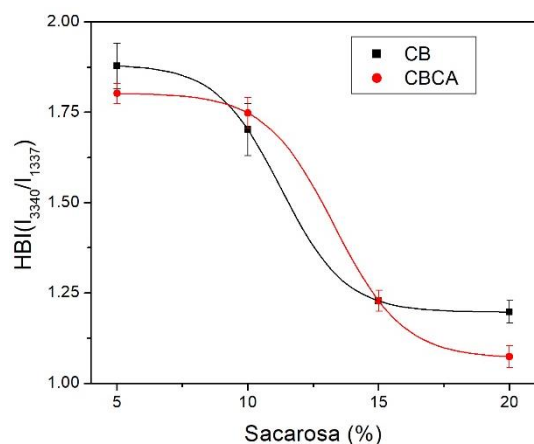
Es interesante destacar que la adición de *Theobroma cacao* al medio de cultivo tiene un efecto en el HBI. Para una concentración de sacarosa del 20%, se observa que la presencia de extracto de cacao reduce la magnitud del HBI en un 10% en comparación con el lote CB. Esto es debido a que los compuestos presentes en el extracto de cacao podrían influir en la organización y la fuerza de los enlaces de hidrógeno en la celulosa bacteriana, lo que se refleja en una disminución en el HBI. [113]

El HBI también puede estar relacionado con el grado de regularidad intermolecular en el sistema cristalino de la celulosa bacteriana, en términos del número y la disposición de los enlaces de hidrógeno. Una mayor intensidad del HBI indica una mayor cantidad y fuerza de los enlaces de hidrógeno, lo que se asocia con una mayor regularidad en la estructura cristalina de la celulosa. [120 - 122]

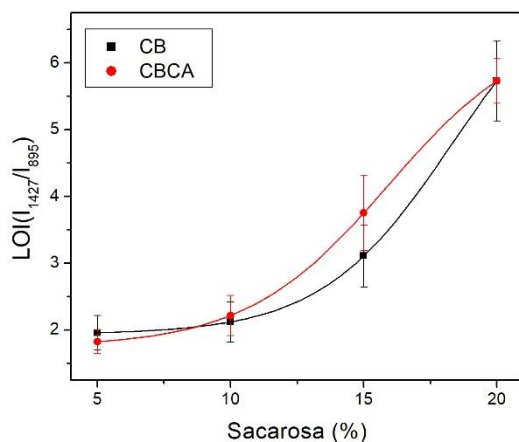
El índice de orden lateral (LOI) es una propiedad relacionada con la cantidad de estructura cristalina presente en la celulosa. Este índice se calcula mediante la comparación de las intensidades de dos bandas específicas en el espectro FTIR: una banda ubicada en 895 cm^{-1} , que corresponde al enlace glucosídico -(1, 4) en la celulosa, y otra banda en 1427 cm^{-1} [28].



(a)



(b)



(c)

Figura 29. Índices relativos de cristalinidad (a)TCI vs % de Sacarosa, (b)HBI vs % de Sacarosa, (c) LOI vs % de Sacarosa.

La Figura 29 (c) muestra cómo varía el LOI en función de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Se observa un comportamiento exponencial, donde a medida que se incrementa la concentración de sacarosa (del 5% al 20%), se produce un aumento, esto indica que la cristalización de la celulosa se ve favorecida por una mayor concentración de sacarosa.

El incremento en el LOI se explica por la cantidad de fuente de carbono disponible, que se incrementa con la adición de sacarosa. La sacarosa proporciona un sustrato rico en carbono para los microorganismos productores de celulosa, lo que a su vez promueve una mayor formación de estructuras cristalinas en la celulosa resultante.

Es importante destacar que se observa un aumento del 17% en el LOI cuando la concentración de sacarosa alcanza el 15%. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en el LOI entre los lotes CB y CBCA a 5, 10 y 20 %, solo el punto en 15% hay una diferencia.

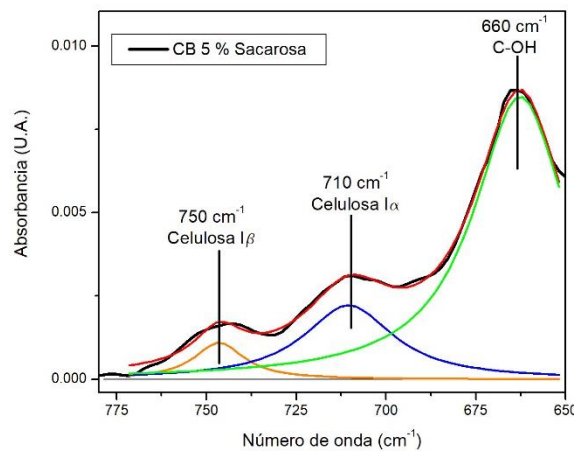


Figura 30. Espectro FTIR deconvolucionado para encontrar los picos a 750, 710 y 660 cm^{-1} .

Finalmente, se estimó la fracción f_{α} a partir de la deconvolución lorentziana del espectro FTIR de la celulosa bacteriana de Kombucha como se muestra en la figura 30. Esto se logró calculando el área de las bandas específicas en 710 y 750 cm^{-1} y utilizando las ecuaciones 1 y 2 correspondientes. Esta propiedad estructural está estrechamente relacionada con la formación de celulosa tipo I, como se ha establecido en investigaciones anteriores (Kataoka y Kondo 1999) [106-108].

$$f_{\alpha} = 2.55 \times f_{IR} - 0.32 \quad (7)$$

donde

$$f_{IR} = \frac{A_{750}}{A_{750} + A_{710}} \quad (8)$$

En la Figura 31 se puede observar claramente cómo la fracción f_{α} aumenta a medida que se incrementa la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Este aumento sugiere que la cristalización de la celulosa se ve favorecida por una mayor concentración de sacarosa. Sin embargo, lo interesante es que cuando se añade Theobroma cacao al medio de cultivo, se observa un aumento significativo en la magnitud de la fracción f_{α} (21%) para una concentración de sacarosa del 20%. Esto indica que la presencia de compuestos presentes en el extracto de cacao tiene un impacto positivo en la cristalización de la celulosa.

Así, las propiedades cristalinas de las membranas de celulosa bacteriana sintetizadas mediante fermentación líquida en té negro y té negro con adición de cacao pueden controlarse y modularse ajustando la concentración de sacarosa en el cultivo. En resumen, la adición de sacarosa y extracto de cacao en la producción de celulosa bacteriana de Kombucha tiene un impacto significativo en las propiedades cristalinas de las membranas, lo que abre nuevas oportunidades para el diseño y la optimización de aplicaciones basadas en celulosa bacteriana.

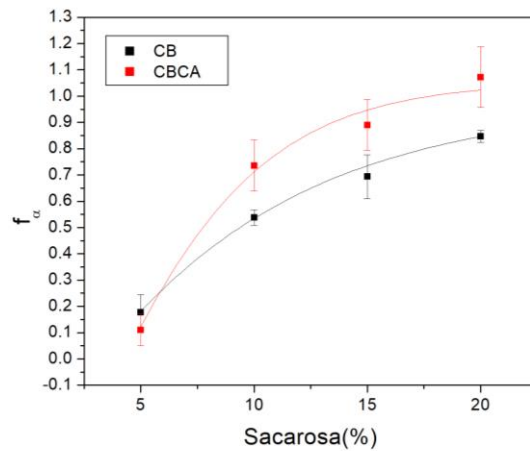


Figura 31. Gráfica f_{α} vs% Sacarosa

4.5 Espectroscopia UV-visible de nanopartículas de oro obtenidas mediante té negro.

En este estudio, se hicieron la síntesis de nanopartículas de oro con un enfoque de síntesis verde, usando té negro como agente reductor. Se exploraron diferentes concentraciones de té negro a 0.05%, 0.2%, 0.5% y 1% (figura 32) correspondientes a 0.5, 2, 5 y 10 (g/l) para reducir el precursor HAuCl_4 . Para evaluar los resultados, se utilizó la espectroscopia UV-Vis.

En los espectros UV-Vis obtenidos, se pudo observar un fenómeno interesante. A medida que se disminuía la proporción de té negro en la solución de reacción, la banda de absorción característica de las nanopartículas de oro a 538 nm se volvía más definida y prominente. Mostrando la presencia del fenómeno de resonancia de plasmón superficial transversal longitudinal (TSPR) un fenómeno óptico que ocurre cuando las nanopartículas metálicas, interactúan con la luz incidente. Los resultados obtenidos muestran que la concentración de té negro utilizada en la síntesis tiene un impacto directo en el tamaño y homogeneidad de las nanopartículas de oro. A menor concentración de té negro, se observa una mayor definición de la banda TSPR en el espectro UV-Vis, esto debido a que la filtración de partículas negras de los residuos orgánicos de las hojas del té es menor en comparación de los elementos que son útiles como los distintos fitoquímicos, polifenoles y antioxidantes. [146, 147]

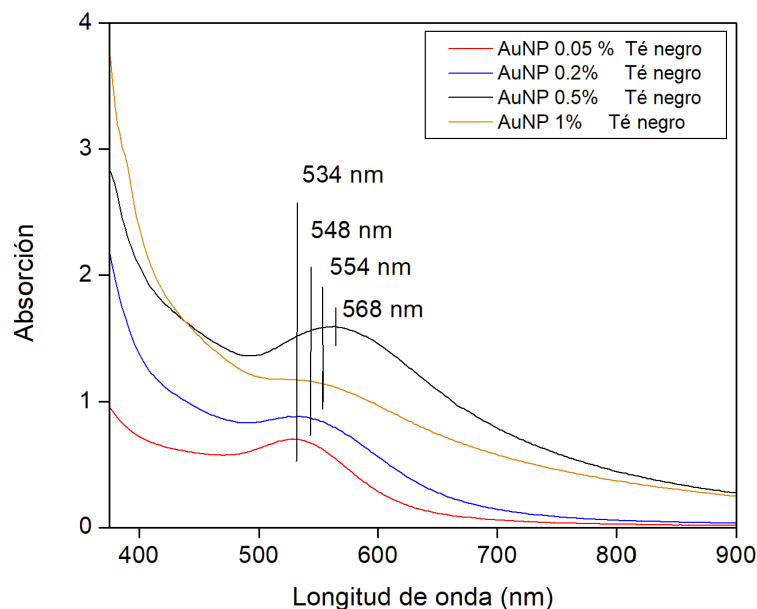


Figura 32. Espectro UV-Vis usando té negro a concentraciones de 0.05%, 0.2%, 0.5% y 1% como reductor de AuNp's

Esta interacción produce una absorción característica en el espectro UV-Vis, y su posición y forma dependen del tamaño y forma de las nanopartículas de oro (AuNPs). La absorción del TSPR varía con el tamaño de la partícula, afectando la posición de su pico de absorción, actualmente se han reportado que las AuNp's esféricas de 13 nm absorben a alrededor de 520 nm, mientras que las de 99 nm lo hacen a 600 nm. [148-154]

Estos hallazgos son significativos, ya que demuestran que la concentración de té negro en la síntesis verde de nanopartículas de oro puede ser un factor crucial para controlar y ajustar el tamaño y la uniformidad de las partículas resultantes. Además, la síntesis verde utilizando té negro como agente reductor proporciona una alternativa respetuosa con el medio ambiente y sostenible para la síntesis de nanopartículas de oro.

En conclusión, los resultados de este estudio indican que la síntesis de nanopartículas de oro mediante un enfoque de síntesis verde utilizando té negro como agente reductor es prometedora. La concentración de té negro utilizada en la síntesis juega un papel importante en la definición de la banda TSPR en el espectro UV-Vis, lo que refleja el tamaño y la uniformidad de las nanopartículas. Estos hallazgos contribuyen al avance de la síntesis de nanopartículas de oro de manera sostenible y controlada.

4.6 Análisis de SEM de compósitos de Celulosa Bacteriana con Nanopartículas de Oro (CB-AuNps).

Las micrografías de barrido electrónico (SEM) mostradas en la figura 33 presentan la apariencia morfológica característica de las muestras de celulosa bacteriana (CB). En este estudio, se llevó a cabo la adición de nanopartículas de oro (AuNPs) a las muestras de CB mediante un proceso de deposición in-situ durante un período de 7 días bajo condiciones de cultivo estático.

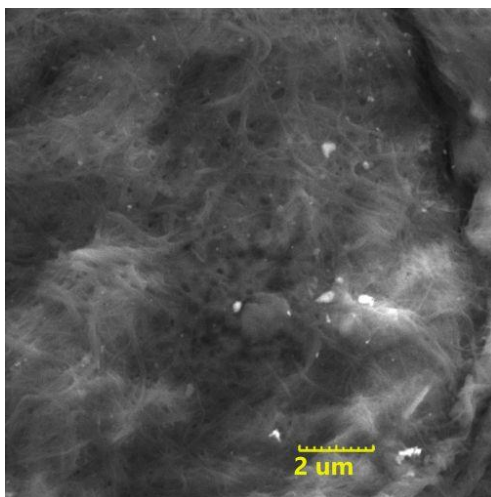


Figura 33. Micrografías SEM de compósitos CB-AuNp's usando té negro diluido a 0.5%.

Al analizar las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido en las membranas de CB, se observa una red densamente empaquetada de fibras que conserva la morfología característica de la CB sin nanopartículas. Además, se aprecia la presencia de depósitos dispersos de nanopartículas de oro que se analiza con el software ImageJ principalmente usando las micrografías SEM, utilizando los mejores resultados se observa tamaños en el rango de 10 a 100 nm con promedio de 50nm y una mayor concentración en 30 nm como se puede ver en el histograma de la figura 35, el cual analizo principalmente la micrografía SEM de la figura 33(c) como se observa en la figura 34 donde se muestra cómo se obtienen los tamaños de las AuNp's.

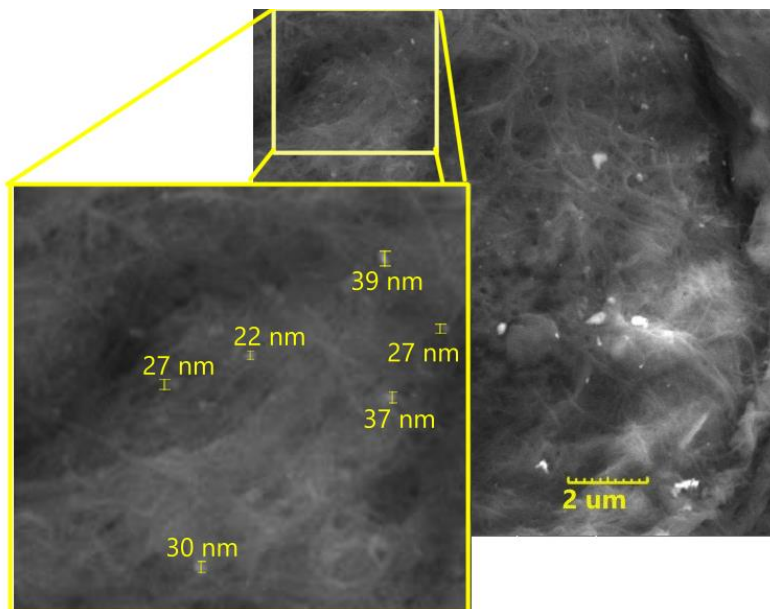


Figura 34. Zoom de micrografía SEM de compuesto CB-AuNp's.

Los depósitos se formaron simultáneamente con la celulosa bacteriana durante el proceso de deposición in-situ, posiblemente debido a la concentración inicial de nanopartículas de oro utilizada. Estos resultados son prometedores, ya que muestran la posible incorporación de nanopartículas de oro en la matriz de celulosa bacteriana sin alterar significativamente su morfología característica. Además, la dispersión observada de las AuNPs sugiere que existe la posibilidad de optimizar el proceso de deposición in-situ para lograr una distribución más uniforme y controlada de las nanopartículas en la estructura de la celulosa bacteriana.

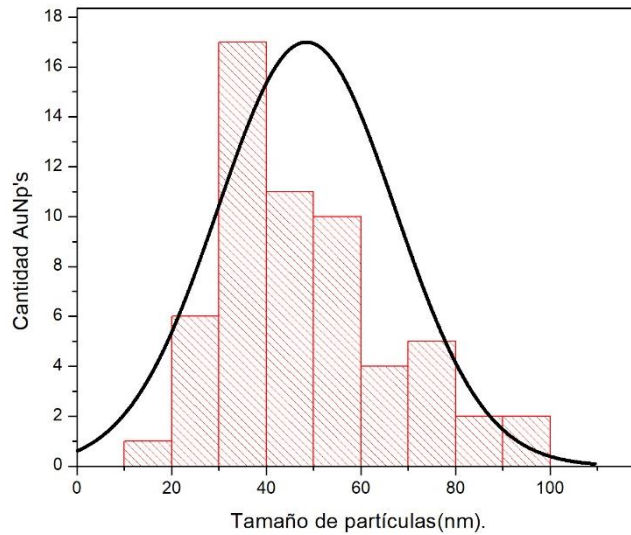


Figura 35. Histograma de AuNp's

Estos hallazgos proporcionan una vía eficaz para futuras investigaciones, ya que sugieren la posibilidad de desarrollar métodos mejorados de síntesis y modificación de la celulosa bacteriana con nanopartículas de oro. Estos materiales híbridos podrían ofrecer propiedades y aplicaciones únicas en campos como la nanotecnología, la óptica, la catálisis y la electrónica, entre otros. El estudio de la morfología y distribución de las nanopartículas de oro en la celulosa bacteriana es un paso importante hacia la comprensión y el control de las propiedades y funciones de estos materiales híbridos en diversas aplicaciones tecnológicas y biomédicas.

Capítulo 5. Conclusiones

Usando un consorcio microbiano conocido como Kombucha para la formación de celulosa bacteriana se hicieron dos tipos de medio de cultivo uno a base de té negro perteneciente al lote CB y otro de té negro adicionado con cacao perteneciente al lote CBCA, estudiando la cinética de crecimiento variando el porcentaje de sacarosa en 5, 10, 15 y 20 %. Tanto para el lote CB como para el lote CBCA muestran que a mayor porcentaje de sacarosa mayor la membrana de celulosa bacteriana.

El lote CB obtuvo membranas de Celulosa bacteriana sin purificar que varían en peso de 6,2 a 12,66 g con grosores de 3.18 a 4.63 mm, mientras que el CBCA fue de 7.51 a 16.61 g con grosores de 2.5 a 8.35 mm, luego al secarlos y purificarlos no mostraron diferencias significativas.

El análisis FTIR mostró un decaimiento en el índice de bandas de hidrógeno, mientras que tiende a crecer el índice de orden lateral el cual se refiere al ordenamiento de la estructura, además de que el índice de cristalinidad total también tiene tendencia creciente tanto para lote CB como CBCA, todo esto conjugado con el porcentaje de celulosa $I\alpha$ nos indican que conforme se aumenta el porcentaje de sacarosa las muestras son más cristalinas, comparando con el lote CB que muestra ser menos cristalino que el lote CBCA.

Basándonos en los resultados obtenidos podemos observar que conforme se añade la sacarosa al medio aumentan la productividad de CB y que las muestras con el medio que solo consistía en medio de cultivo de té negro eran capas de menores pesos y grosores que a las que se les agrego el CACAO, además de que el análisis de las mediciones FTIR manifiestan que conforme se aumenta la sacarosa en los medios de cultivo, aumente el porcentaje de celulosa $I\alpha$, además de que los medios en los que se añadió CACAO tienen resultados aún mayores que las muestras que no llevan. Las micrografías SEM muestran una densa red de CB empaquetada conforme las muestras más cristalinas.

También se estudió la síntesis de nanopartículas de oro empleando un enfoque de síntesis verde con té negro como agente reductor. A través de la variación de las concentraciones de té negro (0.05%, 0.2%, 0.5% y 1%), se exploraron los efectos sobre el proceso de síntesis y sus resultados. La caracterización de las muestras se llevó a cabo utilizando espectroscopía UV-Vis.

Uno de los hallazgos más notables fue el fenómeno observado en los espectros UV-Vis. Al disminuir la proporción de té negro en la solución de reacción, se observó que la banda de absorción característica de las nanopartículas de oro a 538 nm se volvía más nítida y prominente. Esta modificación en los espectros indicó la presencia del fenómeno de resonancia de plasmón superficial transversal longitudinal (TSPR) en las nanopartículas sintetizadas.

La manifestación del TSPR es un indicador clave de las propiedades ópticas y estructurales de las nanopartículas metálicas, como el oro. Además, este estudio respalda la viabilidad de utilizar enfoques de síntesis verde en la fabricación de nanopartículas, lo que puede contribuir a la reducción de impactos ambientales en los procesos químicos.

La investigación no solo demostró la eficacia de la síntesis de nanopartículas de oro utilizando té negro como agente reductor en un enfoque de síntesis verde, sino que también resaltó la importancia de las concentraciones en la modulación de las propiedades ópticas de las nanopartículas resultantes. Estos resultados ofrecen un avance significativo en la comprensión de la relación entre la composición de la solución y las características de las nanopartículas generadas, lo que puede tener aplicaciones prometedoras en campos como la nanotecnología y la óptica.

Anexo 1.



Huerta, N. V., Iniesta, S. A., Cruz, B. S. S., Moran, P. Z., Diaz, A. O., Lozano, L. S. A., & López, M. R. (2022). Efecto de la Sacarosa en la Síntesis de Celulosa Bacteriana por Fermentación de Kombucha en Té Negro (*Camellia sinensis*). *Frontera Biotecnológica*, 22(4). 14-20. iISSN: 2448-8461

Anexo 2.

European Journal of Applied Sciences – Vol. 10, No. 4

Publication Date: August 25, 2022

DOI:10.14738/ajvp.104.12869.

Huerta, N. V., Iniesta, S. A., Cruz, B. S. S., Moran, P. Z., Diaz, A. O., Lozano, L. S. A., & Lopez, M. R. (2022). Kombucha Bacterial Cellulose Synthesized by Liquid Fermentation on Black Tea (*Camellia sinensis*): Effect of the Sucrose. European Journal of Applied Sciences, 10(4), 639-648.



Kombucha Bacterial Cellulose Synthesized by Liquid Fermentation on Black Tea (*Camellia sinensis*): Effect of the Sucrose

Natanael Victoriano Huerta

Centro de Investigación en Dispositivos Semiconductores
Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma
de Puebla, Puebla, México

Salvador Alcántara Iniesta

Centro de Investigación en Dispositivos Semiconductores
Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma
de Puebla, Puebla, México

Blanca Susana Soto Cruz

Centro de Investigación en Dispositivos Semiconductores
Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma
de Puebla, Puebla, México

Placido Zaca Morán

Instituto de Ciencias, Ecocampus Valsequillo
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

Abdu Orduña Díaz

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en
Biotecnología Aplicada, Tlaxcala, México

Leslie Susana Arcila Lozano

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en
Biotecnología Aplicada, Tlaxcala, México

Marlon Rojas López

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en
Biotecnología Aplicada, Tlaxcala, México

ABSTRACT

Bacterial cellulose membranes were synthesized by liquid fermentation of the Kombucha strain into black tea (*Camellia sinensis*) at different concentrations of sucrose. Structural properties of bacterial cellulose Kombucha, such as lateral order index (LOI), total crystallinity index (TCI), hydrogen bond intensity (HBI), fraction (f_c), as well as their dependence on sucrose content were evaluated by Fourier transform infrared spectroscopy, using different absorption bands of the vibrational spectrum. It was thus observed that sucrose tends to crystallize

Services for Science and Education – United Kingdom

Huerta, N. V., Iniesta, S. A., Cruz, B. S. S., Moran, P. Z., Diaz, A. O., Lozano, L. S. A., & Lopez, M. R. (2022). Kombucha Bacterial Cellulose Synthesized by Liquid Fermentation on Black Tea (*Camellia sinensis*): Effect of the Sucrose. European Journal of Applied Sciences, 10(4). 639-648.

Referencias

1. Canham L (2018) Routes of formation for porous silicon. In: Handbook of Porous Silicon: Second Edition. Springer International Publishing, pp 3–11
2. Muñoz P, Micó G, Bru L, et al (2017) Silicon Nitride Photonic Integration Platforms for Visible, Near-Infrared and Mid-Infrared Applications. *Sensors* 17:2088. <https://doi.org/10.3390/s17092088>
3. Zou M, Ma Y, Yuan X, et al (2018) Flexible devices: From materials, architectures to applications. *Journal of Semiconductors* 39:011010. <https://doi.org/10.1088/1674-4926/39/1/011010>
4. Palchoudhury S, Ramasamy K, Gupta RK, Gupta A (2019) Flexible supercapacitors: A materials perspective. *Front Mater* 5:83
5. Cardarelli F (2018) Composite Materials BT - Materials Handbook: A Concise Desktop Reference. In: Cardarelli F (ed). Springer International Publishing, pp 1497–1517
6. Koltzenburg S, Maskos M, Nuyken O, et al (2017) Introduction and Basic Concepts. In: Polymer Chemistry. Springer Berlin Heidelberg, pp 1–16
7. Li D, Li Y, Zhou J, Zhao Z (2020) A Novel Method to Improve Temperature Uniformity in Polymer Composites Microwave Curing Process through Deep Learning with Historical Data. *Applied Composite Materials* 27:1–17. <https://doi.org/10.1007/s10443-019-09791-5>
8. Gedde UW, Hedenqvist MS (2019) Introduction to Polymer Science. Springer, Cham, pp 1–35
9. Abetz V, Chan CH, Luscombe CK, et al (2020) Quo Vadis, Macromolecular Science? Reflections by the IUPAC Polymer Division on the Occasion of the Staudinger Centenary. *Isr J Chem* 60:9–19. <https://doi.org/10.1002/ijch.201900182>
10. Mishra AK (2018) Conducting Polymers: Concepts and Applications. *Journal of Atomic, Molecular, Condensate and Nano Physics* 5:159–193. <https://doi.org/10.26713/jamcnp.v5i2.842>

11. Dary L, Pineda C, Alfonso L, et al (2012) Ingeniería y Ciencia Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión 307|. *ing cienc* 8:307–335
12. Klemm D, Schumann D, Kramer F, et al (2006) Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. *Advances in Polymer Science* 205:49–96
13. Moniri M, Moghaddam AB, Azizi S, et al (2017) Production and status of bacterial cellulose in biomedical engineering. *Nanomaterials* 7
14. Henriksson M, Berglund LA (2007) Structure and properties of cellulose nanocomposite films containing melamine formaldehyde. *J Appl Polym Sci* 106:2817–2824. <https://doi.org/10.1002/app.26946>
15. Iwamoto S, Nakagaito AN, Yano H (2007) Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites. *Appl Phys A Mater Sci Process* 89:461–466. <https://doi.org/10.1007/s00339-007-4175-6>
16. Pacheco C-, Luis J, Yee M, et al (2004) Redalyc.Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones
17. (PDF) Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. https://www.researchgate.net/publication/237034801_Celulosa_bacteriana_en_gluconacetobacter_xylinum_biosintesis_y_aplicaciones. Accessed 3 Oct 2020
18. Esa F, Tasirin SM, Rahman NA (2014) Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2:113–119. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.017>
19. Peng H, Sun X, Weng W, Fang X (2017) Synthesis and Design of Conjugated Polymers for Organic Electronics. In: *Polymer Materials for Energy and Electronic Applications*. Elsevier, pp 9–61
20. Stadler P (2019) Isotropic metallic transport in conducting polymers. *Synth Met* 254:106–113
21. Balli B, Şavk A, Şen F (2018) Graphene and polymer composites for supercapacitor applications. In: *Nanocarbon and its Composites: Preparation, Properties and Applications*. Elsevier, pp 123–151
22. Chen GZ (2013) Understanding supercapacitors based on nano-hybrid materials with interfacial conjugation. *Progress in Natural Science: Materials International* 23:245–255

23. Akinwolemiwa B, Peng C, Chen GZ (2015) Redox Electrolytes in Supercapacitors. *J Electrochem Soc* 162:A5054–A5059. <https://doi.org/10.1149/2.0111505jes>
24. Schröpfer SB, Bottene MK, Bianchin L, et al (2015) Biodegradation evaluation of bacterial cellulose, vegetable cellulose and poly (3-hydroxybutyrate) in soil. *Polimeros* 25:154–160. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.1712>
25. Ropio I, Baptista AC, Nobre JP, et al (2018) Cellulose paper functionalised with polypyrrole and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for paper battery electrodes. *Org Electron* 62:530–535. <https://doi.org/10.1016/j.orgel.2018.06.025>
26. Pirsá S, Shamusí T, Kia EM (2018) Smart films based on bacterial cellulose nanofibers modified by conductive polypyrrole and zinc oxide nanoparticles. *J Appl Polym Sci* 135:46617. <https://doi.org/10.1002/app.46617>
27. Lay M, González I, Tarrés JA, et al (2017) High electrical and electrochemical properties in bacterial cellulose/polypyrrole membranes. *Eur Polym J* 91:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.03.021>
28. Yao J, Ji P, Sheng N, et al (2018) Hierarchical core-sheath polypyrrole@carbon nanotube/bacterial cellulose macrofibers with high electrochemical performance for all-solid-state supercapacitors. *Electrochim Acta* 283:1578–1588. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.07.086>
29. Luo H, Dong J, Yao F, et al (2018) Layer-by-Layer Assembled Bacterial Cellulose/Graphene Oxide Hydrogels with Extremely Enhanced Mechanical Properties. *Nanomicro Lett* 10:1–10. <https://doi.org/10.1007/s40820-018-0195-3>
30. Khan S, Ul-Islam M, Ullah MW, et al (2018) Nano-gold assisted highly conducting and biocompatible bacterial cellulose-PEDOT:PSS films for biology-device interface applications. *Int J Biol Macromol* 107:865–873. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.064>
31. Hosseini H, Kokabi M, Mousavi SM (2018) Conductive bacterial cellulose/multiwall carbon nanotubes nanocomposite aerogel as a potentially flexible lightweight strain sensor. *Carbohydr Polym* 201:228–235. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.054>

32. Wang X, Kong D, Zhang Y, et al (2016) All-biomaterial supercapacitor derived from bacterial cellulose. *Nanoscale* 8:9146–9150. <https://doi.org/10.1039/c6nr01485b>
33. Li S, Huang D, Zhang B, et al (2014) Flexible Supercapacitors based on bacterial cellulose paper electrodes. *Adv Energy Mater* 4:. <https://doi.org/10.1002/aenm.201301655>
34. Mishra R, Militky J, Venkataraman M (2019) Electrospun nanofibers. In: *Nanotechnology in Textiles*. Elsevier, pp 35–161
35. Herou S, Schlee P, Jorge AB, Titirici M (2018) Biomass-derived electrodes for flexible supercapacitors. *Curr Opin Green Sustain Chem* 9:18–24
36. Hassan ME, Bai J, Dou DQ (2019) Biopolymers; Definition, classification and applications. *Egypt J Chem* 62:1725–1737
37. Brigham C (2017) Biopolymers: Biodegradable Alternatives to Traditional Plastics. In: *Green Chemistry: An Inclusive Approach*. Elsevier Inc., pp 753–770
38. Kedia A, Dubey NK (2018) Nanoencapsulation of Essential Oils: A Possible Way for an Eco-Friendly Strategy to Control Postharvest Spoilage of Food Commodities From Pests. In: *Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms*. Elsevier Inc., pp 501–522
39. Zeng Y, Himmel ME, Ding SY (2017) Visualizing chemical functionality in plant cell walls Mike Himmel. *Biotechnol Biofuels* 10:263
40. Bardone E, Marzocchella A, Keshavarz T, et al (2018) The Effect of the Drying Process on the Properties of Bacterial Cellulose Films from *Gluconacetobacter hansenii*. In: *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*
41. Park JK, Jung JY, Khan T (2009) Bacterial cellulose. In: *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition*. Elsevier Inc., pp 724–739
42. Rydz J, Musiol M, Zawidlak-Wegrzyńska B, Sikorska W (2018) Present and Future of Biodegradable Polymers for Food Packaging Applications. In: *Biopolymers for Food Design*. Elsevier Inc., pp 431–467

43. Plant Growth and Development | ScienceDirect.
<https://www.sciencedirect.com/book/9780126605709/plant-growth-and-development>. Accessed 6 Nov 2020
44. Microorganisms NRC (US) SG for the W on SL of VS (1999) Bacteria, Their Smallest Representatives and Subcellular Structures, and the Purported Precambrian Fossil “Metallogenium”
45. Vargas-Flores T, Kuno-kuno A (2014) Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica* 49:2594–2598
46. Betancourt L, Gadea M, Flores K (2006) *Temas de Bacteriología y Virología médica*
47. Parker J (2001) Bacteria. *Encyclopedia of Genetics* 146–151. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0102>
48. Aguilera A (2011) Cell. In: *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp 264–271
49. Otieno DO (2011) *Biology of Prokaryotic Probiotics*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1–28
50. Killham KS, Prosser JI (2007) The prokaryotes. 119–144
51. Vishnyakov IE, Borchsenius SN (2007) FtsZ and bacterial cell division. *Cell tissue biol* 1:206–214
52. Roy P (2019) Binary Fission. In: *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Springer International Publishing, pp 1–2
53. Abdullaeva Z, Abdullaeva Z (2017) Synthesis of Nanomaterials by Prokaryotes. In: *Synthesis of Nanoparticles and Nanomaterials*. Springer International Publishing, pp 25–54
54. Abdullaeva Z, Abdullaeva Z (2017) Synthesis of Nanomaterials by Prokaryotes. In: *Synthesis of Nanoparticles and Nanomaterials*. Springer International Publishing, pp 25–54
55. Introducción a la Microbiología Ed.12º por Tortora, Gerard J. - 9789500695404 - Journal.
<https://www.edicionesjournal.com/Papel/9789500695404/Introducción+a+la+Microbiología+Ed+12º>.
 Accessed 7 Nov 2020

56. Crawford CB, Quinn B (2017) Physiochemical properties and degradation. *Microplastic Pollutants* 57–100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809406-8.00004-9>
57. Park JK, Jung JY, Khan T (2009) Bacterial cellulose. *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition* 724–739. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.724>
58. Goldstein IS (2004) WOOD FORMATION AND PROPERTIES | Chemical Properties of Wood. *Encyclopedia of Forest Sciences 1835–1839*. <https://doi.org/10.1016/B0-12-145160-7/00042-9>
59. Atykyan N, Revin V, Shutova V (2020) Raman and FT-IR Spectroscopy investigation the cellulose structural differences from bacteria *Gluconacetobacter sucrofermentans* during the different regimes of cultivation on a molasses media. *AMB Express* 10:1–11. <https://doi.org/10.1186/S13568-020-01020-8/FIGURES/8>
60. Nelson ML, O'Connor RT (1964) Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal latticed type. Part I. Spectra of lattice types I, II, III and of amorphous cellulose. *J Appl Polym Sci* 8:1311–1324. <https://doi.org/10.1002/app.1964.070080322>
61. Nada AAMA, Kamel S, El-Sakhawy M (2000) Thermal behaviour and infrared spectroscopy of cellulose carbamates. *Polym Degrad Stab* 70:347–355. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(00\)00119-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(00)00119-1)
62. Hurtubise FG, KrÄSSIG H (1960) Classification of Fine Structural Characteristics in Cellulose by Infrared Spectroscopy Use of Potassium Bromide Pellet Technique. *Anal Chem* 32:177–181. <https://doi.org/10.1021/ac60158a010>
63. Nam NH, Luong NH (2019) Nanoparticles: Synthesis and applications. In: *Materials for Biomedical Engineering: Inorganic Micro- and Nanostructures*. Elsevier, pp 211–240
64. Chen X, Li QW, Wang XM (2014) Gold nanostructures for bioimaging, drug delivery and therapeutics. In: *Precious Metals for Biomedical Applications*. Elsevier Ltd, pp 163–176
65. Freestone I, Meeks N, Sax M, Higgitt C (2008) The Lycurgus Cup - A Roman nanotechnology. *Gold Bull* 40:270–277. <https://doi.org/10.1007/BF03215599>

66. Capek I (2017) Nanofield. Springer, Tokyo, pp 1–123
67. Vigneshwaran N, Jain P (2011) Biomolecules–Nanoparticles: Interaction in Nanoscale. In: Metal Nanoparticles in Microbiology. Springer Berlin Heidelberg, pp 135–150
68. Capek I (2017) Nanofield. Springer, Tokyo, pp 1–123
69. Krivitsky V, Zverzhinetsky M, Patolsky F (2020) Redox-Reactive Field-Effect Transistor Nanodevices for the Direct Monitoring of Small Metabolites in Biofluids toward Implantable Nanosensors Arrays. ACS Appl Mater Interfaces 14:3594. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b10090>
70. Cai B, Huang L, Zhang H, et al (2015) Gold nanoparticles-decorated graphene field-effect transistor biosensor for femtomolar MicroRNA detection. Biosens Bioelectron 74:329–334. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.068>
71. Thelander C, Magnusson MH, Deppert K, et al (2001) Gold nanoparticle single electron transistor with carbon nanotube leads. Appl Phys Lett 79:2106–2108. <https://doi.org/10.1063/1.1405154>
72. Gerasimov YS, Shorokhov V V., Soldatov ES, Snigirev O V. (2013) Gold nanoparticle single-electron transistor simulation. In: International Conference Micro- and Nano-Electronics 2012. SPIE, p 870015
73. Bitton O, Gutman DB, Berkovits R, Frydman A (2017) Multiple periodicity in a nanoparticle-based single-electron transistor. Nat Commun 8:8–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00442-6>
74. Stancheva KA (2012) Noble metal nanoparticles
75. Carabineiro SAC (2019) Supported Gold Nanoparticles as Catalysts for the Oxidation of Alcohols and Alkanes. Front Chem 7
76. Suchomel P, Kvitek L, Pucek R, et al (2018) Simple size-controlled synthesis of Au nanoparticles and their size-dependent catalytic activity. Sci Rep 8:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22976-5>
77. K  n  l S, Rauwel P, Rauwel E (2018) Plant extract mediated synthesis of nanoparticles. In: Emerging Applications of Nanoparticles and Architectural Nanostructures: Current Prospects and Future Trends. Elsevier Inc., pp 411–446

78. Iqbal P, Preece JA, Mendes PM (2012) Nanotechnology: The “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches. *Supramol Chem.* <https://doi.org/10.1002/9780470661345.smc195>
79. Habiba, K., Makarov, V., Weiner, B., Morell G (2014) *Fabrication of Nanomaterials by Pulsed Laser Synthesis. Manufacturing Nanostructures.* UK: one central press (OCN)
80. Khanna P, Kaur A, Goyal D (2019) Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications. *J Microbiol Methods* 163:105656
81. Benjamin JS, Volin TE (1974) MECHANISM OF MECHANICAL ALLOYING. *Metall Trans* 5:1929–1934. <https://doi.org/10.1007/BF02644161>
82. Prasad Yadav T, Manohar Yadav R, Pratap Singh D (2012) Mechanical Milling: a Top Down Approach for the Synthesis of Nanomaterials and Nanocomposites. *Nanoscience and Nanotechnology* 2:22–48. <https://doi.org/10.5923/j.nn.20120203.01>
83. Kim M, Osone S, Kim T, et al (2017) Synthesis of Nanoparticles by Laser Ablation: A Review. *KONA Powder and Particle Journal* 34:80–90. <https://doi.org/10.14356/kona.2017009>
84. Mansoureh G, Parisa V (2018) Synthesis of metal nanoparticles using laser ablation technique. In: *Emerging Applications of Nanoparticles and Architectural Nanostructures: Current Prospects and Future Trends.* Elsevier Inc., pp 575–596
85. Semaltianos NG (2010) Nanoparticles by laser ablation. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* 35:105–124. <https://doi.org/10.1080/10408431003788233>
86. Shi F (2018) Introductory Chapter: Basic Theory of Magnetron Sputtering. In: *Magnetron Sputtering [Working Title].* IntechOpen
87. Depla D, Mahieu S, Greene JE (2010) Sputter Deposition Processes. In: *Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings.* Elsevier Inc., pp 253–296
88. Ram O, Sadot O (2012) Implementation of the exploding wire technique to study blast-wave-structure interaction. *Exp Fluids* 53:1335–1345. <https://doi.org/10.1007/s00348-012-1339-8>

89. Humud HR, Wasfi AS, Makia AM (2014) Preparation of Silver Nanoparticles by Exploding Wire in Different Liquids. *Asian Journal of Applied Science and Engineering* 3:2307–9584. <https://doi.org/10.15590/ajase/2014/v3i7/53572>
90. Sarkisov GS, McCrorey D (2002) Imaging of exploding wire phenomena. *IEEE Transactions on Plasma Science* 30:98–99. <https://doi.org/10.1109/TPS.2002.1003942>
91. Ghorbani HR (2014) A review of methods for synthesis of Al nanoparticles. *Oriental Journal of Chemistry* 30:1941–1949. <https://doi.org/10.13005/ojc/300456>
92. Fortunati E, Luzi F, Puglia D, Torre L (2016) Extraction of Lignocellulosic Materials From Waste Products. In: *Multifunctional Polymeric Nanocomposites Based on Cellulosic Reinforcements*. Elsevier Inc., pp 1–38
93. Hamidreza AB, Reza BS, Mahdi CS, et al (2016) Nanotechnology and supercritical fluids. *Journal of Fundamental and Applied Sciences* 8:839. <https://doi.org/10.4314/jfas.8vi2s.138>
94. Parashar M, Shukla VK, Singh R (2020) Metal oxides nanoparticles via sol–gel method: a review on synthesis, characterization and applications. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 31:3729–3749
95. Carlsson JO, Martin PM (2010) Chemical Vapor Deposition. In: *Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings*. Elsevier Inc., pp 314–363
96. Daruich De Souza C, Ribeiro Nogueira B, Rostelato MECM (2019) Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. *J Alloys Compd* 798:714–740
97. Zhao P, Li N, Astruc D (2013) State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coord Chem Rev* 257:638–665
98. Mf F, Patel H, Sn S (2018) Nanotechnology : Innovative Applications in the Oil & Gas Industry. *International Journal of Global Advanced Materials & Nanotechnology* 1:16–30

99. Sajjad S, Leghari SAK, Ryma NUA, Farooqi SA (2018) Green synthesis of metal-based nanoparticles and their applications. In: *The Macabresque: Human Violation and Hate in Genocide, Mass Atrocity and Enemy-Making*. Wiley, pp 23–77
100. Shah M, Fawcett D, Sharma S, et al (2015) Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *Materials* 8:7278–7308
101. Irimia-Vladu M (2014) “Green” electronics: Biodegradable and biocompatible materials and devices for sustainable future. *Chem Soc Rev* 43:588–610
102. Darweesh RS, Ayoub NM, Nazzal S (2019) Gold nanoparticles and angiogenesis: Molecular mechanisms and biomedical applications. *Int J Nanomedicine* 14:7643–7663
103. Polte J (2015) Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles - a new perspective. *CrystEngComm* 17:6809–6830. <https://doi.org/10.1039/c5ce01014d>
104. Indriyati, Irmawati Y, Puspitasari T (2019) Comparative study of bacterial cellulose film dried using microwave and air convection heating. *Journal of Engineering and Technological Sciences* 51:121–132. <https://doi.org/10.5614/j.eng.technol.sci.2019.51.1.8>
105. Zeng M, Laromaine A, Roig A (2014) Bacterial cellulose films: influence of bacterial strain and drying route on film properties. *Cellulose* 21:4455–4469. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0408-y>
106. Kataoka, Yutaka / Kondo, Tetsuo (1999) Quantitative analysis for the cellulose Ia crystalline phase in developing wood cell walls, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 24, No. 1, p. 37-41. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00065-8)
107. A. Żywicka, A.F. Junka, P. Szymczyk, G. Chodaczek, J. Grzesiak, P.P. Sedghizadeh, K. Fijałkowski, (2018) Bacterial cellulose yield increased over 500% by supplementation of medium with vegetable oil, *Carbohydrate Polymers*. 199 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.126>
108. X. Zeng, J. Liu, J. Chen, Q. Wang, Z. Li, H. Wang, (2011) Screening of the common culture conditions affecting crystallinity of bacterial cellulose, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38 1993–1999. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0989-5>

109. Fan, Mizi, Dai, Dasong, Huang, Biao (2012) Hydrogen bonds analysis of natural celluloses by using FTIR, InProceedings (Fan2012HydrogenBA)
110. Nadaf, Sameer J. / Jadhav, Namdeo R. / Naikwadi, Heena S. / Savekar, Pranav L. / Sapkal, Isha D. / Kambli, Mugdha M. / Desai, Indrajeet A.(2022), Green synthesis of gold and silver nanoparticles: Updates on research, patents, and future prospects. *OpenNano* , Vol. 8, p. 100076
111. Bharadwaj, Kaushik Kumar / Rabha, Bijuli / Pati, Siddhartha / Sarkar, Tanmay / Choudhury, Bhabesh Kumar / Barman, Arpita / Bhattacharjya, Dorothy / Srivastava, Ankit / Baishya, Debabrat / Edinur, Hisham Atan / Abdul Kari, Zulhisyam / Mohd Noor, Noor Haslina (2021), Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Plant Extracts as Beneficial Prospect for Cancer Theranostics, *Molecules* , Vol. 26, No. 21
112. Lahiri D, Nag M, Dutta B, Dey A, Sarkar T, Pati S, Edinur HA, Abdul Kari Z, Mohd Noor NH, Ray RR. Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 30;22(23):12984. doi: 10.3390/ijms222312984. PMID: 34884787; PMCID: PMC8657668.
113. O. L. Saavedra-Sanabria, D. Durán, J. Cabezas, I. Hernández, C. Blanco-Tirado, M.Y. Combariza, Cellulose biosynthesis using simple sugars available in residual cacao mucilage exudate, *Carbohydrate Polymers*. 274 (2021) 118645. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118645> .
114. Miranda Altamirano Ariel. Uso de apósitos en quemaduras. *Cir. plást. iberolatinoam*. 2020 ; 46(Suppl 1): 31-38. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0376-78922020000200008&lng=es. Epub 22-Jun-2020. <https://dx.doi.org/10.4321/s0376-78922020000200008>.
115. He W, Wu J, Xu J, Mosselhy DA, Zheng Y, Yang S. Bacterial Cellulose: Functional Modification and Wound Healing Applications. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2021 Nov;10(11):623-640. doi: 10.1089/wound.2020.1219. Epub 2020 Sep 28. PMID: 32870775; PMCID: PMC8392072.
116. Horue M, Silva JM, Berti IR, Brandão LR, Barud HDS, Castro GR. Bacterial Cellulose-Based Materials as Dressings for Wound Healing. *Pharmaceutics*. 2023 Jan 27;15(2):424. doi: 10.3390/pharmaceutics15020424. PMID: 36839745; PMCID: PMC9963514.

- 117 A. Santaolalla, J. Gutierrez, G. Gallastegui, A. Barona, N. Rojo, Immobilization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in bacterial cellulose for a more sustainable bioleaching process, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 9, Issue 4, 2021, 105283, ISSN 2213-3437, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105283>.
- 118 Guodong Liu, Faxing Zou, Wei He, Junfei Li, Yajie Xie, Mengjiao Ma, Yudong Zheng, The controlled degradation of bacterial cellulose in simulated physiological environment by immobilization and release of cellulase, *Carbohydrate Polymers*, Volume 314, 2023, 120906, ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120906>.
- 119 de Assis SC, Morgado DL, Scheidt DT, de Souza SS, Cavallari MR, Ando Junior OH, Carrilho E. Review of Bacterial Nanocellulose-Based Electrochemical Biosensors: Functionalization, Challenges, and Future Perspectives. *Biosensors*. 2023; 13(1):142. <https://doi.org/10.3390/bios13010142>
- 120 A.A.M.A. Nada, S. Kamel, M. El-Sakhawy, Thermal behaviour and infrared spectroscopy of cellulose carbamates, *Polymer Degradation and Stability*. 70 (2000) 347–355. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(00\)00119-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(00)00119-1).
- 121 S.Y. Oh, D. il Yoo, Y. Shin, G. Seo, FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide, *Carbohydrate Research*. 340 (2005) 417–428. <https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2004.11.027>.
- 122 Široký, R.S. Blackburn, T. Bechtold, J. Taylor, P. White, Attenuated total reflectance Fourier-transform Infrared spectroscopy analysis of crystallinity changes in lyocell following continuous treatment with sodium hydroxide, *Cellulose* 2009 17:1. 17 (2009) 103–115. <https://doi.org/10.1007/S10570-009-9378-X>.
- 123 Kim, S.-Y.; Kim, J.-N.; Wee, Y.-J.; Park, D.-H.; Ryu, H.-W. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 isolated from persimmon vinegar. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006, 131, 705–715.
- 124 Singhsa, P.; Narain, R.; Manuspiya, H. Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions. *Cellulose* 2018, 25, 1571–1581.

- 125 Jung, H.-I.; Jeong, J.-H.; Lee, O.-M.; Park, G.-T.; Kim, K.-K.; Park, H.-C.; Lee, S.-M.; Kim, Y.-G.; Son, H.-J. Influence of glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. *Bioresour. Technol.* 2010, 101, 3602–3608.
- 126 Revin, V.V.; Liyas’kina, E.V.; Sapunova, N.B.; Bogatyreva, A.O. Isolation and Characterization of the Strains Producing Bacterial Cellulose. *Microbiology* 2020, 89, 86–95. [CrossRef]
- 127 Hu, W.; Chen, S.; Yang, J.; Li, Z.; Wang, H. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. *Carbohydr. Polym.* 2014, 101, 1043–1060. [CrossRef]
- 128 Jung, J.Y.; Park, J.K.; Chang, H.N. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. *Enzyme Microb. Technol.* 2005, 37, 347–354.
- 129 Hodel, K.V.; Fonseca, L.M.; Santos, I.M.; Cerqueira, J.C.; Santos-Júnior, R.E.; Nunes, S.B.; Barbosa, J.D.; Machado, B.A. Evaluation of Different Methods for Cultivating *Gluconacetobacter hansenii* for Bacterial Cellulose and Montmorillonite Biocomposite Production: Wound-Dressing Applications. *Polymers* 2020, 12, 267.
- 130 Castro, C.; Zuluaga, R.; Putaux, J.-L.; Caro, G.; Mondragon, I.; Gañán, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydr. Polym.* 2011, 84, 96–102.
- 131 Rowen, J. W., Hunt, C. M., Plyler, E. K.. J . Research Natl. Bur. Standards, 39, 133 (1947)
- 132 Forziati, F. H., Rowen, J. K., J . Research Natl. Bur. Standards 46,38 (1951).
- 133 O’Connor, R. T., DuPre, E. F., McCall, E. R., AXAL CHEM. 29, 998, (1957)
- 134 Tsuboi, M., J . Polymer Sci. 25, 159, (1957).
- 135 Liang, C. Y., Marchessault, R. H., J . Polymer Sci. 37, 385 (1969).
- 136 Stacey, hI., Division of Cellulose Chemistry, 135th Meeting, ACS, Boston, Mass., (1959)

- 137 Sundararajan B., Ranjitha Kumari B.D. Novel synthesis of gold nanoparticles using *Artemisia vulgaris* L. leaf extract and their efficacy of larvicidal activity against dengue fever vector *Aedes aegypti* L. *J. Trace Elem. Med. Biol. Organ Soc. Miner. Trace Elem.* 2017;43:187–196. doi: 10.1016/j.jtemb.2017.03.008.
- 138 Vanaraj S., Jabastin J., Sathiskumar S., Preethi K. Production and Characterization of Bio-AuNPs to Induce Synergistic Effect Against Multidrug Resistant Bacterial Biofilm. *J. Clust. Sci.* 2017;28:227–244. doi: 10.1007/s10876-016-1081-0.
- 139 Alam M.N., Das S., Batuta S., Roy N., Chatterjee A., Mandal D., Begum N.A. *Murraya koenigii* Spreng. Leaf Extract: An Efficient Green Multifunctional Agent for the Controlled Synthesis of Au Nanoparticles. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2014;2:652–664. doi: 10.1021/sc400562w.
- 140 Vijayashree I.S., Niranjana P., Prabhu G., Sureshababu V.V., Manjanna J. Conjugation of Au Nanoparticles with Chlorambucil for Improved Anticancer Activity. *J. Clust. Sci.* 2017;28:133–148. doi: 10.1007/s10876-016-1053-4.
- 141 Karuppiyah C., Palanisamy S., Chen S.-M., Emmanuel R., Muthupandi K., Prakash P. Green synthesis of gold nanoparticles and its application for the trace level determination of painter's colic. *RSC Adv.* 2015;5:16284–16291. doi: 10.1039/C4RA14988B.
- 142 Gopinath K., Venkatesh K.S., Ilangovan R., Sankaranarayanan K., Arumugam A. Green synthesis of gold nanoparticles from leaf extract of *Terminalia arjuna*, for the enhanced mitotic cell division and pollen germination activity. *Ind. Crops Prod.* 2013;50:737–742. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.08.060
- 143 Arunachalam K.D., Annamalai S.K., Hari S. One-step green synthesis and characterization of leaf extract-mediated biocompatible silver and gold nanoparticles from *Memecylon umbellatum*. *Int. J. Nanomed.* 2013;8:1307–1315. doi: 10.2147/IJN.S36670.
- 144 Philip D. Rapid green synthesis of spherical gold nanoparticles using *Mangifera indica* leaf. *Spectrochim. Acta Part. A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2010;77:807–810. doi: 10.1016/j.saa.2010.08.008.
- 145 Khalil M.M.H., Ismail E.H., El-Magdoub F. Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract: 1st Nano Updates. *Arab. J. Chem.* 2012;5:431–437. doi: 10.1016/j.arabjc.2010.11.011.

- 146 Nune SK, Chanda N, Shukla R, Katti K, Kulkarni RR, Thilakavathi S, Mekapothula S, Kannan R, Katti KV. Green Nanotechnology from Tea: Phytochemicals in Tea as Building Blocks for Production of Biocompatible Gold Nanoparticles. *J Mater Chem*. 2009 Jun 1;19(19):2912-2920. doi: 10.1039/b822015h. PMID: 20161162; PMCID: PMC2737515.
- 147 P. Prema, T. Boobalan, A. Arun, K. Rameshkumar, R. Suresh Babu, V. Veeramanikandan, Van-Huy Nguyen, P. Balaji, Green tea extract mediated biogenic synthesis of gold nanoparticles with potent anti-proliferative effect against PC-3 human prostate cancer cells, *Materials Letters*, Volume 306, 2022, 130882, ISSN 0167-577X, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.130882>.
- 148 Ajdari, N., Vyas, C., Bogan, S. L., Lwaleed, B. A., & Cousins, B. G. (2017). Gold nanoparticle interactions in human blood: a model evaluation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(4), 1531–1542. doi:10.1016/j.nano.2017.01.019.
- 149 Unser, S.; Bruzas, I.; He, J.; Sagle, L. Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing: Current Challenges and Approaches. *Sensors* **2015**, *15*, 15684-15716. <https://doi.org/10.3390/s150715684>
- 150 S. Alex and A. Tiwari, “Functionalized gold nanoparticles: synthesis, properties and applications a review,” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 15, no. 3, pp. 1869–1894, 2015.
- 151 K. L. Shuford, M. A. Ratner, and G. C. Schatz, “Multipolar excitation in triangular nanoprisms,” *J. Chem. Phys.*, vol. 123, no. 11, p. 114713, 2005.
- 152 M. Hu, J Chen, ZY li, L Au, G Hartland, X Li, M Marquez, and Y Xia, “Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, no. 11, pp. 1084–1094, 2006.
- 153 A. Safaei, “The effect of the averaged structural and energetic features on the cohesive energy of nanocrystals,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 759–776, 2010
- 154 Subara, Deni & Jaswir, Irwandi. (2018). Gold Nanoparticles: Synthesis and application for Halal Authentication in Meat and Meat Products. 8 (2018). 10.18517/ijaseit.8.4-2.7055.