

Caracterización estructural y funcional de nanopartículas de ZnO-EPS sintetizadas a partir de exopolisacáridos producidos por *Lactiplantibacillus fabifermentans* BAL-27-ITTG

Structural and functional characterization of ZnO-EPS nanoparticles synthesized from exopolysaccharides produced by *Lactiplantibacillus fabifermentans* BAL-27-ITTG

Diana Patricia Méndez-Díaz¹, Federico Antonio Gutiérrez-Miceli¹, Lucía María Cristina Ventura-Canseco¹, Miguel Abud-Archila¹, Benjamín Valdez-Salas², María Candelaria Morales-Ruiz¹, María Celina Luján-Hidalgo^{1*}

¹ Tecnológico Nacional de México/IT. de Tuxtla Gutiérrez, Carr. Panamericana km 1080, C.P. 29050, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

² Universidad Autónoma de Baja California/Instituto de Ingeniería, Calle de la Normal s/n Colonia Insurgentes Este, C.P. 21280, Mexicali, Baja California, México.

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) can be used as reducing agents and stabilizers, improving the physical and chemical properties of metallic nanoparticles. This study aimed to synthesize and evaluate the physicochemical, structural, and functional characteristics of ZnO particles obtained from EPS produced by *Lactiplantibacillus fabifermentans* BAL-27-ITTG. The structural characterization of the EPS exhibited a high molecular weight structure composed mainly of mannose and glucose, possibly linked by α -1-4, α -1-3, α -1-6 according to the RMN spectrum. The increase in EPS concentration during the synthesis leads to an increase of particle size at micrometric scale, decreasing the polydispersity index. The synthesis was confirmed with a UV-vis spectral scan, while the FT-IR spectrum showed absorption peaks at 600 cm^{-1} associated with the Zn-O bond. Synthesized nano (NP) and microparticles (MP) showed improved functional characteristics comparing to free EPS. The highest values of antioxidant activity (80.25 %), water holding capacity (3.06 g H₂O/g sample), emulsifying activity (69.85 %), and flocculant activity (69.07 %) were obtained from MpZnO-EPS synthesized with a concentration of 6 mg/mL of the reducing agent. Bacteriostatic activity was observed against *S. aureus* and *L. fabifermentans*. The absence of hemolysis confirms the biocompatibility of the particles.

Keywords: Particles, zinc oxide, exopolysaccharides, *Lactiplantibacillus*.

RESUMEN

Los exopolisacáridos (EPS) pueden ser utilizados como agentes reductores confiriendo mejores propiedades físicas y químicas a las nanopartículas metálicas. Este estudio tuvo como objetivo sintetizar y evaluar las características fisicoquímicas, estructurales y funcionales de nanopartículas de ZnO producidas con EPS de *Lactiplantibacillus fabifermentans* BAL-27-ITTG. La caracterización estructural de los EPS exhibió una estructura de alto peso molecular compuesta principalmente de manosa y glucosa con enlaces α -1,4, α -1,3, α -1,6 de acuerdo con el espectro de RMN. El aumento de la concentración de EPS en la síntesis provoca el incremento en el tamaño de las

partículas en escala micrométrica disminuyendo el índice de polidispersidad. La síntesis de las nanopartículas se confirmó mediante un barrido espectral UV-vis y el espectro FT-IR mostró picos de absorción a 600 cm^{-1} asociados al enlace Zn-O. Las nano (NP) y micropartículas (MP) sintetizadas mostraron actividades funcionales mejoradas respecto al EPS libre. Los valores máximos en actividad antioxidante (80.25 %), capacidad de retención de agua (3.06 g H₂O/g muestra), actividad emulsionante (69.85 %) y actividad floculante (69.07 %) se obtuvieron con las MpZnO-EPS sintetizadas con 6 mg/mL del agente reductor. La actividad bacteriostática fue observada contra *S. aureus* y *L. fabifermentans*. La ausencia de hemólisis confirmó la biocompatibilidad de las partículas.

Palabras clave: Partículas, óxido de zinc, exopolisacáridos, *Lactiplantibacillus*.

INTRODUCCIÓN

El rápido desarrollo de la nanotecnología ha captado el interés de la comunidad científica mundial debido a las propiedades únicas de las nanopartículas como son el tamaño reducido, mayor área superficial, cristalinidad, entre otras; además de haber demostrado aplicaciones como agentes antimicrobianos, antioxidantes y catalíticos (Abinaya *et al.*, 2018). La diversidad de aplicaciones de las nanopartículas metálicas en diversos campos ha resultado muy atractiva para el sector alimentario, el cual constantemente requiere de innovación y mejora en sus productos. Las nanopartículas de ZnO se han convertido en una de las nanopartículas de óxido metálico más novedosas en aplicaciones biológicas, así como, en recubrimientos, pigmentos y aditivos alimentarios, además, por su excelente biocompatibilidad y baja toxicidad (Bajpai *et al.*, 2018). La funcionalidad de las nanopartículas depende en gran medida de sus características, las cuáles son adquiridas o mejoradas a través del control de propiedades como el tamaño, química superficial y distribución. Es por ello que, los métodos de síntesis son determinantes para obtener nanopartículas con características deseables y homogéneas (Jo *et al.*, 2015). La síntesis verde a base de extractos vegetales se ha destacado sobre el uso de otros

*Autor para correspondencia: María Celina Luján-Hidalgo

Correo-e: maria.lh@tuxtla.tecnm.mx

Recibido: 25 de enero de 2023, Aceptado: 4 de Julio de 2023,

Publicado: 1 de septiembre de 2023

agentes reductores, debido a la fácil disposición del material vegetal, alto contenido de compuestos reductores y su bajo costo. Sin embargo, tiene la desventaja de producir nanopartículas polidispersas, lo anterior como consecuencia de la amplia diversidad de compuestos fitoquímicos, lo cual limita principalmente su aplicación biológica (Salunke *et al.*, 2014). Por ello, los agentes reductores de origen microbiano están recibiendo un especial interés y de forma particular, los exopolisacáridos bacterianos. Dichas matrices poliméricas (exopolisacáridos) confieren mejores propiedades físicas y químicas a las nanopartículas metálicas ya que tienen una composición estructural homogénea, dado que se producen bajo condiciones controladas (Ates, 2015). Los exopolisacáridos producidos por bacterias ácido-lácticas (BAL) reconocidos como seguros (GRAS), representan un potencial biotecnológico. Además, destacan por sus propiedades funcionales sobresalientes como agentes estabilizantes, emulsionantes, floculantes, por su capacidad de retención de agua, así como, por su actividad antioxidante y antimicrobiana, y en conjunto, con las propiedades sobresalientes de las nanopartículas de ZnO, podrían potencializar su funcionalidad. Las cepas del género *Lactiplantibacillus* son reconocidas por ser productoras de exopolisacáridos (Silva *et al.*, 2019). Previamente, se ha reportado el aislamiento de la cepa de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG, una cepa aislada de una bebida autóctona del estado de Chiapas en México, que ha presentado propiedades de interés como resistencia a antibióticos, supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas, además de una destacada producción de EPS (Ramírez-Pérez *et al.*, 2022). Por ello, en la presente investigación se planteó, sintetizar nanopartículas de ZnO empleando exopolisacáridos producidos por *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG como agente reductor y estabilizador, para evaluar las características estructurales y funcionales de las nanopartículas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

Las cepas de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG y *S. aureus* fueron obtenidas del cepario del Tecnológico Nacional de México campus Tuxtla Gutiérrez (Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México). Todos los reactivos y estándares usados fueron grados analíticos obtenidos de Sigma Aldrich. Los medios de cultivo empleados fueron adquiridos de Difco™. El kit para la determinación de hemoglobina glicada (Ref. TK43090) fue adquirido de SPINREACT. Los aceites comerciales fueron adquiridos en un supermercado local.

Obtención de los exopolisacáridos de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG

Lpb. fabifermentans BAL-27-ITTG se obtuvo del cepario del Laboratorio de Investigación del Tecnológico Nacional de México campus Tuxtla Gutiérrez. La cepa fue reactivada realizando un inóculo del cultivo (10 % v/v) en caldo MRS (BD Difco™, EUA), seguido de una incubación a 36 °C (IEC- 42c Lumistell, MX), con agitación constante a 200 rpm (Max Q200 Thermo Scientific™, EUA). Una vez reactivada la cepa, se rea-

lizó el cultivo en biorreactor de tanque agitado (Z611000310 Applikon, Holanda) bajo condiciones controladas (pH 6 ± 0.1, 36 °C, 200 rpm) por 8 h en caldo MRS (Gutiérrez-Sarmiento *et al.*, 2020). Posteriormente, el caldo obtenido fue centrifugado (Z-236K Hermle, Alemania) a 4500 rpm durante 30 min a 4 °C para separar la biomasa. El sobrenadante con EPS fue tratado con etanol absoluto en una relación 3:5 (v/v) y se dejó reposar durante 12 h a 4 °C. Para separar los EPS, la mezcla fue centrifugada (4500 rpm, 30 min, 4 °C) y el precipitado obtenido fue dispersado en 40 mL de agua destilada, se adicionó etanol en una relación 1:1 (v/v) y se dejó reposar por 12 h a 4 °C. La solución fue centrifugada (4500 rpm, 30 min a 4 °C) y los EPS precipitados se dispersaron en agua destilada de acuerdo con las condiciones antes descritas. Posteriormente, ácido tricloroacético al 80 % (v/v) fue adicionado en una relación 10 % (v/v) a la solución de EPS y se dejó reposar durante 4 h a 4 °C. La solución final fue centrifugada (4500 rpm, 30 min, 4 °C) y el sobrenadante con EPS se ajustó a pH 7 con NaOH 3 M, para después añadir 2 volúmenes de etanol absoluto y se dejó reposar por 12 h a 4 °C. La solución final se centrifugó (4500 rpm, 30 min, 4 °C) y los EPS se congelaron y liofilizaron para análisis posteriores (Yilmaz y Simsek, 2020).

Caracterización estructural de los exopolisacáridos de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG

Contenido de monosacáridos por HPLC

La composición de monosacáridos de los EPS se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (Serie 200 Perkin Elmer, EUA) con detector de índice de refracción (HPLC-IR) siguiendo la metodología reportada por Seedeve *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Se dispersaron 50 mg de EPS en 1 mL de agua destilada al cual se le adicionaron 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 4 M. La mezcla se calentó (Cimarec™ Thermo Scientific™, EUA) durante 3 h a 100 °C. Posteriormente, la mezcla se secó (Cimarec™ Thermo Scientific™, EUA) a 50 °C para eliminar el TFA. La muestra hidrolizada se resuspendió en 1 mL de agua destilada grado HPLC y se inyectaron 20 µL al HPLC. Se empleó una columna amino kromasil 100-5-NH₂. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo:agua (90:10 v/v) a un flujo de 1 mL/min en modo isocrático durante 60 min a 40 °C. La identificación de los azúcares se realizó por comparación de los tiempos de retención con estándares de ramnosa, glucosa, fructosa, xilosa, manosa y galactosa (Sigma Aldrich, EUA).

Determinación del peso molecular de los EPS

El peso molecular de los EPS fue calculado mediante la determinación de la viscosidad intrínseca [η] según Azim *et al.* (2018). Para lo cual se preparó una solución estándar de EPS (0.1 % p/v) en NaCl (0.1 M). A partir de la solución estándar se prepararon diluciones entre 0.01 - 1.00 (mg/mL) a las cuales se les determinó la viscosidad empleando un reómetro (HR-2 TA Instruments Discovery, EUA) de geometría de plato paralelo (40 mm de diámetro) con espacio (gap) de 1000 µm a 25 °C y a una velocidad constante de 62.1 s⁻¹. La viscosidad relativa n(rel) se calculó con la Ecuación 1, la viscosidad espe-

cífica $n(\text{sp})$ con la Ecuación 2 y la viscosidad reducida $n(\text{red})$ con la Ecuación 3.

$$n(\text{rel}) = \frac{n(\text{solución})}{n(\text{solvente})} \quad (1)$$

$$n(\text{esp}) = n(\text{rel}) - 1 \quad (2)$$

$$n(\text{red}) = \frac{n(\text{esp})}{c} \quad (3)$$

Resonancia magnética nuclear de ^1H y FT-IR

Para determinar la configuración de los enlaces glucosídicos presentes en la estructura del EPS de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG, el análisis por resonancia magnética nuclear de ^1H se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Murru (2021), para lo cual se utilizó un equipo de resonancia magnética nuclear (DD2 Agilent, EUA) de 500 MHz. El análisis se realizó a 25 °C usando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3). Así mismo, la técnica de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) se empleó para identificar los grupos funcionales presentes en la molécula del EPS.

Síntesis de nanopartículas de ZnO-EPS

Para la síntesis de las nanopartículas de ZnO-EPS (NpZnO-EPS) se emplearon como agentes reductores los EPS extraídos evaluando su efecto a tres concentraciones diferentes (1, 3 y 6 mg/mL) en las características físicas de las nanopartículas (NPs) y en sus propiedades funcionales. Para lo cual se preparó una solución de ZnSO_4 0.1 M y se mezcló con el agente reductor en una relación 35:15 v/v. La solución obtenida se ajustó a pH 9 con NaOH 3 M agitando vigorosamente durante 10 min y se esterilizó en autoclave (CV 300 AESA, MX) durante 1 h a 15 lb/in². Posteriormente, la solución se centrifugó (4500 rpm, 20 min, 4 °C) y las nanopartículas precipitadas se lavaron 2 veces con etanol absoluto (50 mL) y con agua destilada (50 mL), centrifugando después de cada lavada. Las nanopartículas precipitadas se resuspendieron en agua destilada y se secaron a 40 °C (Sathiyarayanan *et al.*, 2017).

Caracterización de las NpZnO-EPS

La síntesis de las NpZnO-EPS se confirmó realizando un barrido espectral (200-800 nm) en un espectrofotómetro UV-Vis (DU-730 Beckman Coulter, EUA) según Estudillo-Díaz *et al.* (2023). El análisis espectral FT-IR se registró a una resolución de 500 a 4000 cm^{-1} utilizando un espectrómetro FT-IR (Nicolet iS10 Thermo Scientific, EUA), para identificar la vibración del enlace Zn-O. El tamaño hidrodinámico de las partículas y el índice de polidispersidad (PDI) se determinaron mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) (Abinaya *et al.*, 2018).

Funcionalidad de las NpZnO-EPS

Capacidad de retención de agua (CRA) de las NPZnO-EPS

La CRA se evaluó siguiendo la metodología reportada por Jiang *et al.* (2021) con algunas modificaciones. 75 mg de NpZnO-EPS se disolvieron en 1.5 mL de agua tridestilada. Posteriormente, las muestras se agitaron vigorosamente durante 10 min y fueron centrifugadas (10000 rpm, 15 min, 4 °C). El sobrenadante se separó y se pesó el precipitado de muestra húmeda. La CRA se calculó de acuerdo con la Ecuación 4:

$$CRA \left(\frac{g \text{ H}_2\text{O}}{g \text{ muestra}} \right) = \frac{\text{Peso muestra húmeda} - \text{Peso de muestra seca}}{\text{Peso total de muestra seca}} \quad (4)$$

Actividad floculante (AF) de las NPZnO-EPS

La AF de las NpZnO-EPS se determinó preparando soluciones de NpsZnO-EPS y del EPS libre a 1 mg/mL ajustando a pH 8 con NaOH 1 M. Cada mezcla fue sonicada (08855-10 Cole-Parmer, EUA) por 30 min a temperatura ambiente y frecuencia de 40 Hz. Posteriormente, se agregaron 0.5 mL de cada solución de NpZnO-EPS, 0.5 mL de CaCl_2 (0.007 M) y 8 mL de carbón activado (6 mg/mL). La mezcla se agitó durante 2 min y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia a 550 nm del sobrenadante se determinó según Patil *et al.* (2011). La calibración del espectrofotómetro (DU-730 Beckman Coulter, EUA) se realizó usando una solución 1:1 (v/v) de CaCl_2 y H_2O destilada a pH 8 ajustado con NaOH 1 M. Como blanco se usó una mezcla de 0.5 mL de CaCl_2 , 8 mL de carbón activado y 0.5 mL de H_2O destilada. Los resultados se reportaron como porcentaje de floculación (Ecuación 5).

$$AF (\%) = \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs blanco}} * 100 \quad (5)$$

Actividad antioxidante de las NPZnO-EPS

La capacidad de captación de radicales DPPH de las NpZnO-EPS se determinó de acuerdo con Li *et al.* (2014) para lo cual se prepararon soluciones de nanopartículas de ZnO-EPS y de EPS libre (1 mg/mL) las cuales se ajustaron a pH 2 con HCl 1 M. Una alícuota de 1 mL de solución de DPPH metanólico (5×10^{-5} M) se mezclaron con 2 mL de las soluciones de NpZnO-EPS y EPS libre. Las soluciones se mezclaron (VORTEX 3 IKA, CHN) vigorosamente y se incubaron por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia de cada muestra se determinó por espectrofotometría a 517 nm. Los resultados fueron calculados con la Ecuación 6:

$$\text{Actividad antioxidante} (\%) = \left[1 - \frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco})}{\text{Abs control}} \right] * 100 \quad (6)$$

Dónde:

Abs_{muestra}: 1 mL de DPPH + 2 mL de la solución de NPZnO-EPS

Abs_{blanco}: 2 mL de la solución de EPS + 2 mL de metanol

Abs_{control}: 1 mL de DPPH + 2 mL de metanol

Actividad antimicrobiana de las NPZnO-EPS

La actividad antimicrobiana de las NpZnO-EPS se determinó de acuerdo con la metodología reportada por Solorzano-Toalá *et al.* (2020) con algunas modificaciones. Cultivos microbianos de *S. aureus* ATCC 35556 y *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG fueron sembrados en agar nutritivo (BD Difco™, EUA) y Agar MRS (BD Difco™, EUA), respectivamente. Tras el crecimiento, se tomaron asadas de las colonias microbianas para resuspenderlas en agua peptonada, se tomaron alícuotas de 0.1 mL de cada cultivo y se inocularon masivamente en cajas Petri con agar nutritivo y agar MRS, respectivamente. Posteriormente, se colocaron discos de papel filtro estériles de 10 mm de diámetro y se agregaron 0.02 mL de solución de EPS libre, ZnSO₄ y NpZnO-EPS a concentraciones de 0.5, 0.75, 1 y 1.5 mg/mL a pH 4.5 (ajustado con HCl 1 M) para mejorar la dispersión de las nanopartículas. Las cajas petri fueron incubadas durante 48 h a 36 °C. La actividad antimicrobiana se evaluó midiendo las zonas de inhibición (mm).

Actividad emulsionante (AE) de las NPZnO-EPS

Para determinar la AE de las NpZnO-EPS, diversos aceites comerciales grado alimenticio con composiciones variantes de ácidos grasos fueron empleados. Se prepararon soluciones de NpZnO-EPS al 1.5 % (p/v) y se adicionaron 2 mL de cada aceite. Posteriormente, las suspensiones fueron agitadas en un vórtex (VORTEX 3 IKA, China) durante 5 min. La AE se calculó a la 1, 24 y 48 h (Kavitake *et al.*, 2020) lo que permitió determinar la estabilidad de la emulsión. Los resultados fueron calculados de acuerdo con la siguiente Ecuación 7:

$$AE (\%) = \frac{\text{Altura de la capa de emulsión}}{\text{Altura total de la mezcla}} * 100 \quad (7)$$

A las 24 y 48 h se tomó una alícuota (0.1 mL) de la emulsión y fue observada al microscopio óptico con la lente de objetivo 40x.

Citotoxicidad de las NPZnO-EPS

La citotoxicidad de las NpsZnO-EPS se determinó evaluando el porcentaje de hemólisis en muestras de sangre humana (Khan *et al.*, 2015). El ensayo hemolítico fue realizado con un kit comercial (Spinreact, España) para determinación de hemoglobina glicada (HbA_{1c}). Una muestra de 5 mL de sangre fue utilizada para cada ensayo al cual se le adicionó 1.5 mg de EDTA/mL de sangre para su estabilización y conservación. Una solución de nanopartículas resuspendidas (0.03, 0.15, 0.3 mg/mL), ZnSO₄ (0.15 mg/mL) y EPS libre (0.3 mg/mL) fueron puestas en contacto con la muestra de acuerdo con las instrucciones del kit comercial y se determinó la absorbancia a 660 nm. Los resultados se expresaron en porcentaje de hemólisis (Ecuación 8):

$$\text{Hemólisis} (\%) = \frac{\text{Hemoglobina sin tratamiento} - \text{Hemoglobina tratada}}{\text{Hemoglobina sin tratamiento}} * 100 \quad (8)$$

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) utilizando el software Statgraphics Centurion XVI. La prueba de Tukey se utilizó para evaluar la diferencia entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los exopolisacáridos producidos por *Lpb. fabifermentans*

El rendimiento de exopolisacáridos producidos por *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG fue 375.64 ± 0.025 mg/L. Como es reportado, la producción y composición del EPS son influenciadas fuertemente por las condiciones de cultivo: como temperatura, pH y la composición del medio de cultivo en términos de fuente de carbono, nitrógeno, minerales y vitaminas (Zisu y Sha, 2003). El rendimiento de exopolisacáridos para diversas especies de *Lpb. plantarum* se ha reportado en el rango de 31 a 859 mg/L producidos en medio de cultivo MRS (Jurasková *et al.*, 2021). Sin embargo, optimizando las condiciones de cultivo, empleando caldo MRS suplementado con sacarosa (23 g/L), pH de 7.4 y tiempos de cultivo de 48 a 50 h se han reportado rendimientos de hasta 1380 ± 0.06 mg/L y 1070 ± 0.01 mg/L para *Lpb. plantarum* YO175 y OF101 respectivamente (Adesulu-Dahunsi *et al.*, 2018). Por lo que, es posible obtener mejores rendimientos para *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG optimizando las condiciones de cultivo.

El análisis de la composición de monosacáridos realizado por HPLC indicó que el EPS de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG es un heteropolisacárido compuesto por fracciones de manosa, glucosa, xilosa, ramnosa y fructosa. Dicha composición está determinada por la variación genética, la actividad enzimática que cataliza la biosíntesis, así como, por las condiciones de cultivo según lo reportaron Zisu y Sha (2003). Los heteropolisacáridos de bacterias ácido-lácticas en general comparten unidades repetitivas de monosacáridos, principalmente manosa y glucosa como se evidencia en cada una de las especies reportadas comparadas con el EPS de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG.

En el espectro FT-IR del exopolisacárido de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG (Figura 1), se observaron bandas características a 3282 y 2936 cm⁻¹, asociadas a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H y C-H respectivamente. La banda de absorción a 1661 cm⁻¹ se atribuye a la vibración de estiramiento del grupo C=O. La banda a 1338 cm⁻¹ se asocia a la vibración del ángulo variable del enlace C-H (Zhang *et al.*, 2021). En la zona de huella dactilar la región comprendida de 1200 a 900 cm⁻¹ se asocia a vibraciones de enlaces glucosídicos (-COC enlace glucosídico éter, -CO alcohol primario, C1-H carbono anomérico), especialmente de α-piranosidos (Leonia *et al.*, 2013). En la región anomérica (950-700 cm⁻¹) el pico de absorción a 828 cm⁻¹ está relacionado con enlaces β-glucosídicos que se asocia con la presencia de β-D-glucanos y las bandas de absorción cercanos a 804 cm⁻¹ también sugieren la presencia de manosa (Zhang *et al.*, 2021). La presencia de dichos grupos funcionales confirma la presencia

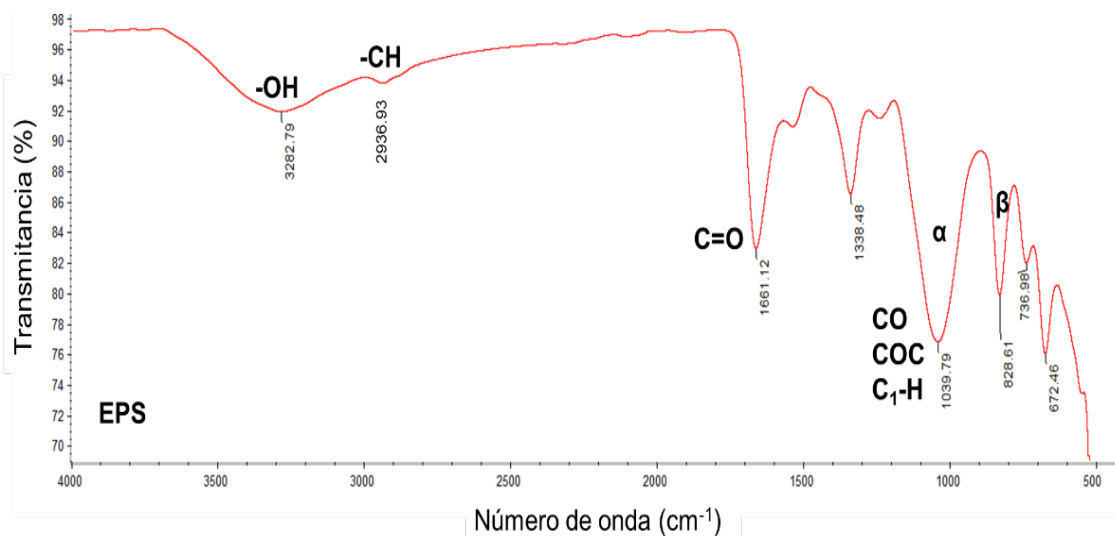


Figura 1. Espectro FT-IR del EPS de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG.
Figure 1. FTIR spectrum of EPS produced by *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG.

de monosacárido con poder reductor para la síntesis de las nanopartículas.

El espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H sugiere la posible configuración de los enlaces glucosídicos presentes en los EPS producidos por *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG. En la Figura 2 se observan señales de protones anoméricos en la región de desplazamiento químico (δ) entre 4.4-5.25 ppm, confirmando la presencia de polisacáridos (Zhang *et al.*, 2021). Se ha reportado, que la configuración α generalmente aparece a (δ) 4.8-5.6 ppm y la configuración β en δ 4.4-4.8 ppm (Senturk *et al.*, 2019). Para especies de *L. plantarum* se ha reportado que los desplazamientos químicos en 4.9, 5.07 y 5.2 ppm se asocian a enlaces α -1,6, α -1,3 y α -1,4 respectivamente (Senturk *et al.*, 2019), lo que sugiere la posible presencia de estos enlaces en la estructura del EPS de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG. Por otro lado, el despla-

zamiento químico comprendido entre 4.4-4.5 ppm del espectro de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG, puede asociarse a enlaces β -glucosídicos o grupos oximetilo. Alvarado (2015) reportó que en el espectro de ^1H -RMN para β -glucanos, los desplazamientos químicos de 3.3-4.5 ppm corresponden a enlaces β -1,6, por lo que las señales entre (δ) 4.4-4.5 ppm del espectro de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG podrían ser más afines a enlaces β -glucosídicos. La señal intensa que se presenta entre 4.6 y 4.8 ppm en el espectro de ^1H -RMN se debe al disolvente empleado CDCl_3 (Alvarado, 2015).

Finalmente, el peso molecular promedio (Mw) determinado de manera indirecta por la viscosidad aparente $[\eta]$ medida experimentalmente (1.3 ± 0.7), dio como resultado un peso molecular promedio de 2.7 ± 0.57 MDa, el cual se encuentra dentro del intervalo reportado para bacterias ácido lácticas que van desde pesos moleculares de 10^4 a 10^6 Da y

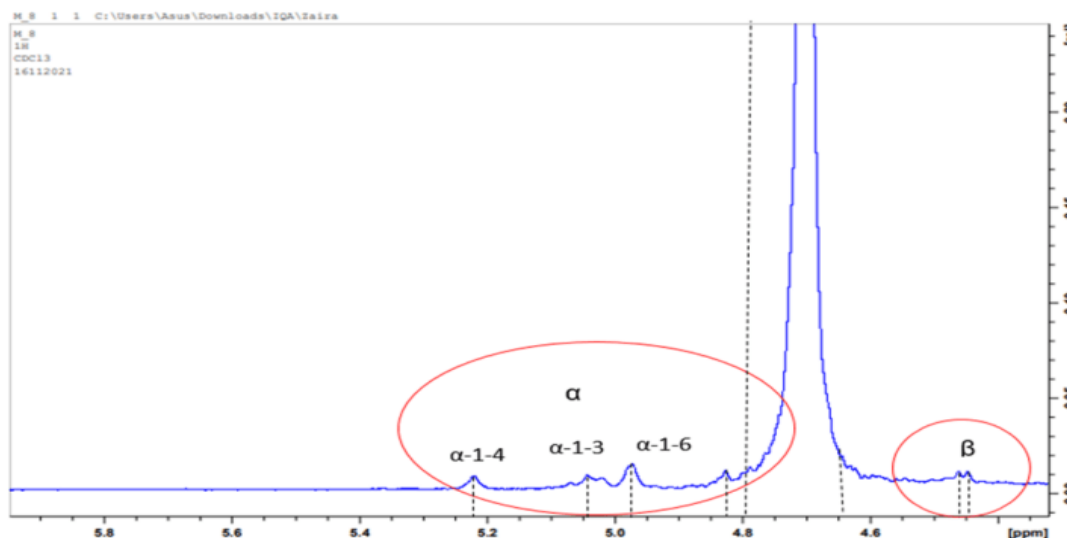


Figura 2. Espectro RMN- ^1H del EPS de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG.
Figure 2. RMN- ^1H spectrum of EPS produced by *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG.

clasificándose como un EPS de alto peso molecular (Ismail y Nampoothiri, 2014).

Caracterización de las nanopartículas ZnO-EPS

La síntesis verde de NpZnO-EPS se evidenció mediante la aparición de una suspensión coloidal de color blanco (Abinaya *et al.*, 2018). El barrido espectral UV-Vis de la solución coloidal confirmó la formación de las NpZnO-EPS observándose el desplazamiento de las bandas de absorción en un rango de 315 - 440 nm con un máximo de absorción a 375 nm, lo cual es consistente con las bandas de absorción características para las nanopartículas de ZnO (Figura 3) (Jayachandran y Nair, 2021). Estas bandas se han atribuido al efecto de resonancia de plasmón superficial, ya que las nanopartículas metálicas tienen electrones libres que producen una banda de absorción generada por la vibración mutua de los electrones de las nanopartículas en resonancia con la onda de luz. El pico de absorción del EPS libre se observó a 295 nm y se asocia con transiciones electrónicas $n-\sigma^*$ y/o $\pi-\pi^*$, que se encuentran en los grupos funcionales como carboxilo, carbonilo y éster asociados a los grupos funcionales de los EPS (Trabelsi *et al.*, 2019).

Por otra parte, los óxidos metálicos generalmente exhiben bandas de absorción en la región IR por debajo de 1000 cm^{-1} (Mahamuni *et al.*, 2019). Las vibraciones de estiramiento del enlace Zn-O de las NPs sintetizadas con EPS de *Lpb. fabifermentas* mostraron vibraciones de estiramiento a 596, 601 y 600 cm^{-1} correspondientes a las nanopartículas sintetizadas con 1, 3 y 6 mg/mL de EPS, respectivamente. Las diferencias en el número de onda y frecuencia pueden deberse a los tamaños de las nanopartículas según lo reportaron Chithra *et al.* (2015).

El efecto de la concentración del EPS como agente reductor y estabilizador en la síntesis de NpZnO-EPS, se reflejó en el tamaño hidrodinámico de las NPs, así como, en el índice de polidispersidad (PDI). El PDI disminuyó significativamente conforme aumentó la concentración de EPS en la síntesis de las partículas de ZnO (Tabla 1), obteniéndose una distribución de tamaños homogénea (Figura 4). Los resultados indi-

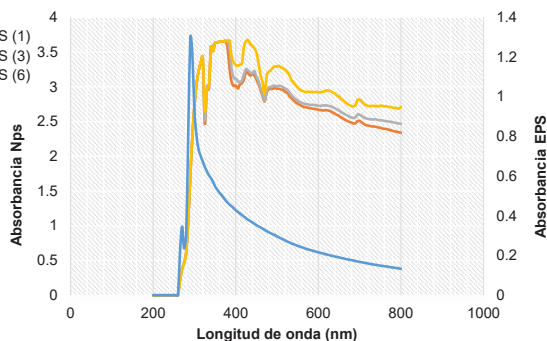


Figura 3. Espectro de absorción UV-Vis de las nanopartículas de ZnO-EPS. Las NpZnO-EPS (1), NpZnO-EPS (3), NpZnO-EPS (6) corresponden a las nanopartículas sintetizadas con EPS a 1, 3 y 6 mg/mL respectivamente.

Figure 3. ZnO-EPS nanoparticles UV-Vis absorption spectrum. NpZnO-EPS (1), NpZnO-EPS (3), NpZnO-EPS (6) correspond to EPS-synthesized nanoparticles at 1, 3 and 6 mg/mL respectively.

Tabla 1. Diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad (PDI) de las partículas de ZnO-EPS.

Table 1. Hydrodynamic diameter and polydispersity index (PDI) of ZnO-EPS particles.

Tratamiento	Muestra (%)	Diámetro hidrodinámico (μm)	PDI
NpZnO-EPS (1 mg/mL)	65	0.00962 ± 0.00264	$2.630a \pm 1.68$
MpZnO-EPS (3 mg/mL)	100	1.92 ± 0.397	$0.053b \pm 0.009$
MpZnO-EPS (6 mg/mL)	100	1.43 ± 0.235	$0.050b \pm 0.003$

Letras diferentes por columna tienen diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$).

can, que las concentraciones de EPS (3 y 6 mg/mL) formaron micropartículas (MpZnO-EPS). Por otro lado, el aumento en el diámetro hidrodinámico de escala nano a micropartículas podría atribuirse a la adsorción de macromoléculas (EPS) sobre la superficie de las partículas que tienden a aumentar el tamaño hidrodinámico aparente (RH) de las partículas. Este aumento podría estar asociado al espesor de las macromoléculas adsorbidas (Lim *et al.*, 2013).

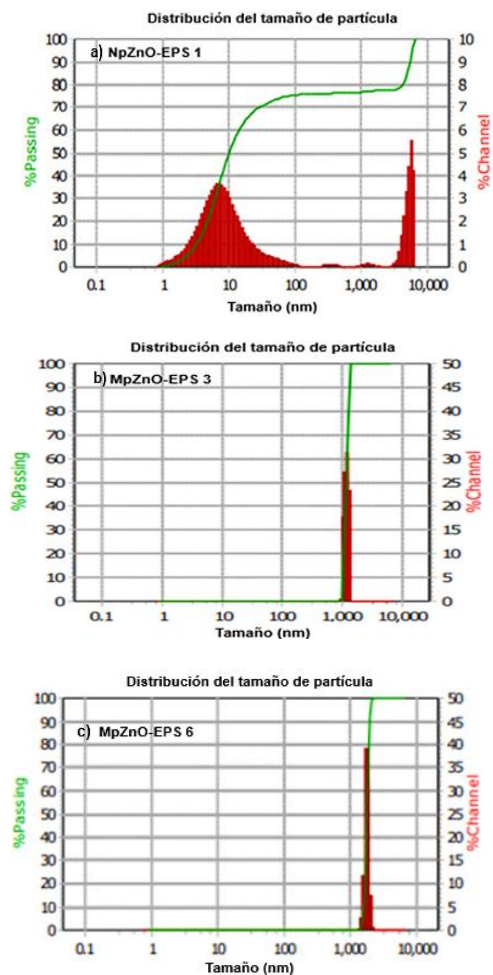


Figura 4. Distribución de tamaño de partículas. a) Nanopartículas sintetizadas con EPS a 1 mg/mL, b) Micropartículas sintetizadas con EPS a 3 mg/mL, c) Micropartículas sintetizadas con EPS a 6 mg/mL.

Figure 4. Particle size distribution. a) EPS-synthesized nanoparticles at 1 mg/mL; b) EPS-synthesized nanoparticles at 3 mg/mL; c) EPS-synthesized nanoparticles at 6 mg/mL.

Capacidad de retención de agua (CRA) de las NpZnO-EPS

La CRA es considerada una de las propiedades funcionales esenciales en el procesamiento de alimentos, ya que está directamente relacionada con la textura a través de las interacciones entre los componentes, incluidos el agua y el aceite. De acuerdo con los resultados obtenidos, conforme aumenta la concentración de EPS (1, 3 y 6 mg/mL) como agente reductor de las NPZnO-EPS, incrementa significativamente la CRA (Tabla 2) comparado con la CRA del EPS estructura libre. Los resultados mostraron que conforme va disminuyendo el PDI en las nanopartículas, la dispersión de tamaños se vuelve más controlada y las partículas se vuelven mucho más activas debido al crecimiento del área de superficie total con ello el número de centros activos y su funcionalidad (Suchomel *et al.*, 2018). Los resultados muestran que las micro y nanopartículas de ZnO tienen mejor CRA, comparado con la pectina comercial, goma arábiga y almidón de trigo (1.38, 0.28 y 0.74 g H₂O/ g de muestra) respectivamente (Soua *et al.*, 2020).

Tabla 2. Capacidad de retención de agua (CRA), actividad floculante (AF) y actividad antioxidante (AA) de las nano y micropartículas de ZnO-EPS. Table 2. Water holding capacity, flocculating activity and antioxidant activity, of ZnO-EPS nano and microparticles.

Tratamiento	CRA (g H ₂ O / g muestra)	AF (%)	AA (%)
EPS	1.74 ^d ± 0.01	30.38 ^d ± 1.06	23.93 ^d ± 1.13
NpZnO-EPS (1 mg/mL)	2.46 ^c ± 0.01	47.24 ^c ± 1.04	36.92 ^c ± 0.87
MpZnO-EPS (3 mg/mL)	2.96 ^b ± 0.02	61.89 ^b ± 0.32	46.93 ^b ± 1.73
MpZnO-EPS (6 mg/mL)	3.06 ^a ± 0.02	69.07 ^a ± 1.74	80.25 ^a ± 1.56

Letras diferentes por columna tienen diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$).

Actividad floculante (AF) de las NpZnO-EPS

La AF incrementó de manera dependiente respecto a la concentración de EPS en la síntesis de las nanopartículas. La máxima AF fue 69.07 % para las MpZnO-EPS sintetizadas con 6.0 mg/L de EPS, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (Tabla 2). Esto puede estar asociado a que las nanopartículas tienen una alta relación superficie-volumen y a la presencia de los EPS a escala micrométrica y nanométrica, los cuales pueden sufrir un reordenamiento molecular, con nuevas propiedades estructurales y mayor disposición de grupos funcionales activos (Dlamini *et al.*, 2019). Aunado a ello, la carga superficial puede afectar directamente el efecto de floculación (Li *et al.*, 2020). Los EPS libre tuvieron una actividad máxima del 30.38 %, coincidiendo con la actividad floculante reportada para los EPS de *Bacillus cereus* SK (31.22 %) (Busi *et al.*, 2016). El peso molecular del EPS ($M_w = 2.7$ MDa) puede también influir, ya que se ha reportado que los polisacáridos con alto peso molecular favorecen las interacciones intramoleculares entre los segmentos del polímero a través de enlaces de hidrógeno, y generan un impedimento estérico debido al gran volumen

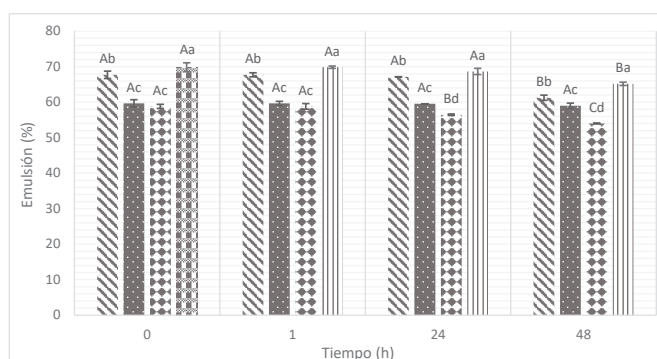
excluido de la molécula que conduce a la agregación disminuyendo las interacciones con los grupos funcionales del EPS en comparación con las nano y micro partículas de ZnO-EPS (Guo *et al.*, 2016).

Actividad antioxidante (AA) de las NpZnO-EPS

Las nano y micropartículas son altamente sensibles al pH, pudiendo generar dos fenómenos diferentes: la protonación/ionización de grupos funcionales y la degradación o escisión de enlaces lábiles (Yan y Ding, 2020). De esta manera, es posible que a pH 2 se promoviera una disociación parcial de los enlaces covalentes dativos de las NpZnO-EPS, con ello una liberación o mayor disposición de los electrones para la estabilización de radicales libres, como el DPPH (Hayat *et al.*, 2022). Los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante (AA) mostraron un aumento en la capacidad de eliminación de radicales libres proporcional a la concentración de EPS empleados para la síntesis (Tabla 2). De acuerdo con los resultados se obtuvo el 80.25 % de actividad antioxidante con las MpZnO-EPS (6 mg/mL). Para el ácido ascórbico (antioxidante comercial) se ha reportado una actividad antioxidante de 90.59 y 94.40 % a 1 y 1.5 (mg/mL) respectivamente (Njus *et al.*, 2020) por lo que, estos resultados sugieren que las MpZnO-EPS (6 mg/mL) podrían funcionar como un antioxidante comercial competitivo.

Actividad y estabilidad emulsionante de las NpZnO-EPS

Los tratamientos con nano y micropartículas de ZnO-EPS mostraron estabilidad en la AE respecto al tiempo en presencia de aceites vegetales comerciales. Las emulsiones con los aceites de oliva y canola en presencia de las MpZnO-EPS sintetizadas con 6 mg/mL de EPS, presentaron los porcentajes de emulsión más altos (Figura 5). Además, las emulsiones se mantuvieron estables durante las 48 h evaluadas, manteniendo la emulsión por encima del 50 % en comparación con las emulsiones obtenidas con los EPS libres, las cuáles sufrieron un decremento en la estabilidad a partir de las 24 h obteniendo emulsiones por debajo del 50 % después 48 h (Figura 6), porcentaje mínimo requerido para considerarse un buen agente emulsificante (De Freitas *et al.*, 2016). La estabilidad de las emulsiones podría estar asociada al área de contacto entre las MpZnO-EPS y los componentes del aceite, ya que los EPS se encuentran más compactados dentro de la partícula formando una estructura similar a una red protectora alrededor de las gotas de aceite, con una rigidez elevada que reduce la tensión superficial. Además, reportes previos indican que los ácidos grasos insaturados tienen la capacidad de mejorar la carga superficial, además de formar una película rígida en las partículas confiriendo una mayor estabilidad en la emulsión, reduciendo de esta manera la aglomeración. Este efecto fue reportado en aceite de soja con un porcentaje elevado de ácidos grasos poliinsaturados (65 %), el cual formó una emulsión con un tamaño de gota estable en un 60 % del volumen total (Zheng *et al.*, 2021). De esta manera podrían explicarse los porcentajes de emulsión elevados en los aceites de oliva y canola, en cuya composición se encuentran principalmente ácidos grasos insaturados (86.5 y 91.4 % respectivamente).



Letras minúsculas indican diferencia estadística significativa entre tratamientos ($p \leq 0.05$). Letras mayúsculas indican diferencia estadística significativa de cada tratamiento respecto al tiempo ($p < 0.05$).

Figura 5. Actividad emulsificante de MpZnO-EPS (6 mg/mL) en presencia de aceites vegetales comerciales (canola®, Aurrera®, Oliva® y Nutrioli®).

Figure 5. Emulsifying activity of MpZnO-EPS (6 mg/mL) in the presence of commercial oils (canola®, Aurrera®, Oliva® y Nutrioli®).



Figura 6. Microfotografías (40x) de la emulsión de EPS libres (izquierda) y MpZnO-EPS (derecha) después de 48 h.

Figure 6. Microphotographs (40x) of free EPS emulsion (left) and MpZnO-EPS (right) after 48 h.

Actividad antimicrobiana de las NpZnO-EPS

La cepa de *S. aureus* mostró sensibilidad a las nano y micropartículas de ZnO-EPS a concentraciones de 1 y 1.5 mg/mL, mientras que el efecto inhibitorio sobre la cepa de *Lpb. fabifermentans* BAL-27-ITTG, se observó a partir de 0.5 mg/mL para todos los tratamientos. De acuerdo con los resultados reportados, el efecto bacteriostático sobre *S. aureus* podría asociarse con la composición de la pared celular, debido a que las bacterias Gram positivas, poseen una capa de peptidoglicano más gruesa con presencia de ácido teicoico y teicurónico unidos de manera covalente, confiriendo mayor resistencia a la célula (Chapot-Chartier y Kulakauskas, 2014). La interacción de las MpZnO-EPS, es posible por procesos como la adhesión a la membrana del microorganismo, causado por fuerzas de Van der Waals, fuerzas hidrofóbicas o interacciones con proteínas, ya que, las partículas de tamaño micrométrico no se internalizan, sino que forman agregados que permanecen adheridos irreversiblemente a la membrana celular, lo que causa inhibición en la capacidad para absorber nutrientes así como también, inhibición de las vías de síntesis de proteínas, lo que lleva a la pérdida de viabilidad (Wel *et al.*, 2017). Las nanopartículas por su parte inducen una respuesta antimicrobiana debido a la interferencia en los procesos

metabólicos y la alteración de los sistemas enzimáticos, que se asocia a mecanismos de adsorción, internalización y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), lo que da como resultado la pérdida de la integridad celular y un aumento del estrés oxidativo que conduce al daño del ADN y muerte celular (Jin *et al.*, 2019).

Citotoxicidad de las NpZnO-EPS

Con relación a la citotoxicidad, la cuantificación de la hemoglobina glicosilada de las muestras tratadas con nano y micropartículas de ZnO-EPS no mostraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con respecto a la muestra control sin adición de nano y micropartículas. Lo anterior indica que no existió efecto hemolítico, sugiriendo la posible biocompatibilidad de las partículas con células sanguíneas. Resultados similares fueron reportados para nanopartículas de ZnO evaluadas a una concentración de 0.1 mg/mL en el que se reportó una viabilidad de 97 % de glóbulos rojos, posterior a su tratamiento con nanopartículas (Khan *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

Los EPS producidos por *Lpb. fabifermentans* tienen capacidad como agente reductor y estabilizador para la síntesis de nano y micropartículas ZnO-EPS, mejorando el índice de polidispersidad y controlando el tamaño de las mismas. Los EPS en forma de micropartículas presentaron una mejor actividad y estabilidad emulsionante, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana, actividad floculantes y capacidad de retención de agua en comparación con los EPS de estructura macromolecular libre, sugiriendo hemocompatibilidad para poder ser empleadas en matrices alimentarias.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece a CONAHCyT por la beca otorgada. Al Tecnológico Nacional de México (TecNM) por el financiamiento otorgado al Proyecto No. 14388.22-P.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores no tienen ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Abinaya, M., Vaseeharan, B., Divya, M., Sharmili, A., Govindarajan, M., Alharbi, N. y Benelli, G. 2018. Bacterial exopolysaccharide (EPS)-coated ZnO nanoparticles showed high antibiofilm activity and larvicidal toxicity against malaria and zika virus vectors. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 45: 93-103. doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.10.002.
- Adesulu-Dahunsi, A., Kumaraswamy, J. y Sanni, A. 2018. Production of exopolysaccharide by strains of *Lactobacillus plantarum* YO175 and OF101 isolated from traditional fermented cereal beverage. *PeerJ Publishing*. 6: e5326. doi: 10.7717/peerj.5326.
- Alvarado, V. 2015. Evaluación del exopolisacárido producido por una bacteria psicrotolerante aislada del noreste de México y sus potenciales aplicaciones industriales. [Tesis de maestría,

- Universidad Autónoma de Nuevo León]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/9408>. (Fecha de consulta: 10 de junio, 2022).
- Ates, O. 2015. Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 3: 200. doi: 10.3389/fbioe.2015.00200.
- Azim, A., Atta, A. y Khedr, M. 2018. Determination of intrinsic viscosity of polymeric compounds through a single specific viscosity measurement. *Polymer*. 39: 6827-6833. doi: 10.1016/S0032-3861(98)00184-0.
- Aziz, A., Shaniba, V. y Jayasree, P. 2020. Physico-chemical, photocatalytic and cytotoxicity evaluation of *Annona muricata* L. fruit extract derived zinc oxide nanoparticles in comparison to the commercial chemical versión. *Current Science*. 117: 1492-1504. doi: 10.18520/cs/v117/i9/1492-1504.
- Bajpai, V., Kamle, M. y Sukla, S. 2018. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *Journal of Food and Drug Analysis*. 26: 1201-1214. doi: [org/10.1016/j.jfda.2018.06.011](https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.06.011).
- Busi, S., Karuganti, S. y Pattnaik, S. 2016. Sludge settling and algal flocculating activity of extracellular polymeric substance (EPS) derived from *Bacillus cereus* SK. *Water and Environment Journal*. 31: 97-104. <https://doi.org/10.1111/wej.12215>.
- Chapot-Chartier, M. y Kulakauskas, S. 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*. 13(1): S9. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S9.
- De Freitas, R. A., Nicolai, T., Chassenieux, C. y Benyahia, L. 2016. Stabilization of water-in-water emulsions by polysaccharide-coated protein particles. *Langmuir*. 32: 1227-1232. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03761>.
- Dlamini, N., Basson, A. y Pullabhotla, V. 2019. Optimization and application of bioflocculant passivated copper nanoparticles in the wastewater treatment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 16: 2185. <https://doi.org/10.3390%2Fijerph16122185>.
- Estudillo-Díaz, E.B., Gutiérrez-Miceli, F.A., González-Mendoza, D., Valdez-Salas, B., y Abud-Archila, M. 2022. Desarrollo y caracterización de películas activas con nanopartículas de plata obtenidas mediante síntesis verde. *Biocencia*. 25: 109-115. <https://doi.org/10.18633/biocencia.v25i1.1683>.
- Gutiérrez-Sarmiento, W., Ventura-Canseco, L. M. C., Gutiérrez-Miceli, F., Luján-Hidalgo, M. C., Abud-Archila, M. y Ruiz-Valdiviezo, V. 2020. Optimization of biomass production, lactic acid, and gastrointestinal simulation survival of *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG cultured in stirred tank bioreactor. *Agrociencia*. 54:147-162.
- Guo, M.Q., Hu, X., Wang, C., y Ai, L. 2017. Polysaccharides: Structure and Solubility. En Xu, Z. (Ed.) *Solubility of Polysaccharides* (pp. 7-22). INTECH. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69863>
- Hayat, S., Ashraf, S., Zubair, M., Aslam B. y Muzammil. 2022. Biofabrication of ZnO nanoparticles using *Acacia arabica* leaf extract and their antibiofilm and antioxidant potential against foodborne pathogens. *Plos One*. 17(1): e0259190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259190>.
- Ismail, B. y Nampoothiri, K. 2014. Molecular characterization of an exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510 and its efficacy to improve the texture of starchy food. *Journal of Food Science and Technology*. 51: 4012-4018. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0928-8>
- Jay-Chithra, M., Sathya, M. y Pushpanathan, K. 2015. Effect of pH on crystal size and photoluminescence property of ZnO nanoparticles prepared by chemical precipitation method. *Acta Metallurgica Sinica*, 28: 394-404. doi: 10.1007/s40195-015-0218-8.
- Jayachandran, A. y Nair, A. 2021. Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *Cayratia pedata* leaf extract. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 26: 100995. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100995>.
- Jayawardena, B., Pandithavidana, D. y Sameera, W. 2017. Polysaccharides in solution: experimental and computational studies. En Xu, Z. (Ed.) *Solubility of Polysaccharides* (pp. 51-62). INTECH. doi: 10.5772/intechopen.69863.
- Jiang, G., Gan, L., Li, X. y Tian, Y. 2021. Characterization of structural and physicochemical properties of an exopolysaccharide produced by *Enterococcus* sp. F2 from fermented soya beans. *Frontiers in Microbiology*. 12:744007. doi: 10.3389/fmicb.2021.744007.
- Jin, J., Yang, Z., Xiong, W., Zhou, Y., Xu, R., Zhang, Y. y Zhou, C. 2019. Cu and Co nanoparticles co-doped MIL-101 as a novel adsorbent for efficient removal of tetracycline from aqueous solutions. *Science of the Total Environment*. 650: 408-418. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.434>.
- Jo, D.H., Kim, J., Lee, T. y Kim, J. 2015. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine*. 11: 1603-1611. doi: 10.1016/j.nano.2015.04.015.
- Jurasková, D., Riveiro, S. y Silva, G. 2021. Exopolysaccharides produced by Lactic acid bacteria: from biosynthesis to health-promoting properties. *Foods*. 11:156. <https://doi.org/10.3390/foods11020156>.
- Kavitake, D., Balyan, S. y Devi, P. 2020. Evaluation of oil-in-water (O/W) emulsifying properties of galactan exopolysaccharide from *Weissella confusa* KR780676. *Journal of Food Science and Technology*. 57: 1579-1585. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04262-3>.
- Khan, S., Jabeen, F., Qureshi, A., Asghar, S. y Noureen, A. 2015. Toxicity of silver nanoparticles in fish: a critical review. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 6: 211-227. <https://www.researchgate.net/publication/280686023>.
- Leonia, M., Menezes, T., Souza, J. y Nágila, R. 2013. Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus blazei* murill using NMR and FTIR spectroscopy. *Bioactive Carbohydrates and Dietary fibre*. 2: 152-156. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.10.005>.
- Li, S., Huang, R., Shah, N. y Tao, X. 2014. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315. *Journal of Dairy Science*. 97: 7334-7343. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7912>.
- Li, H., Wu, S., Du, C. y Zhong, Y. 2020. Preparation, performances, and mechanisms of microbial flocculants for wastewater treatment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17:1360. doi: 10.3390/ijerph17041360.
- Lim, J., Yeap, S., Che, H. y Low, S. 2013. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Research Letters*. 8: 381. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-381>
- Mahamuni, P., Patil, P. y Bohara, A. 2019. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles by using polyol chemistry for their antimicrobial and antibiofilm activity. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 17: 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.11.007>.

- Murru, C. 2021. Potencial tecnológico de los puntos cuánticos de carbono antioxidantes: el impulso hacia metodologías verdes y nanotecnología sostenible. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo España. Disponible en: <https://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/61888>. (Fecha de consulta, 15 de mayo, 2022).
- Njus, D., Kelley, P.M., Tu, Y.J. y Schlegel, H.B. 2020. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*. 159: 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.013>.
- Ramírez-Pérez, J.I., Álvarez-Gutiérrez, P.E., Luján-Hidalgo, M.C., Ovando-Chacón, S.L., Soria-Guerra, R.E, Ruiz-Cabrera, Miguel Ángel, Lagunes-Grajales, A. y Abud-Archila, M. 2022. Effect of linear and branched fructans on growth and probiotic characteristics of seven *Lactobacillus* spp. isolated from an autochthonous beverage from Chiapas, Mexico. *Archives of Microbiology*. 204. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02984-w>
- Salunke, G., Gosh, S., Kumar, R., Khade, S. y Kale, T. 2014. Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant *Plumbago zeylanica* and their application in biofilm control. *International Journal of Nanomedicine*. 9: 2635-53. doi: 10.2147/IJN.S59834.
- Sathiyarayanan, G., Dineshkumar, K. y Yang, Y. 2017. Microbial exopolysaccharide-mediated synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Critical Reviews in Microbiology*. 43:731-752. doi: 10.1080/1040841X.2017.1306689.
- Seedevi, P., Moovendhan, M., Vairamani, S. y Shanmugam, A. 2015. Structural characterization and biomedical properties of sulfated polysaccharide from the gladius of *Sepioteuthis lessoniana*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 85: 117-125. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.066>.
- Silva, L., Neto, J., Cardarelli, H. 2019. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: technological properties, biological activity, and potential application in the food industry. *Annals of microbiology*, 321-328. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01456-9>
- Solorzano-Toalá, R., González-Mendoza, D., Valdez-Salas, B., Gutiérrez-Miceli, F. y Camacho, O. 2020. Synthesis of silver nanoparticles from *Annona diversifolia* Safford and their potential use as a green alternative to control of pathogenic microorganisms. *Journal of Renewable Materials*. 8, 1129-1137. <https://doi.org/10.32604/jrm.2020.09845>.
- Soua L., Koubaa, M., Barba, F. y Fakhfakh, J. 2020. Water-soluble polysaccharides from *Ephedra alata* stems: structural characterization, functional properties, and antioxidant activity. *Molecules*. 25, 2210. <https://doi.org/10.3390/molecules25092210>.
- Suchomel, P., Kvitek, L., Puceck, R. y Vajda S. 2018. Simple size-controlled synthesis of Au nanoparticles and their size-dependent catalytic activity. *Scientific Reports*. 8: 4589. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22976-5>.
- Patil, S., Patil, C., Salunke, B. y Bathe, G. 2011. Studies on characterization of bioflocculant exopolysaccharide of *Azotobacter indicus* and its potential for wastewater treatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 163: 463-72. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9054-5>.
- Trabelsi, M., Mamun, A., Sabantina L. y Ehrmann, A. 2019. Increased mechanical properties of carbon nanofiber mats for possible medical applications. *Fibers*. 7: 98. <https://doi.org/10.3390/fib7110098>.
- Wel, C., Heinrich, D. y Kraft, D. 2017. Microparticle assembly pathways on lipid membranes. *Biophysical Journal*. 113: 1037-1046. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.07.019>.
- Yan, Y. y Ding, H. 2020. pH-responsive nanoparticles for cancer immunotherapy: a brief review. *Nanomaterials*. 10: 1613. <https://doi.org/10.3390/nano10081613>.
- Yilmaz, T. y Simsek, O. 2020. Potential health benefits of ropy exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*. *Molecules*. 25: 3293. <https://doi.org/10.3390/molecules25143293>.
- Zhang, Q., Wang, J., Sun, Q., Zhang, S. y Tang, J. 2021. Characterization and antioxidant activity of released exopolysaccharide from potential probiotic *Leuconostoc mesenteroides* LM187. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31: 1144-1153. <https://doi.org/10.4014/jmb.2103.03055>.
- Zheng, J., Sun, D., Li, X. y Liu, D. 2021. The effect of fatty acid chain length and saturation on the emulsification properties of pork myofibrillar proteins. *LWT*. 139: 110242. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110242>.
- Zisu, B. y Sha, N. 2003. Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of Dairy Science*. 86: 3405-3415. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73944-7.