

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

POSGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

**OPTIMIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE SÍNTESIS VERDE
DE
NANOPARTÍCULAS DE ORO A PARTIR DE PULPA DE CAFÉ**

GALILEO BONILLA NEPOMUCENO

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

2020

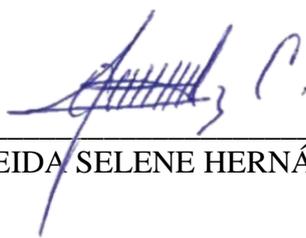
La presente tesis, titulada: **Optimización y caracterización del proceso de síntesis verde de nanopartículas de oro a partir de pulpa de café**, realizada por el alumno: **Galileo Bonilla Nepomuceno**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

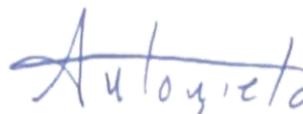
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



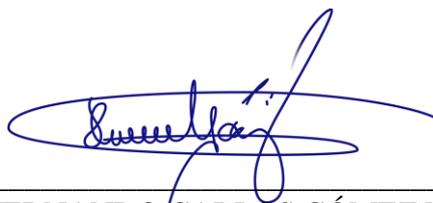
DRA. ALEIDA SELENE HERNÁNDEZ CÁZARES

ASESORA:



DRA. MARÍA ANTONIETA RÍOS CORRIPIO

ASESOR:



DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO

ASESOR:



DR. MARLON ROJAS LÓPEZ

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. Agosto
de 2020

OPTIMIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE ORO A PARTIR DE PULPA DE CAFÉ

Galileo Bonilla Nepomuceno, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2020

En la actualidad el uso de nanomateriales se ha incrementado con aplicaciones en el área de la medicina, electrónica, agricultura, industrias alimentarias entre otras. Uno de los nanomateriales más estudiados son las nanopartículas de oro, las cuales poseen propiedades ópticas, eléctricas y que, gracias a su gran área de superficie, biocompatibilidad y estabilidad son utilizadas en distintas áreas. Sin embargo, el desarrollo de nanomateriales implican un alto gasto de energía, uso de solventes y reactivos sintéticos que generan residuos y se acumulan en el medio ambiente. La síntesis verde o biológica de nanomateriales se enfoca en la sustitución de algunos reactivos sintéticos con el fin de reducir o eliminar sus residuos, utilizando agentes biológicos como hongos, bacterias y plantas. Por otra parte, la pulpa de café es uno de los principales residuos agroindustriales del procesado de café, se estima que de la producción de café cereza la pulpa representa más del 40% y tiene una composición química y nutrimental potencial para la obtención de compuestos bioactivos. En la presente investigación se evaluó un método sencillo de síntesis de nanopartículas de oro a partir de un extracto acuoso de pulpa de café. Se empleó la Metodología de Superficie de Respuesta para optimizar el proceso de síntesis verde, empleando un diseño experimental Box-Behnken, donde se establecieron tres factores y tres niveles: concentración del agente precursor (3, 4 y 5%), concentración del agente reductor (0.125, 0.5 y 2 mg/mL) y tiempo de reacción (20, 40 y 60 min). Las variables de respuesta establecidas fueron absorción UV-visible máxima (MA), tamaño de partícula (d) y densidad de partículas (N). La caracterización de las nanopartículas obtenidas se realizó por espectrofotometría UV-visible, espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). El valor máximo encontrado para MA fue en los niveles máximos de concentración de agente precursor y de agente reductor mientras que para el tiempo de reacción fue el nivel mínimo. Se obtuvieron nanopartículas de ente 5 y 22 nm, lo que comprueba que el extracto de pulpa de café es capaz de actuar como agente reductor, así como que sus compuestos bioactivos les dan a las nanopartículas funcionalidad con posibles aplicaciones en el área médica, ingenieril o industrial.

Palabras clave: nanotecnología, nanopartículas de oro, nanopartículas metálicas, síntesis verde, *Coffea* spp.

OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION OF GREEN SYNTHESIS PROCESS OF GOLD NANOPARTICLES FROM COFFEE PULP

Galileo Bonilla Nepomuceno, M. Sc.

Colegio de Postgraduados, 2020

Currently the use of nanomaterials has increased with applications in medicine, electronics, agriculture, food industries, among others. One of the most studied nanomaterials are gold nanoparticles, which have optical, electrical properties and because to their large surface area, biocompatibility and stability, are used in different areas. However, some techniques for the development of nanomaterials involve a high energy expenditure, solvents and synthetic reagents use, that generate polluting residues. Green or biological synthesis of nanomaterials focuses on the substitution of some synthetic reagents in order to reduce or eliminate their residues, using biological agents such as fungi, bacteria and plants. On the other hand, the coffee pulp is one of the main agro-industrial waste of coffee, the pulp represents more than 40% of cherry coffee production and has an important chemical and nutritional content to obtain bioactive compounds. In this context, the following research presents a simple method of synthesis of gold nanoparticles from aqueous coffee pulp extract. The Response Surface Methodology was used to optimize the green synthesis process, using a Box-Behnken experimental design, where three factors and three levels were established: concentration of the precursor agent (3, 4 and 5%), concentration of the reducing agent (0.125, 0.5 and 2 mg / mL) and reaction time (20, 40 and 60 min). The response variables established were maximum UV-visible absorption (MA), particle size (d) and particle density (N). The nanoparticles obtained were characterized by UV-visible spectrophotometry, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The maximum value found for MA was in the maximum levels of concentration of precursor and reducing agent, while for reaction time was the minimum level. Nanoparticles of between 5 and 22 nm were obtained, which proves that the coffee pulp extract is capable of acting as a reducing agent, as well as that its bioactive compounds give the nanoparticles functionality with possible applications in the medical, engineering or industrial.

Keywords: nanotechnology, gold nanoparticles, metallic nanoparticles, green synthesis, *Coffea* spp.

Dedicatoria

A Dios por siempre guiarme y poner a gente buena en mi camino, por siempre brindarme lo necesario para salir adelante y por las oportunidades que siempre me ha brindado.

A mi familia, mis padres Bonilla-Tepole G. y Nepomuceno-Reyes S. quienes siempre han estado para apoyarme, por haberse esforzado mucho desde siempre, por corregirme cuando lo necesito y apapacharme cuando también lo necesito. A mis hermanos Gladys, Pablo y Angie por siempre tratar de sacarme una sonrisa o hacerme enojar, sin ustedes nada, absolutamente nada sería igual. En general a toda mi familia por ser siempre tan unida y preocuparse incluso a la distancia, los amo.

A mis amigos y compañeros de la maestría y fuera de la maestría, Báez-Aguilar A. M., Reyes-Bolaños A. C., Rosas-Miranda D., Santiago-Cruz I. A., Vargas-Galina N. Y., Guevara-Carreón M., Fernández-Corte B., por siempre estar para mí, por su apoyo incondicional, su compañerismo, por enseñarme y corregirme, por escucharme, por los buenos momentos con ustedes muchísimas gracias y sepan que los aprecio muchísimo (aunque no parezca).

A la gente que conocí en este camino, especialmente a los que conocí durante mi estancia de investigación, muchas gracias por su amistad a pesar del corto tiempo, pero que con el simple hecho de haberme brindado una sonrisa les estoy muy agradecido.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento para poder realizar este trabajo de investigación a través de la beca No. 930141 y con ello realizar mis estudios de posgrado.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba y a la Línea de Generación y Aplicación del conocimiento 2 (LGAC-2).

Al Programa de Postgrado de la Maestría en Ciencias en Innovación Agroalimentaria Sustentable.

Al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-IPN), por abrirme sus puertas y permitirme trabajar en sus instalaciones para lograr el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Aleida Selene Hernández Cázares por el apoyo, confianza y paciencia, por sus valiosos aportes y consejos, ¡muchas gracias!

A la Dra. María Antonieta Ríos Corripio, por sus valiosos aportes y por encaminarme en este proyecto, ¡Muchas gracias!

Al Dr. Fernando C. Gómez Merino por su apoyo, y por su disposición para colaborar ¡Muchas gracias!

Al Dr. Marlon Rojas López, por todo el apoyo otorgado durante mi estancia de investigación, por la confianza, por su tiempo y dedicación con este proyecto, ¡Muchísimas gracias!

Al Laboratorio de Ciencias de los Alimentos por prestar las instalaciones para el desarrollo del proyecto.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Planteamiento del problema	1
2. Objetivos	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. Hipótesis	3
4. Innovación de la investigación	3
5. Sustentabilidad de la investigación	4
6. Seguridad alimentaria	5
7. MARCO TEÓRICO	7
7.1 Nanotecnología	7
7.2 Nanomateriales	10
7.3 Nanopartículas metálicas	16
7.4 Nanopartículas de oro	19
7.5 Síntesis de nanopartículas	21
7.5.1 Método de Brust-Schiffrin	22
7.5.2 Síntesis electroquímica de nanopartículas de oro.	23
7.5.3 Síntesis química con citrato de sodio	23
7.5.4 Síntesis verde de nanopartículas de oro	24
7.6 Caracterización de nanopartículas de oro	26
7.6.1 Espectrofotometría UV-visible y modelo de Haiss	26
7.6.2 Microscopía Electrónica	27
7.6.3 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	28
7.7 Métodos de superficie de respuesta	29
7.7.1 Diseño Central Compuesto (DCC)	31
7.7.2 Diseño Box-Behnken	31
7.8 Producción mundial y nacional de café	32
7.8.1 Procesamiento agroindustrial del café cereza	33
7.8.2 Pulpa de café	35
Literatura citada	36
CHAPTER I.....	46
1.1 Introduction	47
1.2 Materials and methods	48
1.2.1 Materials	48
1.2.2 Aqueous coffee pulp extract	49
1.2.3 Green synthesis of gold nanoparticles (AuNPs)	49

1.2.4 UV-visible spectrophotometry	49
1.2.5 Size and particle density of AuNPs	49
1.2.6 Scanning electron microscopy	50
1.2.7 FTIR spectroscopy	50
1.2.8 Experimental design and statistical analysis	51
1.3 Results and discussion.....	52
1.3.1 UV-visible spectroscopy	52
1.3.2 Scanning electron microscopy	53
1.3.3 Experimental design and statistical analysis	55
1.3.4 Analysis of response surfaces.....	61
1.3.5 Fourier transform infrared spectroscopy	64
1.4 Conclusions	65
1.5 References	66
CONCLUSIONES GENERALES	70
RECOMENDACIONES GENERALES	70
ANEXOS.....	71

LISTA DE CUADROS

MARCO TEÓRICO

Cuadro 1. Principales estados productores de café cereza en México.....	33
Cuadro 2. Contenido químico y nutrimental de la pulpa de café (base seca)	36

CHAPTER I

Table 1. Coded levels for independent variables.....	51
Table 2. Independent variables used in the experimental design arrangement.....	51
Table 3. Experimental values used as response, and predicted values obtained after using the Box-Behnken design as a function of the independent variables.....	57
Table 4. Analysis of variance for the three responses.....	58
Table 5. Regression coefficients and probability values for response variables in the experimental design.....	60

LISTA DE FIGURAS

MARCO TEÓRICO

Figura 1. Pilares de la sustentabilidad.....	5
Figura 2. Comparación de materiales a diferentes escalas físicas.....	8
Figura 3. Representación gráfica del efecto superficie/volumen de la escala nanométrica.....	8
Figura 4. Áreas en las que puede aplicarse la nanotecnología.....	9
Figura 5. Clasificación de nanoestructuras de acuerdo a su origen (a), homogeneidad (b), naturaleza (c), y dimensionalidad (d)	11
Figura 6. Enfoques desde los que se puede obtener nanomateriales.....	14
Figura 7. Representación gráfica del método sol-gel para la preparación de nanomateriales.....	15
Figura 8. Representación gráfica de algunos nanomateriales.....	16
Figura 9. Representación gráfica del efecto de resonancia de plasmón superficial (a); Espectro UV-visible de la resonancia de plasmón superficial de nanopartículas de oro esféricas (b).....	17
Figura 10. Principales patrones de ordenamiento de las nanoaleaciones.....	18
Figura 11. Representación gráfica de algunas moléculas con las que se pueden funcionalizar las nanopartículas de oro.....	20
Figura 12. Representación gráfica de la influencia del tamaño de nanopartículas esféricas coloidales de oro en función del color (a); Influencia de la forma, tamaño y composición química de las nanopartículas de oro sobre la Resonancia de Plasmón Superficial RPS (b).....	20
Figura 13. Representación gráfica de la síntesis de nanopartículas de oro por método electroquímico.....	23
Figura 14. Representación esquemática de la síntesis de nanopartículas de oro por método de reducción química con citrato.....	24
Figura 15. Representación gráfica de las interacciones de algunos grupos funcionales durante la síntesis verde de nanopartículas de oro.....	25
Figura 16. Síntesis verde de nanopartículas de oro a partir de extractos de semillas, cáscara y tallos de uva.....	25

Figura 17. Ejemplos de superficies de respuesta generados a partir de un modelo de optimización cuadrático de dos variables. punto máximo (a), meseta (b), máximo fuera de la región experimental (c), mínimo (d) y superficie en forma de silla (e).....30

Figura 18. Diseño compuesto central de 2 factores (a); diseño central compuesto de 3 factores (b); (●) puntos del diseño experimental; (○) puntos axiales y (□) puntos centrales.....31

Figura 19. Diseños experimentales a tres niveles: Diseño factorial de optimización de 2 variables (a); diseño de 3 variables (b) y Diseño Box-Behnken con 3 variables (c).....32

Figura 20. Procesamiento de café por vía húmeda.....34

Figura 21. Pulpa de café obtenida del beneficiado húmedo de café (a); pulpa de café deshidratada y triturada (b).....36

CAPÍTULO I

Figure 1. UV-visible spectra of AuNPs synthesized by reduction with coffee pulp extract at different conditions: (a) 0.5 mg/mL of reducing agent, precursor concentrations: 3, 4 and 5%, (b) Precursor concentration of 5%, reducing agent concentrations: 0.5, 1.25, and 2 mg/mL, (c) Precursor agent concentration of 5%, time of synthesis: 20, 40 and 60 min.....53

Figure 2. SEM images of AuNPs prepared at different conditions: a) Precursor 3%, and reducing agent 0.5 mg/mL; b) Precursor 3%, and reducing agent 2 mg/mL; c) Precursor 5%, and reducing agent 0.5 mg/mL; d) precursor 5%, reducing agent 2 mg/mL. The reaction time for all the samples was of 40 min.....54

Figure 3. Size distribution histograms obtained from the SEM images of AuNPs prepared at different conditions: a) Precursor 3%, and reducing agent 0.5 mg/mL; b) Precursor 3%, and reducing agent 2 mg/mL; c) Precursor 5%, and reducing agent 0.5 mg/mL; d) precursor 5%, reducing agent 2 mg/mL. The reaction time for all the samples was of 40 min.....55

Figure 4. Correlation between predicted versus experimental of each model: (a) maximum absorbance $R^2=0.98$; (b) particle size, $R^2=0.99$; and (c) particles density, $R^2=0.97$. Predicted data were obtained from the response surface calculations by the experimental design.....60

Figure 5. Response surfaces of maximum absorbance (*MA*), that show the effect of the independent variables (factors) used in the experimental design, during the green synthesis of AuNPs.....61

Figure 6. Response surfaces of particle size (d), showing the effect of the independent variables (factors) used in the experimental design, during the green synthesis of AuNPs.....63

Figure 7. Response surfaces of particles density (N), that show the effect of the independent variables (factors) used in the experimental design, during the green synthesis of AuNPs.....64

Figure 8. (a) FTIR spectrum of the reducing agent (coffee pulp extract). The rest of the FTIR spectra correspond to AuNPs synthesized under different preparation conditions (precursor concentration, reducing agent concentration, reaction time: (b) 3%, 0.5 mg/mL, 40 min, (c) 3%, 2 mg/mL, 40 min, and (d) 5%, 2 mg/mL, 40 min)65

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Planteamiento del problema

La nanotecnología es la disciplina que estudia la materia a escala nanométrica (1-100 nm) y propone aplicaciones a partir de esta. Un nanómetro equivale a una mil millonésima parte de un metro es decir $1 \times 10^{-9} m$, por lo que a esta escala, la materia comienza a adquirir propiedades diferentes a las de la escala micro y macro, esto debido a la relación que existe entre la superficie y el volumen de los nanomateriales, a medida que el diámetro de la partícula disminuya, el área de la superficie relativa total de estas nanoestructuras se incrementa (Shi *et al.*, 2015).

Con base en estas características de la materia se han desarrollado diversos tipos de nanomateriales tales como los fullerenos, los nanotubos de carbono, las nanofibras, las nanopartículas orgánicas, las nanopartículas metálicas, entre otros. En particular el desarrollo de nanopartículas metálicas se ha incrementado, gracias a las propiedades ópticas, catalíticas, eléctricas, entre otras, que poseen (Veisi *et al.*, 2018). Dentro de las nanopartículas metálicas más estudiadas están las nanopartículas de oro, plata, platino, hierro, oro, etc. En particular, las nanopartículas de oro presentan gran interés debido a sus propiedades ópticas y de superficie; así como su estabilidad y biocompatibilidad con diversos agentes. Cabe destacar que la síntesis de nanomateriales incluidas las nanopartículas de oro, involucran diferentes procesos y algunos de ellos requieren el uso de solventes, energía, equipo sofisticado, y reactivos tóxicos que impactan en el medio ambiente (Aljabali *et al.*, 2018).

La síntesis verde surge como un método alternativo de síntesis de nanopartículas; es decir, es un método que pretende obtener nanopartículas a partir de entidades biológicas como las bacterias, plantas, hongos, etc.; aunque son las plantas las más utilizadas ya que los extractos de estas poseen compuestos fenólicos y antioxidantes; los cuales actúan como agentes reductores, durante la síntesis de nanopartículas (Casas-Hidalgo *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2016; Dutta *et al.*, 2017). Este método permite obtener nanopartículas con características morfológicas similares a las de métodos convencionales. Además, se ha encontrado que las nanopartículas obtenidas por síntesis verde tienen propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, entre otras, y esto es debido a las propiedades de los compuestos presentes en la planta utilizada (Aljabali *et al.*, 2018; Ismail *et al.*, 2018; Rajeshkumar *et al.*, 2018; Mohammed-Siddiq *et al.*, 2019).

El café es uno de los productos con mayor demanda en el mundo. En México, Veracruz es el segundo estado con mayor producción de café cereza (SIAP, 2019). La pulpa de café es el principal residuo del beneficio del café, se estima que más del 40 % de café cereza producido corresponde a pulpa de café (Roussos *et al.*, 1995). La obtención de estos residuos agroindustriales representa un riesgo para el medio ambiente, ya que su mal manejo es causa de contaminación en agua y suelos. Sin embargo, el aprovechamiento de la pulpa de café es una alternativa viable para la obtención de compuestos bioactivos. La pulpa de café contiene una gran cantidad de agentes antioxidantes y fenólicos (Fierro-Cabrales *et al.*, 2018), lo que resalta su potencial para actuar como agente reductor en la síntesis de nanopartículas de oro.

Por otro lado, el uso de técnicas para la optimización de procesos es fundamental para tener control de las variables involucradas y administrar el uso adecuado de materias primas. Las Metodologías de Superficie de Respuesta (RSM) son técnicas matemáticas y estadísticas que se enfocan en la modelación de una respuesta de interés; la cual dependerá de diversos factores; teniendo como resultado los valores de los factores que otorgan los mejores resultados (Carlson y Carlson, 2005). En particular el modelo Box-Behnken tiene grandes ventajas, entre ellas la obtención de una superficie modelada de segundo orden que predice cualquier valor de respuesta en el rango estudiado, se necesita menos cantidad de combinaciones entre tratamientos por lo que los costos experimentales disminuyen sustancialmente (Ferreira *et al.*, 2007).

En este contexto, en el presente trabajo se propone sintetizar nanopartículas de oro mediante síntesis verde utilizando un extracto acuoso de pulpa de café; y optimizar el proceso mediante la Metodología de Superficie de Respuesta a través de un diseño Box-Behnken.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Optimizar el proceso de síntesis verde de nanopartículas de oro a partir pulpa de café mediante la metodología de superficie de respuesta.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar las nanopartículas de oro obtenidas por síntesis verde a partir de pulpa de café.

3. Hipótesis

Los factores de concentración de precursor (ácido tetracloroaurico), concentración de agente reductor (extracto acuoso de pulpa de café) y el tiempo de reacción son factores significativos en la optimización del proceso de síntesis verde de nanopartículas de oro.

4. Innovación de la investigación

De acuerdo con la Real Academia Española (RAE), innovación “*es la creación o modificación de un producto, y su introducción al mercado*”. Mientras que la Ley de Ciencia y Tecnología (LCyT) define a la innovación como “*generar un nuevo producto, diseño, proceso, servicio, método u organización o añadir valor a los existentes*”. Sin embargo, la innovación también es considerada un proceso donde se involucra la investigación, el desarrollo y la mejora continua; de acuerdo con el Manual de Oslo la innovación puede aplicarse a:

Un producto, se ofrece un bien o servicio nuevo o que fue significativamente mejorado, en cuanto a sus características técnicas o el uso al que fue asignado, las mejoras pueden darse en sus propiedades, componentes, de software, materiales etc.

Un proceso, se logra cuando existen cambios significativos en las técnicas, materiales, equipos o software, estos se verán reflejados en el sector productivo y de distribución.

Marketing o comercio, consiste en implementar un método de comercialización no usada con anterioridad, incluye cambios como el diseño, posicionamiento, promoción, precios entre otros, con el fin de incrementar ventas.

Organizacional, es cuando se modifican prácticas, procedimientos, lugares de trabajo y relaciones externas con el fin de mejorar la productividad de la empresa.

Además, la innovación también puede verse desde dos puntos de vista como una innovación incremental, que es cuando se agrega valor a un producto o servicio ya existente mediante modificaciones o mejora y como innovación radical o disruptiva que es cuando se introduce un producto o servicio totalmente nuevo al mercado marcando referente para futuras innovaciones (OCDE y Eurostat, 2005).

De acuerdo a esto, en el presente trabajo se propone desarrollar un método práctico y económico para la producción de nanopartículas de oro a partir de extracto de pulpa de café, que sea amigable con el medio ambiente. La síntesis verde es una técnica biotecnológica que surge con la finalidad de reducir el uso de reactivos sintéticos y consecuentemente la acumulación de ellos y/o sus residuos en el ambiente. En la literatura existen diversas investigaciones sobre el uso de diferentes extractos de plantas en la síntesis de nanopartículas de oro. Sin embargo, no hay evidencia de que se haya trabajado con pulpa de café (subproducto agroindustrial del beneficio húmedo del café, considerado altamente contaminante) y que el proceso haya sido optimizado por la metodología de superficie de respuesta.

5. Sustentabilidad de la investigación

Debido a las proyecciones que se tienen sobre el crecimiento poblacional en las próximas décadas y el consecuente desabasto de alimentos, y disponibilidad de recursos se han planteado diversas estrategias que permitan el aprovechamiento responsable de los recursos como el desarrollo sustentable (SDGs, 2019). La comisión Mundial de Medio Ambiente y Desarrollo (WCED, por sus siglas en inglés) definió en 1987 como sustentabilidad “*el desarrollo que satisface todas las necesidades del presente intentando no comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades*” en adición el Consejo Económico y Social de las Naciones Unidas (ECOSOC) menciona que el desarrollo sustentable involucra tres pilares fundamentales que son el económico, el social y el ambiental (Figura 1). Donde la interacción entre la sociedad y economía debe ser equitativa, entre sociedad y medio ambiente soportable, y entre ambiente y economía viable (Chávez-Cortés y Binnqüist Cervantes, 2011).

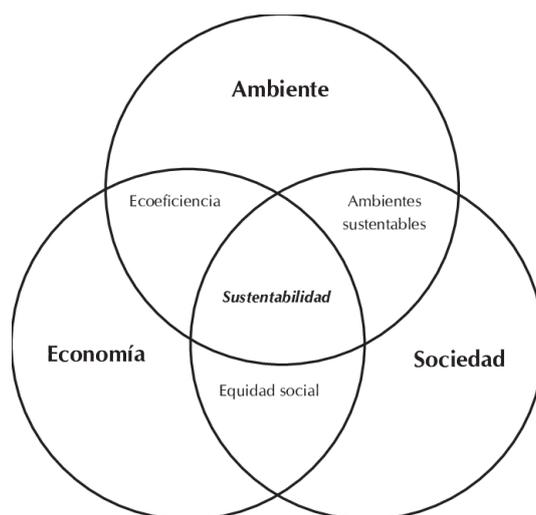


Figura 1. Pilares de la sustentabilidad.

Fuente: Tomado de Chávez-Cortés y Binnqüist-Cervantes, (2011).

Con la sustentabilidad surgieron nuevas alternativas para satisfacer las necesidades de la población, ejemplo de ello es la química verde, la cual, se enfoca en el diseño de productos químicos y procesos para reducir o eliminar el uso de sustancias peligrosas, este enfoque tiene como principal objetivo contribuir al desarrollo sustentable a nivel molecular, ofreciendo de este modo una amplia aplicación de productos y procesos en diferentes sectores, desde el aeroespacial, cosméticos, electrónica, productos para el hogar hasta la agricultura (Anastas y Eghbali, 2009).

Desde el enfoque ambiental de la sustentabilidad y considerando que Veracruz es el segundo estado con la mayor producción de café en México (SIAP, 2019), este trabajo pretende implementar y dar valor agregado al uso de la pulpa de café para la síntesis verde de nanopartículas de oro. Se estima que la pulpa de café corresponde a más del 40% del café cereza, y dado que su pH se encuentra por debajo de 5.0 representa una amenaza de contaminación de suelo y agua por su mal manejo. Sin embargo, tiene gran potencial por su contenido de compuestos fenólicos y antioxidantes (Fierro-Cabrales *et al.*, 2018). Además, se propone un método de síntesis que utiliza menor cantidad de reactivos sintéticos para la obtención de las nanopartículas de oro.

6. Seguridad alimentaria

De acuerdo con el Instituto de Nutrición para Centroamérica y Panamá (INCAP) la seguridad alimentaria y nutricional “*es un estado en el cual todas las personas gozan, en forma oportuna y permanente, de acceso físico, económico y social a los alimentos que*

necesitan, en cantidad y calidad, para su adecuado consumo y utilización biológica, garantizándoles un estado de bienestar general que coadyuve al logro de su desarrollo”.

Por su parte la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) definen como seguridad alimentaria *“cuando todas las personas tienen acceso físico social y económico permanente a alimentos seguros, nutritivos y en cantidad suficiente para satisfacer sus requerimientos nutricionales y preferencias alimentaria, y así poder llevar una vida activa y saludable”*, el Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (CONEVAL) en México retoma los principios de la seguridad alimentaria de la FAO y menciona que la seguridad alimentaria *“implica que la población pueda satisfacer sus necesidades y preferencias alimentarias a través del acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos”* y que se basa en 4 pilares fundamentales:

Disponibilidad: contar con alimentos básicos, suficientes, estables, y de buena calidad.

Acceso: Cuando todas las familias y miembros de ellas tienen en todo momento la capacidad física y económica a los alimentos básicos que conforman una dieta nutritiva.

Utilización: Capacidad de ingerir alimentos nutritivos con calidad higiénica (restricciones biológicas) y adecuados (toma en cuenta aspectos culturales para prevenir enfermedades) para satisfacer las necesidades nutricionales de las personas.

Estabilidad: Capacidad para mantener niveles de almacenamiento de alimentos que permitan enfrentar situaciones de emergencia ya sea por inseguridad alimentaria crónica (escasez de alimentos) o por inseguridad alimentaria transitoria (causadas por desastres naturales o por el hombre) (CELAC, 2014; OCDE, 2016; CSA, 2017;).

En este sentido, la aplicación de nanomateriales en la industria alimentaria ha ido en incremento, desde el sector primario hasta el almacenamiento de productos terminados (Peters *et al.*, 2016; Arserim-Uçar y Çabuc 2020). De acuerdo con las definiciones de seguridad alimentaria el presente proyecto propone un método para la obtención de nanopartículas de oro mediante síntesis verde; las cuales, tienen diversas aplicaciones en diferentes áreas que incluyen a la industria alimentaria. Ejemplo de estas aplicaciones es la construcción de nanobiosensores que permiten detectar patógenos, así como otras moléculas de manera específica y eficiente (Ríos-Corripio *et al.*, 2016; Arcila-Lozano *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2018), y de este modo garantizar la inocuidad de los alimentos.

7. MARCO TEÓRICO

7.1 Nanotecnología

Como se menciona en la sección 1 la nanotecnología es una disciplina que estudia la materia a escala nanométrica (1-100 nm) y propone aplicaciones a partir de esta, un nanómetro equivale a una mil millonésima parte de un metro es decir $1 \times 10^{-9} m$. Por otra parte, la nanociencia es la ciencia que se encarga del estudio de los fenómenos que ocurren a esta escala (Shi *et al.*, 2015). En la Figura 2, se muestra una idea más clara de la dimensión de la escala nanométrica, esquematiza materiales a diferentes escalas incluyendo la nanométrica, un glóbulo rojo puede llegar a medir 10,000 nanómetros o el diámetro de la cabeza de una hormiga equivale aproximadamente a 3,000,000 de nm.

La nanotecnología está presente desde antes de nuestra era, uno de los ejemplos más antiguos y reconocidos de aplicaciones nanotecnológicas es la copa de licurgo; la cual, en su época causaba gran interés por los efectos ópticos que ofrecía, y no fue hasta 1962 que se descubrió que los efectos estaban relacionados con la presencia de metal coloidal (oro y plata) (Freestone *et al.*, 2007). Sin embargo, la nanotecnología como tal tuvo sus comienzos con Richard Feynman quien con su discurso “*There is plenty of room at the bottom*” en 1959 dio pauta a manipular la materia a niveles atómicos (Sánchez-Sánchez, 2017). Pero el término de nanotecnología no fue empleado hasta 1974 por Norio Taniguchi, quien la definió como: “*el procedimiento de separación consolidación y deformación de materiales átomo por átomo o molécula por molécula*” (Nunes *et al.*, 2019).

La escala nanométrica presta gran atención debido a que la materia a esta escala presenta propiedades totalmente diferentes que cuando se encuentra a escalas mayores, esto es debido a que el número de átomos que se encuentran en la superficie del nanomaterial es mayor a los que están en su interior, por lo que los electrones son confinados y tienen una mayor energía (Ramsden, 2016), el área de superficie del material incrementa medida que el volumen disminuye (Leon *et al.*, 2020). La Figura 3 muestra el ejemplo de un cubo, asumiendo que el cubo es de 1cm de arista y tiene un total de átomos de 10^{23} y cada cara tiene 10^{15} átomos por lo que la relación de átomos superficie/volumen queda $10^{15}/10^{23}$ (baja cantidad de átomos de superficie); sin embargo, si se reduce el tamaño del cubo a 1 nm de arista el 60% de los átomos del cubo estarán en la superficie (Kenneth *et al.*, 2009).

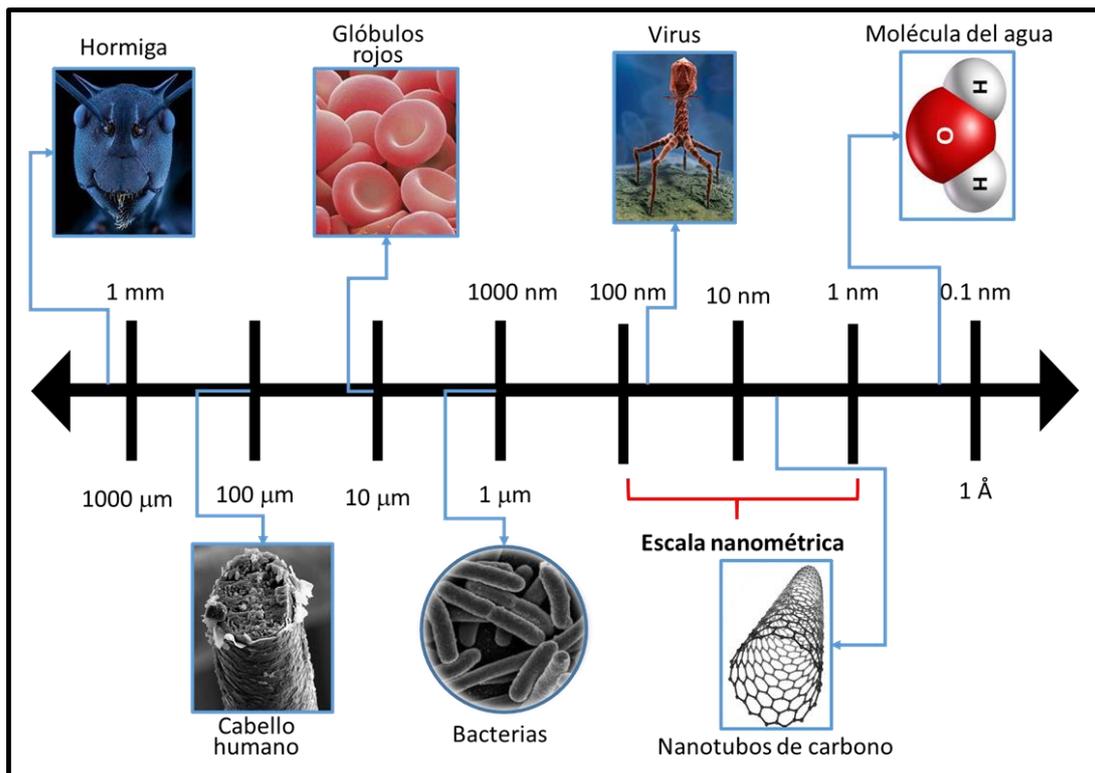


Figura 2. Comparación de materiales a diferentes escalas físicas
Fuente: Modificado de Shi *et al.* (2015).

Dentro de los cambios que presenta la materia a escala nanométrica están las propiedades térmicas o mecánicas (cambios en su conductividad térmica, disminución su punto de fusión y confinamiento cuántico), electromagnéticas (cambio en su conductividad eléctrica, fluorescencia, magnetización), ópticas (cambio de sus índices de refracción y diferentes interacciones con luz calor o sonido) y reactivas (mayor área superficial y diferente respuesta a la radiación electromagnética) (Muñoz-Patiño *et al.*, 2018).

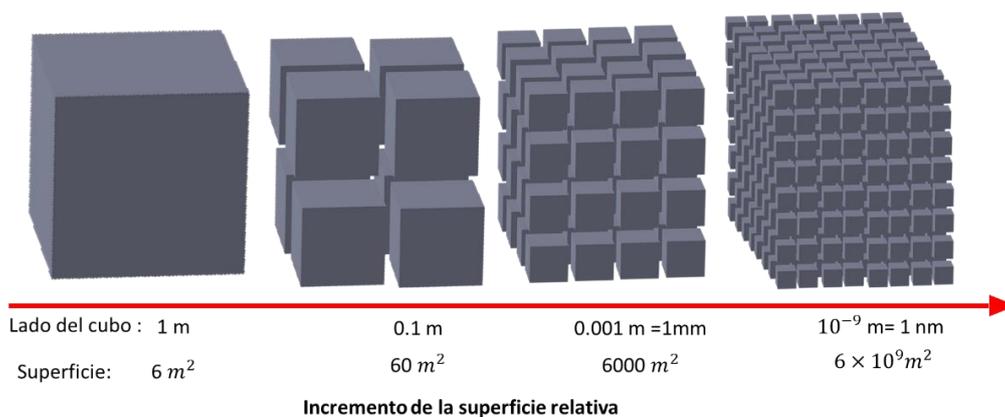


Figura 3. Representación gráfica del efecto superficie/volumen de la escala nanométrica.
Fuente: Tomado de Kenneth *et al.* (2009).

En los últimos años el desarrollo de investigaciones que tienen relación con la nanotecnología ha incrementado, se reporta que en la Web of Science el incremento de documentos asociados con nanotecnología ha sido de 17,350 a 1,001,761 en el periodo comprendido entre 2001 y 2015 teniendo un incremento del 12.89% en último año (Velmurugan y Radhakrishnan, 2017).

Las aplicaciones de la nanotecnología son muy amplias, en la industria textil, para producir telas con repelencia y evitar que se arruguen; en la electrónica, las propiedades de conducción eléctrica de los nanotubos de carbono permiten su aplicación en pantallas de televisión; en la aeronáutica, permiten desarrollar materiales que son más resistentes, ligeros y anticorrosivos; en la industria alimentaria, las propiedades ópticas de nanopartículas metálicas ayudan como transductores en la detección de patógenos, el uso de nanocompuestos en el diseño de empaques ayuda a hacerlos más resistentes y herméticos; otros ejemplos se muestran en la Figura 4 así gracias a la diversificación de nanomateriales estas aplicaciones son posibles y en la actualidad se están desarrollando metodologías más eficientes para su obtención y aplicación (Mobasser y Firoozi, 2016; Ríos-Corripio *et al.*, 2016; Muñoz-Patiño *et al.*, 2018; López-Rubio *et al.*, 2019).

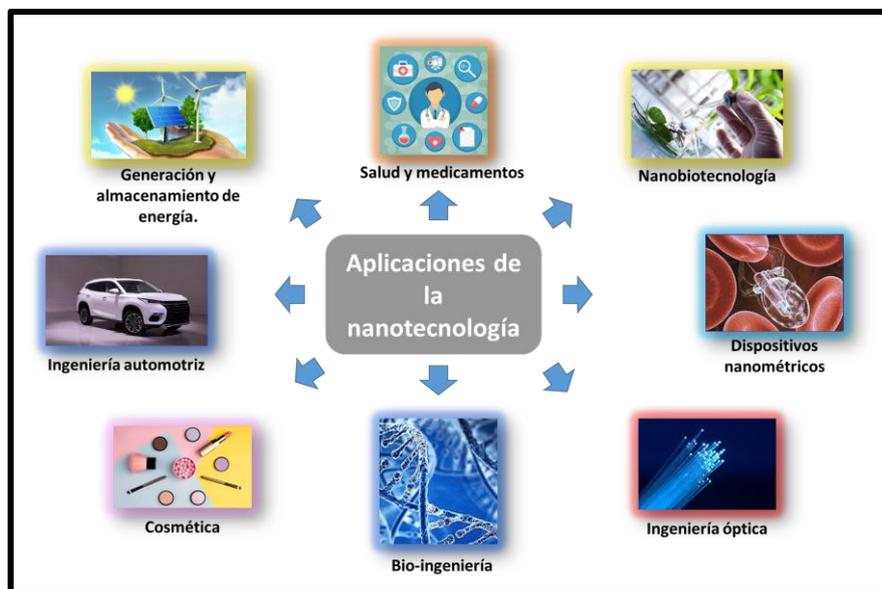


Figura 4. Áreas en las que puede aplicarse la nanotecnología.
Fuente: Muñoz-Patiño *et al.* (2018)

7.2 Nanomateriales

Los nanomateriales o nanoestructuras son aquellos materiales donde una o más de sus dimensiones se encuentren dentro de la escala nanométrica (1-100 nm) y algunas de sus propiedades (ópticas, eléctricas, magnéticas, catalíticas, etc.) cambien al pasar de una escala mayor a la escala nanométrica (Shi *et al.*, 2015). La diversificación de los nanomateriales ha generado diferentes clasificaciones, de acuerdo con López-Lorente y Valcárcel, (2014), los nanomateriales pueden ser clasificados de acuerdo con su origen, homogeneidad, naturaleza y dimensionalidad (Figura 5).

Las nanoestructuras de origen natural (Figura 5a) son algunas moléculas orgánicas como virus, bacterias, algunas proteínas y otras como polvo, arena, humo, etc., que se originan en el medioambiente. Las nanoestructuras generadas por el hombre pueden ser clasificadas como incidentales o generadas involuntariamente (residuos de procesos industriales, pirolisis, combustión de diésel, obtención de colorantes, calentamiento de aceites, etc.) y diseñadas o producidas de manera deliberada (nanocompuestos de arcilla, nanoláminas, nanopartículas metálicas, nanofibras, etc.) (Trotta y Mele, 2019).

La clasificación de nanomateriales por su homogeneidad (Figura 5b), hace referencia a la composición química y a las dimensiones de éstos; por ejemplo, nanopartículas idénticas (morfología y tamaño) con la misma composición química como de oro o plata (López-Lorente y Valcárcel, 2014; Sasidharan *et al.*, 2019). Los nanomateriales de acuerdo con su composición química (Figura 5c) pueden clasificarse como inorgánicas (nanopartículas metálicas, puntos cuánticos etc.), orgánicas (fullerenos, nanotubos de carbono, dendrimeros, etc.) o híbridos (nanopartículas modificadas, nanotubos funcionalizados con ferrocenos, etc.).

Los nanomateriales pueden presentar una amplia variedad de formas (esférica, cilíndrica, elipsoidal, tubular, helicoidal, arracimada, campaniforme, arrecifal, dendrítica, en forma de zig-zag o en forma de caja o de jaula, etc). Para obtener propiedades adecuadas es necesario controlar la morfología de las nanopartículas. En este sentido los nanomateriales se pueden clasificar en cuatro categorías basadas en dimensiones: 0D cero-dimensionales, las tres dimensiones (x, y, z) <100 nm y los electrones están confinados en las tres dimensiones (esferas y clústeres); 1D uni-dimensionales, dos dimensiones (x, y, z) <100 nm, los electrones están confinados en las dos dimensiones

(nanofibras, nanocables, nanovarillas); 2D bi-dimensionales, una dimensión <100nm, los electrones están confinados en una dirección (nanopelículas, nanoplatos y nano-redes) y 3D tridimensionales, ninguna dimensión < 100nm. Los electrones no están confinados y pueden moverse libremente (nanomateriales ensamblados) (López-Lorente y Valcárcel, 2014; Pottathara *et al.*, 2019; Trotta y Mele, 2019), como se muestra en la Figura 5d.

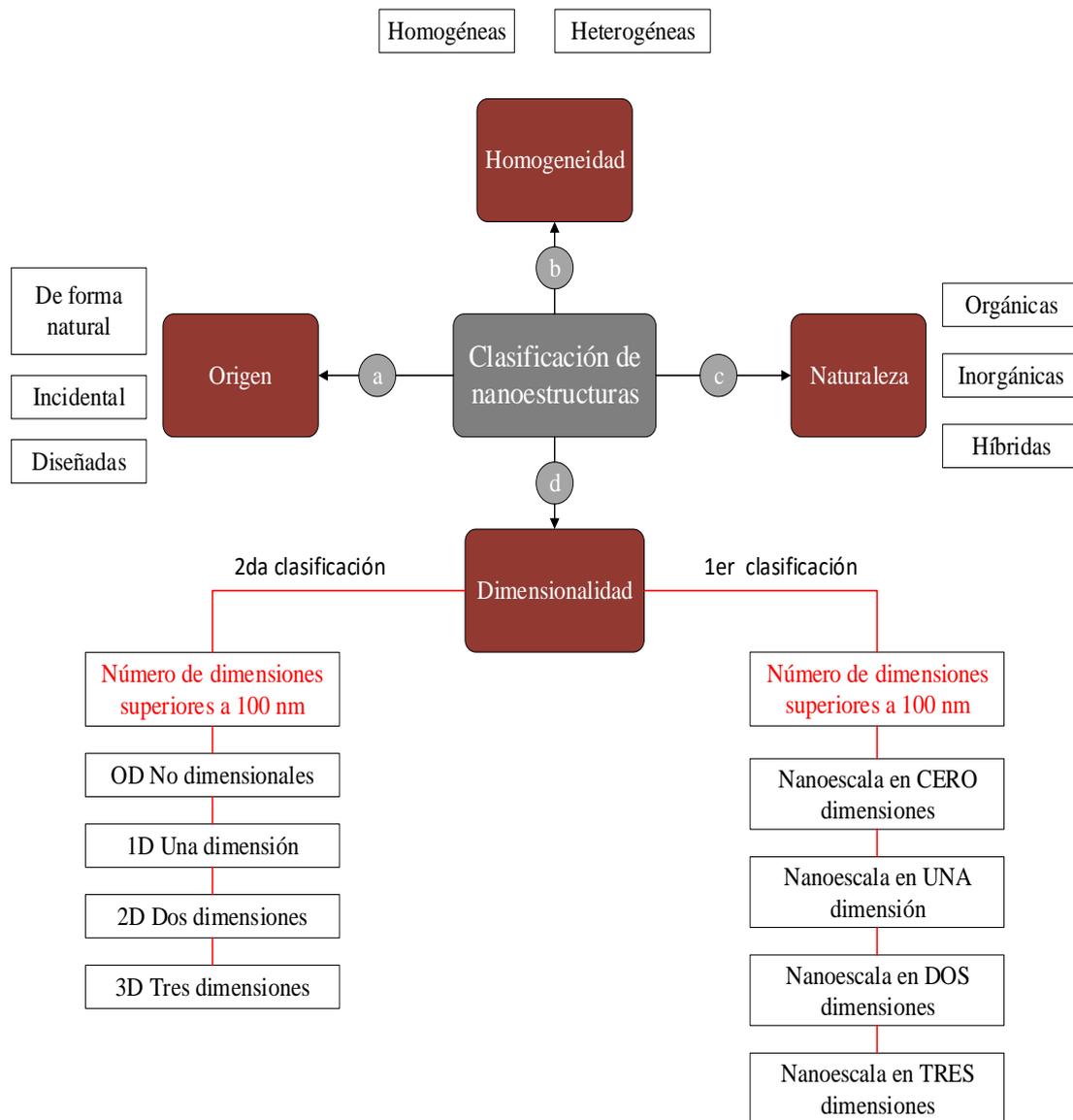


Figura 5. Clasificación de nanoestructuras de acuerdo con su origen (a), homogeneidad (b), naturaleza (c), y dimensionalidad (d).
Fuente: Tomado y traducido de López-Lorente y Valcárcel, (2014).

Los nanomateriales pueden ser fabricados y sintetizados desde dos enfoques, como se muestra en la Figura 6:

a) Desde el enfoque “arriba-abajo” (Top-down), se obtienen nanomateriales a partir de una macromolécula que es sometida a un proceso de molienda hasta obtener dimensiones dentro de la escala manométrica, las metodologías más comunes de este enfoque son la escisión mecánica, molienda mecánica, exfoliación líquida por fuerza mecánica, ablación láser, entre otras (Ciesielski y Samorì, 2014; Zheng *et al.*, 2014; Yi y Shen, 2015).

Escisión mecánica: Este método se basa en la separación mecánica de cristales a escala macro, rompiendo las interacciones de las fuerzas de van der Waals entre cada capa, sin romper los enlaces covalentes en el plano para la producción de nano-láminas. Esta técnica también es conocida como método de Scotch-tape y es normalmente utilizada para la obtención láminas de grafeno a partir de grafito, aunque también se ha reportado el desarrollo de nanomateriales (2D) como de nitruro de boro, disulfuro de molibdeno, disulfuro de titanio, disulfuro de tungsteno entre otros (Li *et al.*, 2012; Staley *et al.*, 2009; Lui *et al.*, 2016).

La principal desventaja de este método es su bajo rendimiento y la dificultad de controlar los parámetros debido a la operación manual, dentro de las ventajas están que no requiere de reactivos adicionales, la obtención de superficies limpias y una alta calidad en los cristales producidos. Los nanomateriales obtenidos bajo esta técnica tienen gran aplicabilidad en dispositivos optoelectrónicos y eléctricos de alto rendimiento gracias a sus propiedades (físicas, electrónicas y ópticas) (Pottathara *et al.*, 2019).

Molienda mecánica: El objetivo principal de este método es reducir el tamaño de partícula de una escala macroscópica hasta llegar a la escala nanométrica, en este caso una carga de polvo (precursor) es colocada en un molino de alta energía como un molino de bolas. Las bolas de este tipo molinos son de materiales como acero y tungsteno debido a que se requieren materiales con una alta densidad para poder transferir la energía mecánica suficiente para reducir el tamaño de partícula. Los principales factores que intervienen en este método son, el tipo de molino, velocidad de molienda, tiempo de molienda, temperatura etc., y precisamente de ellos dependerá la morfología, tamaño de partícula y dispersión (Ulla *et al.*, 2014; Varghese *et al.*, 2019).

Exfoliación líquida por fuerza mecánica: Esta técnica se utiliza principalmente en cristales en capa, se basa en la exfoliación mediante líquidos aplicando fuerzas mecánicas basadas en la sonicación y la fuerza de corte; básicamente la sonicación y la fuerza de corte aportan la fuerza mecánica mediante el líquido, rompiendo las interacciones de las fuerzas de Van der Waals que existen entre las capas del cristal y manteniendo los enlaces covalentes de las mismas, los principales parámetros que se consideran en esta técnica son el sistema de solvente, tiempo del tratamiento mecánico, temperatura, intensidad de sonicación y la adición de polímeros. La exfoliación líquida por fuerza mecánica ofrece un bajo costo y un alto rendimiento en el proceso, sin embargo, puede presentar defectos en las nanoláminas exfoliadas (Pottathara *et al.*, 2019).

Ablación láser: En esta técnica un láser penetra la superficie de la muestra, la cual, se encuentra inmersa en una solución líquida, los electrones de la muestra son removidos debido al campo eléctrico generado por la luz láser. Estos electrones interactúan con los átomos de la muestra calentando la superficie y vaporizándola. Una vez que el flujo del láser es alto, el material pasa a un estado de plasma, el cual está conformado de grupos de átomos, moléculas y iones. Este proceso de fragmentación permite la formación de nanopartículas. Los principales factores que se controlan son el tipo de material, solvente y solutos, temperatura y presión del sistema (factores de la muestra o precursor) y longitud de onda, tiempo, energía, frecuencia (factores del láser). Las principales ventajas de esta técnica son que no requiere de reactivos adicionales al precursor y no necesariamente genera residuos, en contraste, esta técnica tiene una baja eficiencia en la dispersión de las nanopartículas si se compara con los métodos químicos, y es muy difícil controlar la morfología de las mismas (Varghese *et al.*, 2019).

b) El enfoque “abajo-arriba” (Bottom-Up), los nanomateriales son obtenidos a partir del ensamblaje de átomos o moléculas hasta conseguir tamaños en el rango de la escala nanométrica, dentro de este enfoque se encuentran metodologías como, la deposición química por vapor, síntesis química húmeda, método sol-gel, etc., (Figura 6) (Pottathara *et al.*, 2019).

Deposición química por vapor: Este método se basa en la deposición de un sólido(s) (precursores) sobre una superficie caliente a partir de una reacción ocurrida en la fase de vapor.

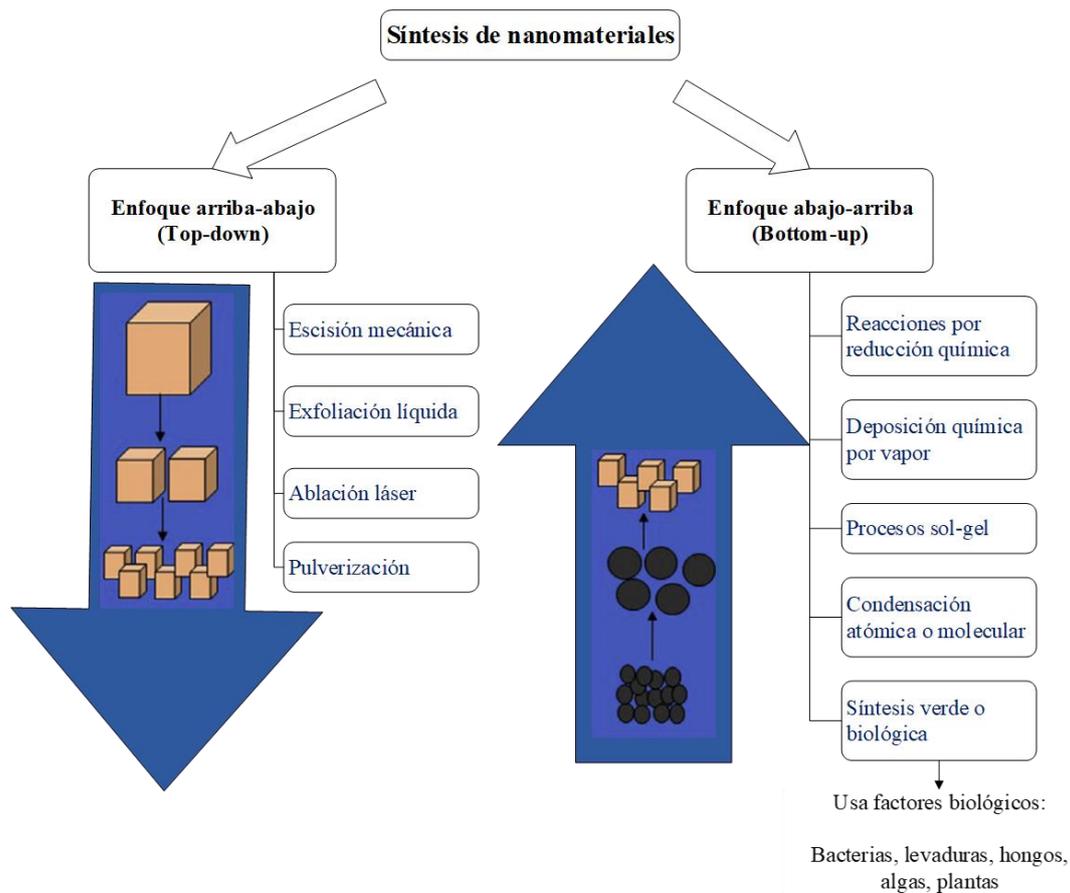


Figura 6. Enfoques desde los que se puede obtener nanomateriales.

Fuente: Modificado y traducido de Sasidharan *et al.* (2019).

Existe la deposición en un solo paso que consiste en la introducción de todos los precursores en la cámara de reacción, posteriormente se utiliza un flujo de gas inerte como argón o nitrógeno, las especies químicas en la fase gaseosa se trasladan y se quimisorben sobre la superficie del sustrato, la reacción y la difusión de las moléculas adsorbidas permiten la formación de clústeres formando cada capa del nanomaterial en cuestión (Varghese *et al.*, 2019).

Por otro lado, la deposición en dos pasos consiste en la deposición de una capa inicial con un precursor mediante deposición física de vapor, posteriormente se ingresa el segundo precursor reaccionando y se asocia con la primera capa. Este método es ampliamente utilizado para la fabricación de nanoláminas con propiedades dieléctricas, conductoras, de pasivación. Las cuales tienen aplicaciones en la creación de recubrimientos anticorrosivos y resistentes al calor, así como, en la fabricación de celdas solares (Raiford *et al.*, 2020).

Síntesis química húmeda: Este método se basa en el uso de precursores los cuales reaccionarán en la fase líquida de la solución, cada método de síntesis difiere uno del otro por lo que no se sigue una regla universal para este tipo de síntesis. Dentro de las principales ventajas de este método está su gran capacidad para poder controlar el tamaño forma y cristalinidad de los nanomateriales a obtener, así como, su bajo costo de operación. En contraste, su escalabilidad industrial es limitada debido a los largos periodos de mezclado y la incapacidad para poder controlar las etapas nucleación y crecimiento durante la síntesis (Pottathara *et al.*, 2019; Varghese *et al.*, 2019).

Método sol-gel: Este método se basa en la obtención de nanopartículas de óxido metálico, aunque también se ha reportado su uso para el desarrollo de nanocompuestos, como nanotubos con dióxido de titanio (CNTs/TiO₂), las principales etapas de este método son hidrólisis, condensación y proceso de secado (Figura 7). Para generar el gel, el agente precursor metálico es hidrolizado, formando hidróxido metálico y finalmente se condensa (Varghese *et al.*, 2019). Una vez obtenido el gel es secado y convertido a xerogel o aerogel. Este tipo de síntesis no requiere de calentamiento ni atmósferas modificadas por lo que se considera un método de bajo costo (Bazli *et al.*, 2019).

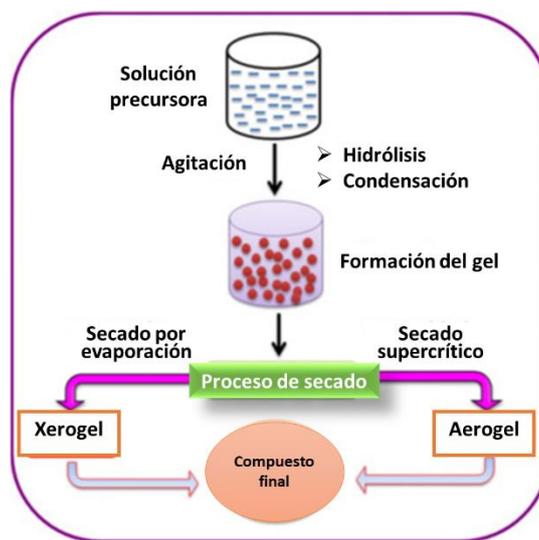


Figura 7. Representación gráfica del método sol-gel para la preparación de nanomateriales.

Fuente: Tomado de Yilmaz y Soylak, (2020)

Los nanomateriales se encuentran inmiscuidos en diversos usos y áreas, la electrónica, fabricación de empaques, recubrimientos, textiles, fabricación de materiales para autos, en medicina, en la industria alimentaria, etc. (Ríos-Corripio *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2018;

Sasidharan *et al.*, 2019). Es por ello que la investigación acerca de avances y aplicaciones nanotecnológicas está en constante crecimiento. Dentro de los nanomateriales más estudiados (Figura 8) están los nanomateriales de carbono (fullerenos, láminas de grafeno y los nanotubos de carbono) cuyas aplicaciones en electrónica son amplias y las nanopartículas metálicas como nanopartículas de cobre (CuNPs), nanopartículas de plata (AgNPs), nanopartículas de oro (AuNPs) entre otras, que prestan gran interés gracias a sus propiedades ópticas, eléctricas, catalíticas etc. (Varghese *et al.*, 2019).

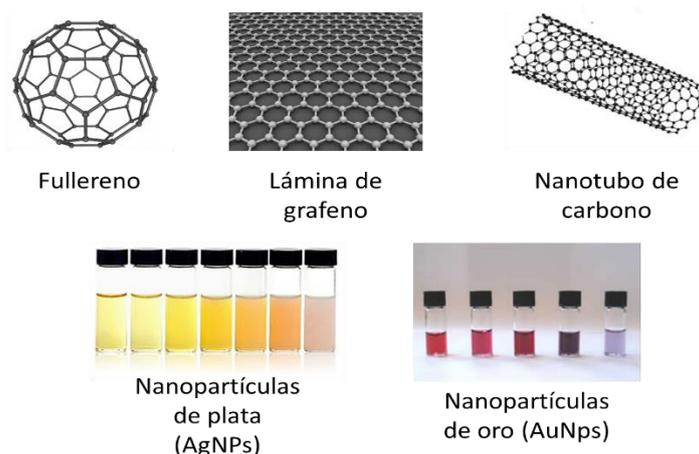


Figura 8. Representación gráfica de algunos nanomateriales
Fuente: Tomado y modificado de Varghese *et al.* (2019)

7.3 Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas presentan gran interés por sus propiedades eléctricas y ópticas; aunque una de las propiedades más estudiadas de las nanopartículas metálicas está la *Resonancia de Plasmón Superficial* (RPS) (Figura 9a), este efecto es observado cuando la nanopartícula es fotoactivada, la luz interactúa con el plasmón generando un incremento en el campo electromagnético de la nanopartículas, la interacción entre el fotón incidente y el campo eléctrico permite la dispersión y absorción de la luz (Varghese *et al.*, 2019). Este efecto es observado con la ayuda de un espectrofotómetro UV-visible donde las bandas del plasmón se asocian al tamaño, forma y dispersión de las nanopartículas (Figura 9b), a simple vista el color de las nanopartículas coloidales como en el caso del oro y la plata, el color de la suspensión indica su formación e incluso da una idea del tamaño de las mismas como se observa en la Figura 8.

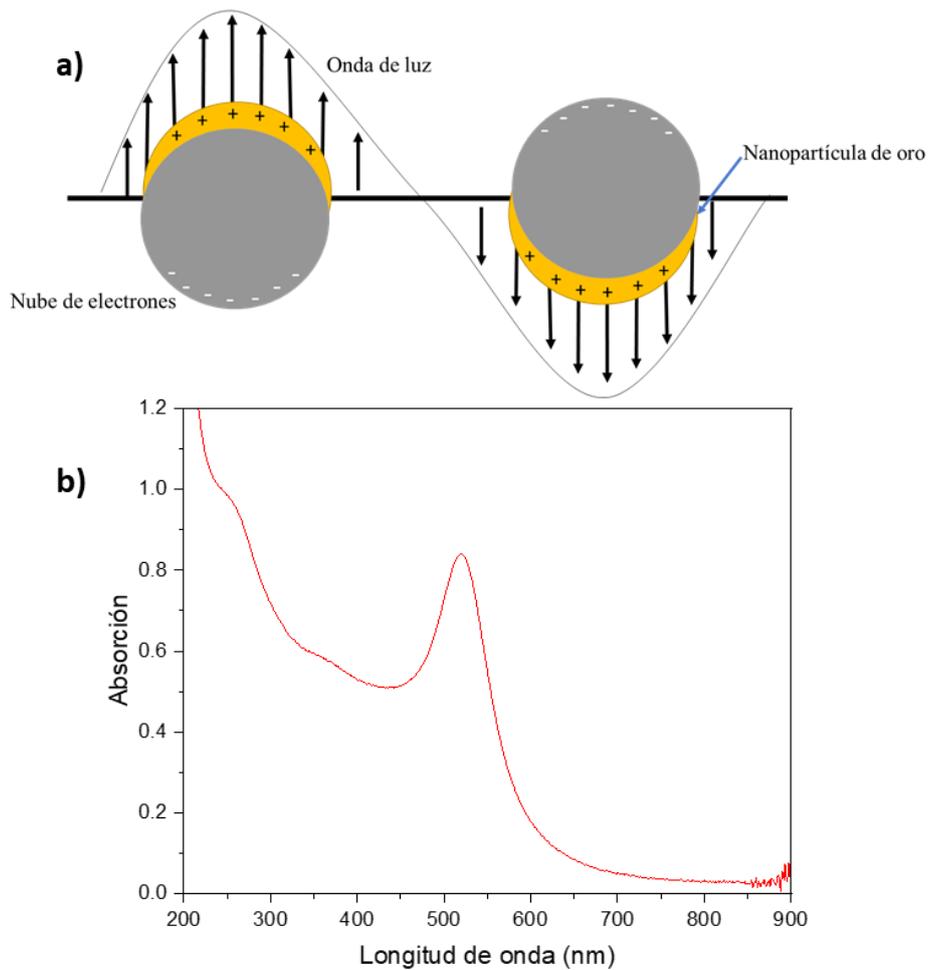


Figura 9. Representación gráfica del efecto de resonancia de plasmón superficial (a); Espectro UV-visible de la resonancia de plasmón superficial de nanopartículas de oro esféricas (b).

Fuente: Dominio público.

Es importante mencionar que las nanopartículas metálicas pueden estar compuestas por un solo tipo de metal (homogéneas) o de varios elementos metálicos (heterogéneas) a las que se les denomina como nanoaleaciones. Las nanoaleaciones pueden tener diferentes patrones de ordenamiento, como se observa en la Figura 10 nanoaleaciones segregadas como núcleo-caparazón (una capa de un tipo de átomo rodea a un núcleo de otro tipo), nanoaleaciones segregadas en capas o partículas de Janus (poseen dos caras, cada una con propiedades físicas y químicas diferentes), nanoaleaciones mixtas (pueden ser ordenadas o aleatorias); y nanoaleaciones multicapa o “cebolla” (presentan la forma de una cebolla alternando sus capas) (Johnston, 2012).

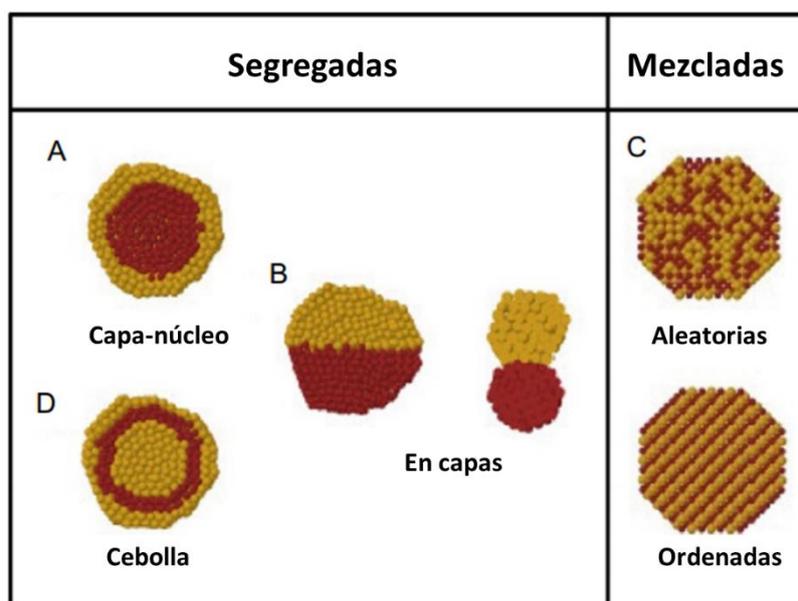


Figura 10. Principales patrones de ordenamiento de las nanoaleaciones.

Fuente: Tomado de Johnston, (2012)

Las nanopartículas metálicas más estudiadas son las nanopartículas de cobre (CuNPs), cuyas propiedades permiten desarrollar nanocatalizadores altamente reactivos, selectivos y estables, las aplicaciones de CuNPs en su mayoría son en nanocompuestos, debido a su inestabilidad en el ambiente (oxidación), y son fijadas en sustratos como gránulos poliméricos. Se ha comprobado el uso de CuNPs en sustratos de este tipo tienen un efecto antimicrobiano, aunque, no se compara con el de las nanopartículas de plata. Sin embargo, presenta un gran potencial sobre bacterias como *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, y *S. aureus* aunado a que su obtención es de bajo costo si se compara con otras nanopartículas metálicas (Chudobova *et al.*, 2015; Varghese *et al.*, 2019).

Por su parte las nanopartículas de plata (AgNPs) se caracterizan por sus propiedades antimicrobianas, ya que se ha comprobado que genera daños a la membrana celular (Varghese *et al.*, 2019). Gracias a estas propiedades su uso se ha extendido ampliamente en el área médica, se ha comprobado que también tienen propiedades antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias e inclusive actúan como agentes anticancerígenos (Rozalen *et al.*, 2020). Las AgNPs inducen la apoptosis en células cancerígenas (Xi-Feng *et al.*, 2016). Por lo que el uso de AgNPs ha sido principalmente en la creación de biosensores, en ensayos de detección actuando como marcadores biológicos, aplicaciones en pinturas y recubrimientos para evitar la presencia de bacterias, en dispositivos electrónicos como

mejoradores de la conductividad térmica y eléctrica (Xi-Feng *et al.*, 2016; Varghese *et al.*, 2019). Mientras, las nanopartículas de hierro, por sus propiedades magnéticas y biocompatibilidad son de gran interés para el área médica en aplicaciones como liberación de medicamentos y obtención de imágenes por resonancia magnética (Mody *et al.*, 2010).

Por su parte las nanopartículas de oro han sido utilizadas ampliamente desde aplicaciones artísticas como vitrales debido a sus interacciones con la luz visible, hasta aplicaciones médicas y de detección gracias a su biocompatibilidad y área superficial y cuyas propiedades se describen en el apartado 7.4 (Varghese *et al.*, 2019). Cabe destacar, que el desarrollo de investigaciones de nanopartículas de cobre, de hierro, plata y oro están en continuo crecimiento debido a que sus propiedades les permiten actuar como transductores en técnicas de detección (patógenos en alimentos, detección de enfermedades), así como su participación como agentes terapéuticos en el área de la medicina como la terapia fototérmica (Varghese *et al.*, 2019).

7.4 Nanopartículas de oro

Como se ha descrito o en el apartado 7.2, las propiedades de los materiales a escala nanométrica dependen fuertemente del tamaño, forma y naturaleza del material(es) que lo(s) conforma(n). Las nanopartículas de oro (AuNPs) han sido ampliamente utilizadas en el área terapéutica, electrónica, alimentaria, etc., para el diagnóstico de enfermedades, desarrollo y mejoramiento de dispositivos; así como, en la detección de agentes biológicos, gracias a sus propiedades ópticas, térmicas y de superficie, además de ser más estables en comparación con nanopartículas de otros elementos metálicos como el cobre (Yeh *et al.*, 2012).

Las AuNPs presentan mayor biocompatibilidad en comparación con nanopartículas de otros metales, gracias a la relación del área superficial y su volumen las nanopartículas de oro pueden ser conjugadas o recubiertas (Figura 11) con grupos que contienen tiol, amina y fosfato; estos recubrimientos previenen la agregación de las AuNPs así como que permiten funcionalizarlas (son más estables, se asocian con otros compuestos de manera específica, incrementan su toxicidad o su capacidad catalítica) (Stabile *et al.*, 2019).

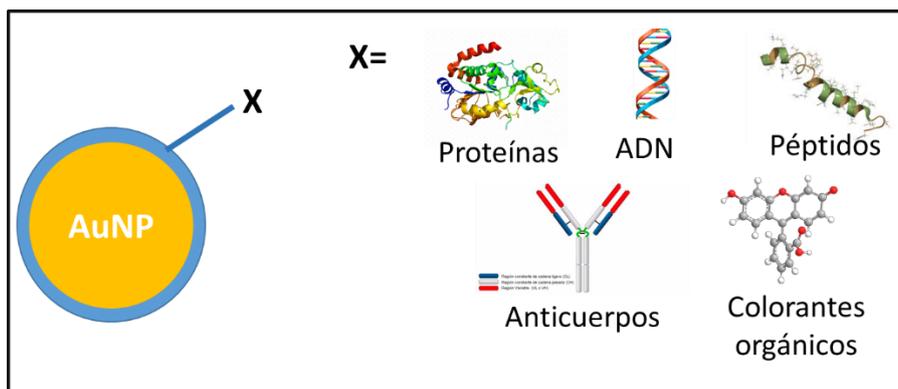


Figura 11. Representación gráfica de algunas moléculas con las que se pueden funcionalizar las nanopartículas de oro.

Fuente: Dominio público.

Las nanopartículas esféricas de oro con tamaño de 20 nm tienen una RPS aproximadamente a 520 nm en el espectro UV-visible, con ello se puede explicar el efecto de que el oro coloidal presenta un color rojo rubí (Figura 12); aunque esto dependerá del tamaño, geometría y entorno (agentes dispersantes y estabilizantes) (Huang y El-Sayed, 2010)

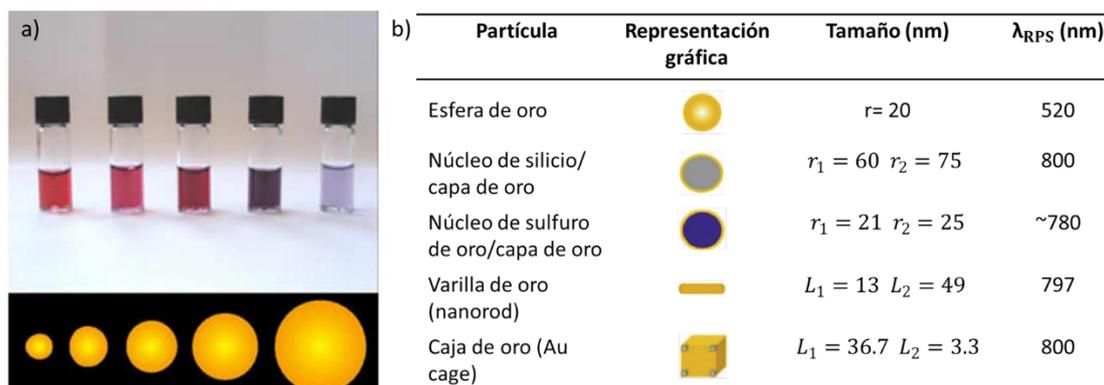


Figura 12. Representación gráfica de la influencia del tamaño de nanopartículas esféricas coloidales de oro en función del color (a); Influencia de la forma, tamaño y composición química de las nanopartículas de oro sobre la Resonancia de Plasmón Superficial RPS (b).

Fuente: Tomado y modificado de Varghese *et al.* (2019) y Stabile *et al.* (2019).

Las propiedades que destacan en las nanopartículas de oro son las ópticas, fototérmicas; además de que son compatibles con moléculas biológicas, lo que permite aplicaciones en la detección de patógenos o moléculas específicas e incluso aplicaciones médicas como la terapia fototérmica (Kajikawa *et al.*, 2006; Leon *et al.*, 2020).

La Espectroscopía Infrarroja Mejorada en la Superficie (SEIRA) y la Dispersión Raman mejorada en la Superficie (SERS), por sus siglas en inglés son técnicas que están asociadas a la superficie de plasmón de las nanopartículas de oro, al incidir luz en el espectro infrarrojo (en el caso de SEIRA), las moléculas analizadas tienen un incremento de absorción infrarroja de entre 10-1000 veces en presencia de la nanosuperficie, por otra parte SERS mide la dispersión inelástica de la luz monocromática de diferentes materiales, al adsorber un compuesto sobre la superficie metálica, este efecto se intensifica en magnitud de entre 10^{10} y 10^{11} lo que les da potencial para ser utilizadas en la detección de diferentes compuestos químicos como contaminantes ambientales con un alto nivel de especificidad y eficiencia (Pradier *et al.*, 2011; Kołataj *et al.*, 2018; Rosas-Vara *et al.*, 2019).

La funcionalidad de las nanopartículas de oro variará de acuerdo con su tamaño, morfología (esféricas, varillas, cápsulas, cajas, anillos, discos, prismas triangulares, etc.), y agentes estabilizantes o de recubrimiento (Stabile *et al.*, 2019).

7.5 Síntesis de nanopartículas

La síntesis de nanopartículas se remonta a la antigüedad, cuando el oro coloidal era utilizado como colorante en vitrales (Cheng *et al.*, 2014); sin embargo, Michael Faraday fue uno de los primeros en reportar la síntesis de nanopartículas de oro en 1857, utilizando como precursor el cloruro áurico. A partir de ahí se derivaron diferentes metodologías como las síntesis que utilizan borohidruro de sodio y citrato de sodio como agentes reductores (Oliveira *et al.*, 2017). Las variaciones de estos parámetros y otros como la temperatura, pH y tiempo de reacción permiten controlar las características de las nanopartículas en cuanto a forma, tamaño y agentes de recubrimiento (Cheng *et al.*, 2014).

Dentro de los principales factores que se deben considerar para la obtención de nanopartículas de oro están:

El tipo de síntesis: Los tipos de síntesis más comunes para la obtención de nanopartículas de oro es por el método Brust-Schiffrin, por síntesis electroquímica, por reducción química con citrato de sodio, síntesis verde o biológica. Cada método requiere de condiciones diferentes de energía y de insumos (Herizchi *et al.*, 2016).

Agente Precursor: Para la síntesis convencional de nanopartículas de oro es común utilizar como agente precursor el tetracloroaurato (AuCl_4) o ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) que es una sal de oro, ambos aportan los átomos de oro que permiten la formación de nanopartículas. La concentración que se utilice de precursor determinará en conjunto con el agente reductor la densidad y tamaño de partícula.

Agentes reductores: Los agentes reductores son utilizados en la síntesis química y síntesis verde. En el método convencional el citrato de sodio funge como agente reductor, aunque se ha reportado el uso de borohidruro de sodio y ácidos orgánicos como el ácido ascórbico, así como de extractos de plantas ricas en compuestos antioxidantes y fenólicos. La concentración de este definirá la dispersión de nanopartículas (densidad y tamaño).

Agentes estabilizantes o de recubrimiento: Los agentes de recubrimiento pueden ser moléculas, iones o alcanetioles que le darán estabilidad y/o funcionalidad a las nanopartículas (evitarán el aglomeramiento o agregación de las nanopartículas) (Cheng *et al.*, 2014). En el caso de reducción química con citrato de sodio y en el de la síntesis verde, los agentes reductores cumplen con esta función (Cheng *et al.*, 2014; Clarence *et al.*, 2020).

pH: El control de este factor es un poco difícil durante la síntesis; sin embargo, se ha reportado un mejor rendimiento en la síntesis de nanopartículas de oro por el método de reducción química con citrato de sodio en el rango de 4.7 a 5.3 en la escala de pH (Contreras-Trigo *et al.*, 2018).

Temperatura: La temperatura influye directamente en la dispersión de las nanopartículas ya que altas temperaturas permiten que los átomos se distribuyan de manera homogénea durante la etapa de crecimiento de los núcleos (Herizchi *et al.*, 2016). Cada factor va a estar determinado por el tipo de ruta o síntesis que se elija. En este sentido, los principales tipos de síntesis para la obtención de nanopartículas de oro se describen en el apartado 7.5.1

7.5.1 Método de Brust-Schiffrin

El método de Brust-Schiffrin se basa en el crecimiento de núcleos metálicos con la unión simultánea de monocapas de Tiol autoensambladas. Para que la reacción superficial se efectúe durante la nucleación las partículas se someten a un sistema de dos fases (agua-hidrocarburo), el AuCl_4^- es transferido de una solución acuosa a una de tolueno mediante bromuro de tetraoctilamonio y reducido con una solución acuosa de borohidruro de sodio en presencia de dodecanotiol ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SH}$). Este método se caracteriza por la gran

estabilidad de las nanopartículas resultantes y porque el tamaño de partícula se puede manipular por las condiciones de la reacción y no por la dinámica de la reducción los iones metálicos (Brust *et al.*, 1994; Herizchi *et al.*, 2016)

7.5.2 Síntesis electroquímica de nanopartículas de oro.

Este método se basa en la oxidación electroquímica de un ánodo para obtener iones metálicos, los cuales se reducen a un estado de oxidación inicial (carga 0) y comienzan a formar núcleos que serán estabilizados por sales de amonio (Figura 13). Dentro de las ventajas que ofrece este método es que se puede controlar de manera eficiente la nucleación, crecimiento y velocidad de reacción mediante la variación del potencial eléctrico y la densidad de corriente; en este método es importante considerar el material de los electrodos, el electrolito de soporte y la temperatura ya que influirán en la velocidad de reacción (Reetz *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2006)

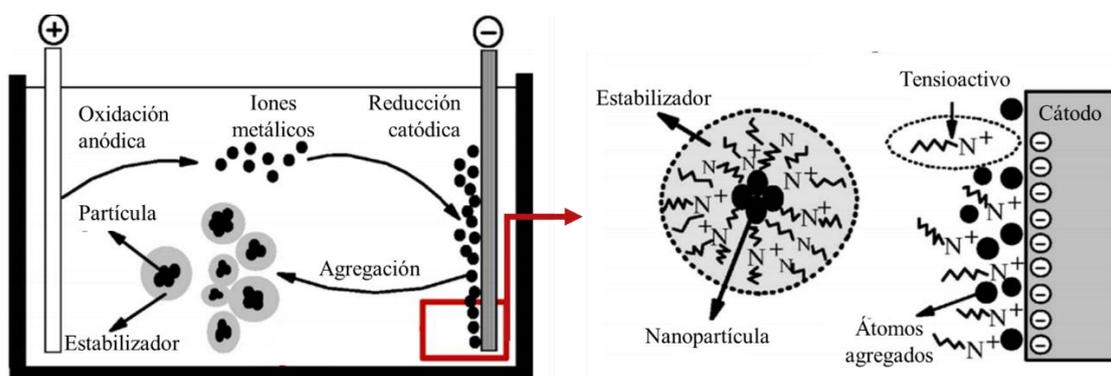


Figura 13. Representación gráfica de la síntesis de nanopartículas de oro por método electroquímico.

Fuente: Tomado de Huang *et al.*, (2006).

7.5.3 Síntesis química con citrato de sodio

Uno de los métodos más utilizados para la síntesis de nanopartículas de oro es el método por reducción química a partir de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) como precursor y citrato como agente reductor, el cual puede resumirse en los siguientes pasos (Figura 14): el citrato es oxidado a ácido dicarboxílico acetona, el cual posteriormente reducirá a el HAuCl_4 quedando átomos libres de oro, ocurre la nucleación de los átomos libres y comienzan a agruparse formando agregados, finalmente los agregados o núcleos comenzarán a incrementar de tamaño hasta que el precursor se agota y las nanopartículas quedan formadas (Kumar *et al.*, 2007; Polte 2015; Agunloye *et al.*, 2018). Cabe mencionar que este en este tipo de síntesis, el principal factor que determinará la cantidad y tamaño de partículas es la concentración del agente reductor y normalmente se obtiene

una suspensión coloidal rojo rubí. La principal desventaja de este método es que el agente reductor es un reactivo sintético (Hemanrson, 2008).

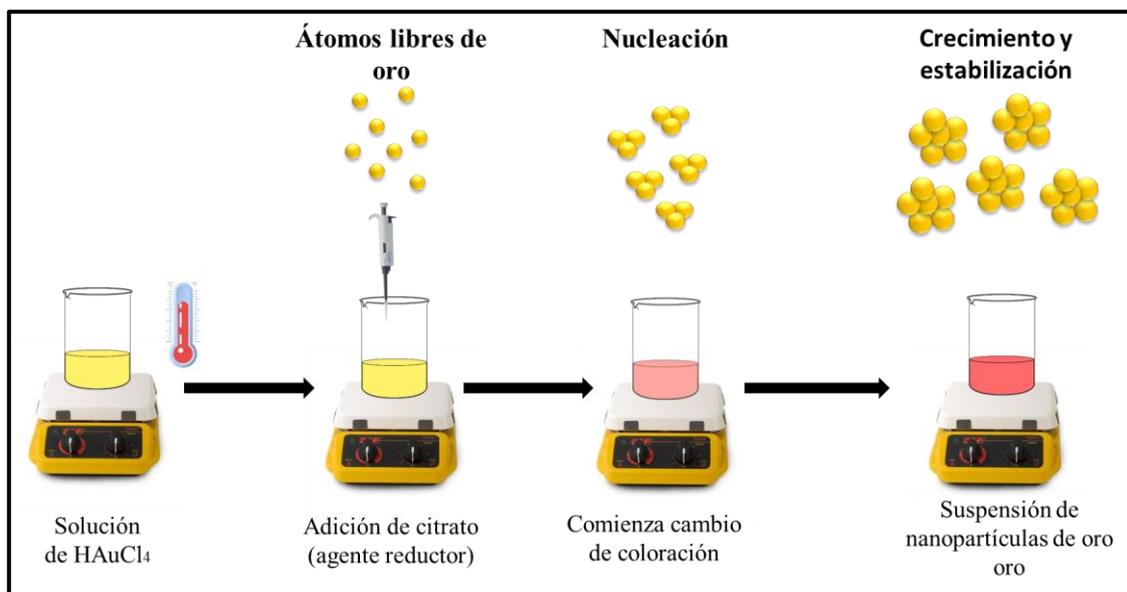


Figura 14. Representación esquemática de la síntesis de nanopartículas de oro por método de reducción química con citrato.
Fuente: Dominio público.

7.5.4 Síntesis verde de nanopartículas de oro

Ante la creciente preocupación por el cuidado del medio ambiente han surgido alternativas que permiten optimizar el uso de los recursos disponibles; así como, la reducción de residuos tóxicos que se acumulan en el medio ambiente (Herizchi *et al.*, 2016). La síntesis verde de nanopartículas pretende sustituir reactivos sintéticos por extractos de plantas principalmente; sin embargo, algunos otros agentes biológicos son utilizados tales como hongos, frutos, semillas entre otros dado que tienen compuestos bioactivos que pueden actuar como agentes reductores. Bogireddy *et al.* (2017) indica que los agentes que principalmente pudieran actuar como agentes reductores son los compuestos fenólicos (Figura 15), consecuentemente las plantas con alto contenido de polifenoles son de principal interés en la síntesis verde (Kharissova *et al.*, 2013). Dentro de las ventajas que tiene la síntesis verde de nanopartículas está que las nanopartículas resultantes son funcionales de acuerdo con el contenido químico de la planta de la cual se realizó el extracto, principalmente estos extractos actúan como agentes reductores y de recubrimiento (Balasubramanian *et al.*, 2020; Clarence *et al.*, 2020; Shobana *et al.*, 2020). Otra ventaja es que no se requiere de equipo especializado ni sofisticado y en

comparación a otros métodos no utiliza reactivos tóxicos como solventes ni altos niveles de energía (Kharissova *et al.*, 2013).

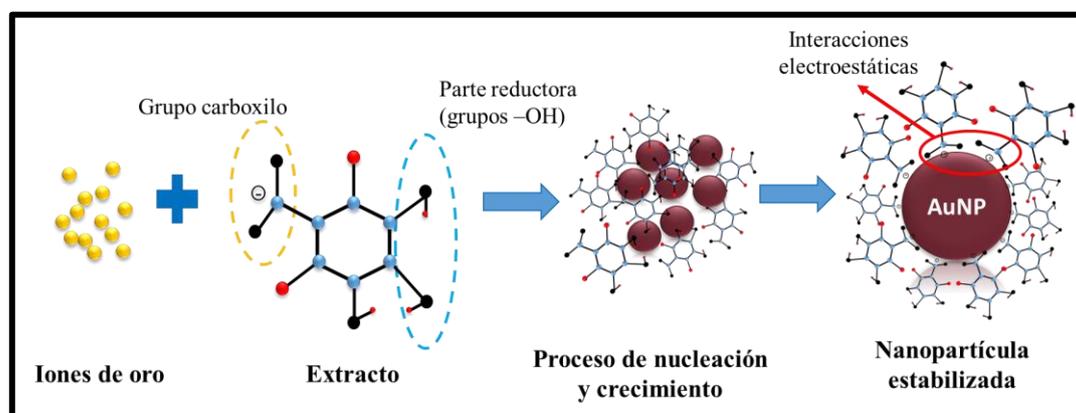


Figura 15. Representación gráfica de las interacciones de algunos grupos funcionales durante la síntesis verde de nanopartículas de oro.

Fuente: Tomado de Bogireddy *et al.* (2017)

Se ha reportado que la síntesis de nanopartículas de oro a partir de extractos de diferentes plantas, tales como, *Alternanthera sessilis*, *Coffea arabica seed*, *Sansevieria roxburghiana*, *Nerium oleander*, *Thyme*, *Sumac* e incluso con algunos subproductos como semillas, cáscara y tallos de uva, se les ha atribuido propiedades como antioxidantes, anticancerígenas, propiedades catalíticas, antiinflamatorias, antibacteriales, etc. (Qian *et al.*, 2019; Bogireddy *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2019; Tahir *et al.*, 2015; Hameliana *et al.*, 2018; Shabestariana *et al.*, 2017; Krishnaswamy *et al.*, 2014) (Figura 16).

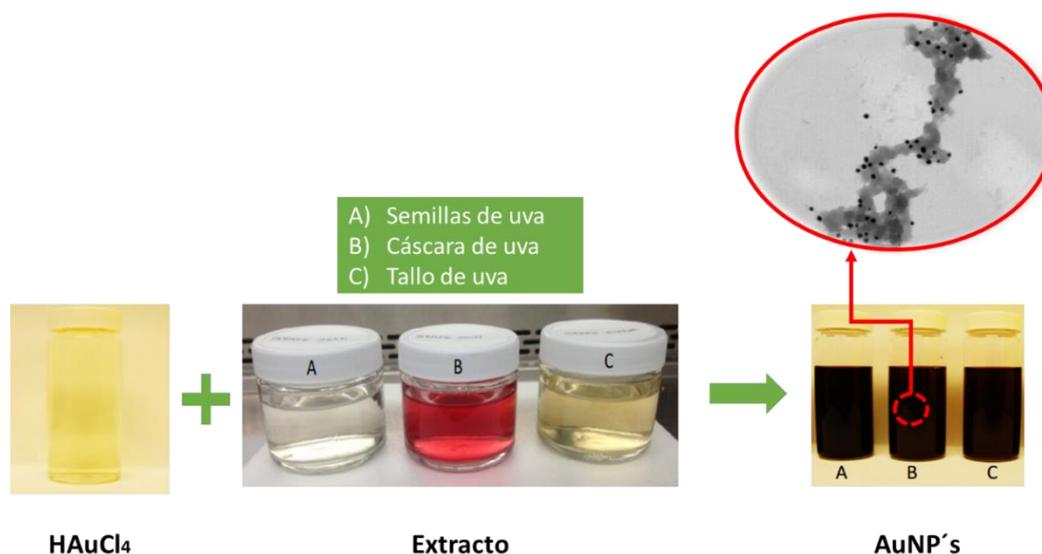


Figura 16. Síntesis verde de nanopartículas de oro a partir de extractos de semillas, cáscara y tallos de uva.

Fuente: Tomado de Krishnaswamy *et al.* (2014)

En muchos de los casos de síntesis verde de nanopartículas de oro las suspensiones coloidales obtenidas son color púrpura, aunque eso no determina que el tamaño de partícula sea mayor a 20 nm, incluso se ha llegado a observar una buena dispersión de partículas en cuanto a tamaño y forma.

7.6 Caracterización de nanopartículas de oro

La caracterización de nanopartículas incluye conocer su composición química, distribución del tamaño, su morfología, superficie, propiedades ópticas y magnéticas, entre otras (Shi *et al.*, 2015). El tamaño de las nanopartículas esféricas está determinado por su diámetro; sin embargo, el tamaño de las nanopartículas con morfología diferente puede ser definido por su diámetro geométrico, diámetro equivalente, área de superficie específica o diámetro de refracción. Estas características pueden ser conocidas por diferentes técnicas como microscopía electrónica, sedimentación por gravedad o centrifuga, absorción de gas, dispersión de rayos X, etc. (Shi *et al.*, 2015).

López-Lorente *et al.* (2014) menciona que la caracterización de las nanopartículas se puede evaluar con diferentes técnicas, entre ellas la espectrofotometría UV-visible, que permite confirmar la presencia de nanopartículas a través de la RPS, las técnicas microscópicas, técnicas de separación, técnicas espectroscópicas entre otras; siendo las más comunes la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM por sus siglas en inglés), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM por sus siglas en inglés), técnicas por fluorescencia como puntos cuánticos (QDs), espectroscopias vibracionales como la Raman e infrarroja, las cuales permitirán observar la forma, dispersión y estructura química de las nanopartículas así como de sus agentes de recubrimiento.

7.6.1 Espectrofotometría UV-visible y modelo de Haiss.

Los procesos espectroscópicos se basan en las interacciones entre radiación electromagnética y átomos o moléculas para producir sistemas de absorción o emisión (Burges, 2017). La espectrofotometría UV-visible permite hacer una confirmación rápida de la formación de nanopartículas gracias a la propiedad de superficie de plasmón de las nanopartículas de oro, el espectro UV-visible da un acercamiento de la monodispersidad o polidispersidad, tamaño y densidad de las nanopartículas (Amendola y Meneghetti 2009). La longitud de onda (λ) a la que absorbe el Plasmón de Superficie (PS) se asocia, directamente al tamaño de las nanopartículas, si la banda del plasmón de superficie se

recorre a valores de longitud de onda mayores a 520 nm las nanopartículas tienden a ser más grandes, si la banda presenta hombros es que la formación de nanopartículas es polidispersa, el ensanchamiento de la banda sugiere que la formación de las nanopartículas en cuanto a tamaño no fue homogénea por lo que existe un gradiente de tamaño de partícula; sin embargo, la forma de las nanopartículas es la misma (Cheng *et al.*, 2014).

El modelo propuesto por Haiss *et al.*, (2007) es un método simple que permite determinar el tamaño y concentración de las nanopartículas de oro a partir de la información de los espectros UV-visible. Para el cálculo del tamaño y densidad de partículas se utilizan las siguientes expresiones:

$$d = \exp\left(B_1 \frac{A_{spr}}{A_{450}} - B_2\right) \quad (1)$$

$$N = \frac{A_{450} \times 10^{14}}{d^2 \left(-0.295 - 1.36 \exp\left(-\left(\frac{d-96.8}{78.2}\right)^2\right)\right)} \quad (2)$$

Donde d corresponde al diámetro de las nanopartículas (nm); A_{spr} es la absorción de la Resonancia de Plasmón Superficial; A_{450} es la absorción a 450 nm; N corresponde a la densidad numérica de partículas, B_1 es la pendiente inversa del ajuste lineal de A_{spr}/A_{450} en dependencia del logaritmo natural del diámetro de partícula medido mediante TEM y B_2 es el cociente del intercepto entre la pendiente (B_0/m). Ríos-Corripio *et al.* (2013) y Davarpanaha y Guilhermino, (2019) han utilizado este método para la determinación del tamaño y concentración de nanopartículas de oro.

7.6.2 Microscopía Electrónica

Dentro de la caracterización para nanopartículas por microscopía las más utilizadas son la microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de sonda de barrido (SPM), la resolución de las imágenes varía de acuerdo con la técnica utilizada; sin embargo, estas técnicas permiten determinar las características estructurales de las nanopartículas (agregaciones, dispersión, tamaño y forma) (López-Lorente *et al.*, 2014). Vladára y Hodoroabab (2020) sugieren que las nanopartículas que se encuentran en polvo o en suspensión deben diluirse antes de ser fijadas para obtener mejor resultado en las imágenes SEM y evitar que las nanopartículas se acumulen y sobrepongan.

Dentro de las ventajas que tiene SEM es que permite obtener imágenes en dos dimensiones de nanopartículas tridimensionales, es un análisis rápido (Vladár *et al.*, 2014) y la resolución de este tipo de microscopios permiten observar nanopartículas con un tamaño inferior a 10 nm, las desventajas son que requiere muestras completamente secas y que trabaja con presiones de vacío, lo que representa un riesgo de agregación, cambios de tamaño y dispersión de las nanopartículas, debido al cambio de fase, aunque eso dependerá de su estabilidad (López-Lorente *et al.*, 2014). Esta técnica es ampliamente utilizada en la caracterización de nanopartículas e incluso para observar sus interacciones con sistemas biológicos (Bankar *et al.*, 2010; Goldstein *et al.*, 2014; Anand *et al.*, 2020; Sunayana *et al.*, 2020)

7.6.3 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier es una técnica muy útil para la caracterización de materiales. En esta técnica la radiación infrarroja incide a través de la muestra, una parte de la radiación es absorbida y la otra transmitida, una de las principales ventajas de esta técnica es cada molécula absorbe la radiación a diferentes regiones resultando un espectro diferente para cada molécula, básicamente cada banda corresponde a la frecuencia de vibración de cada uno de los enlaces de los átomos que conforman el material, por lo que permite verificar la presencia de grupos funcionales en una muestra (Dutta, 2017). La región infrarroja es dividida en tres secciones: infrarrojo cercano que va de 400-10 cm^{-1} , infrarrojo medio de 4,000-400 cm^{-1} y el infrarrojo lejano que va de 14,000-4,000 cm^{-1} (Dutta, 2017).

Las muestras medidas en espectrofotometría infrarroja (FTIR) pueden ser sólidas líquidas e incluso gaseosas, normalmente las nanopartículas de oro son caracterizadas en la sección del infrarrojo mediano (Ríos-Corripio *et al.*, 2016), y las bandas características de las nanopartículas de oro sintetizadas por reducción química con citrato de acuerdo con Nghiem *et al.*, (2010) son a 1589 cm^{-1} y 1403 cm^{-1} esto debido a la deformación del enlace $\text{CH}_2\text{-O}$ y al estiramiento del enlace C=O del grupo citrato. Esta técnica es muy útil principalmente en investigaciones que involucren bioconjugados con nanopartículas, así como en la síntesis verde de nanopartículas ya que permite conocer los grupos funcionales que se adhieren a la superficie de la nanopartícula (agentes estabilizantes y/o funcionales) después de la reacción (Ríos-Corripio *et al.*, 2016; Pięta *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

7.7 Métodos de superficie de respuesta

La optimización tiene como objetivo mejorar los rendimientos de un proceso o producto con el fin de obtener el máximo beneficio posible (Almeida-Bezerra *et al.*, 2008). De acuerdo con Dean *et al.*, (2017) los métodos de superficie de respuesta son un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas, enfocadas a evaluar el efecto de factores múltiples sobre una respuesta o conjunto de ellas. El principal objetivo es encontrar simultáneamente los niveles de estas variables para lograr el mejor rendimiento del sistema (Khuri y Mukhopadhyay, 2010). Estos Métodos se basan en el ajuste de los modelos empíricos a los datos experimentales obtenidos a partir del diseño experimental; estas metodologías emplean funciones polinómicas lineales y cuadráticas que se utilizan para describir el sistema estudiado, para poder modelar y explorar los niveles experimentales hasta lograr la optimización.

Los elementos que conforman estas metodologías son los siguientes:

Dominio experimental o sistema: Es el espacio experimental para investigar, se encuentra definido o delimitado por los límites máximos y mínimos de las variables establecidas.

Diseño experimental: Es un conjunto de experimentos, definidos por una matriz con los diferentes niveles de las variables establecidas, realizados con el fin de entender sus efectos sobre la variable de respuesta.

Factores o variables independientes: Son los tratamientos o las fuentes de variación del experimento, algunos ejemplos son el pH, temperatura, concentraciones en los reactivos, tiempo de tratamientos como irradiación o sonicación, temperaturas, etc.

Niveles: Son las variaciones a las que los factores serán sometidos durante el experimento, por ejemplo: Para el factor “tiempo de irradiación (min)”, se establecen tres niveles 20, 40 y 60 min.

Variables de respuesta o variables dependientes: Son las propiedades de interés a estudiar, los valores medidos durante el experimento; algunos ejemplos son el rendimiento, absorbancias, resistencia, permeabilidad, etc. (Almeida-Bezerra *et al.*, 2008).

Algunos aspectos a considerar cuando se utiliza la metodología de superficie de respuesta es la selección de las variables independientes, es imposible considerar todas las variables involucradas en un proceso, es por ello que se deben seleccionar las que presenten

mayores efectos sobre la variable de respuesta; otro aspecto es la selección del diseño experimental y la evaluación de ajuste del mismo, esta evaluación puede ser hecha mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) (Almeida-Bezerra *et al.*, 2008). El objetivo de este análisis es comparar la variación debida a los tratamientos con la variación debida al error de las respuestas generadas, para conocer la significancia de la regresión utilizada. Por último, las determinaciones de las condiciones óptimas en los modelos cuadráticos se caracterizan como un punto máximo (Figura 17 a), mínimo (Figura 17 d) o de silla de montar (Figura 17 e). La representación de la ecuación del modelo predicho se puede obtener a través de la gráfica de superficie de respuesta (Figura 17) (Almeida-Bezerra *et al.*, 2008; Khuri y Mukhopadhyay, 2010; Dean *et al.*, 2017).

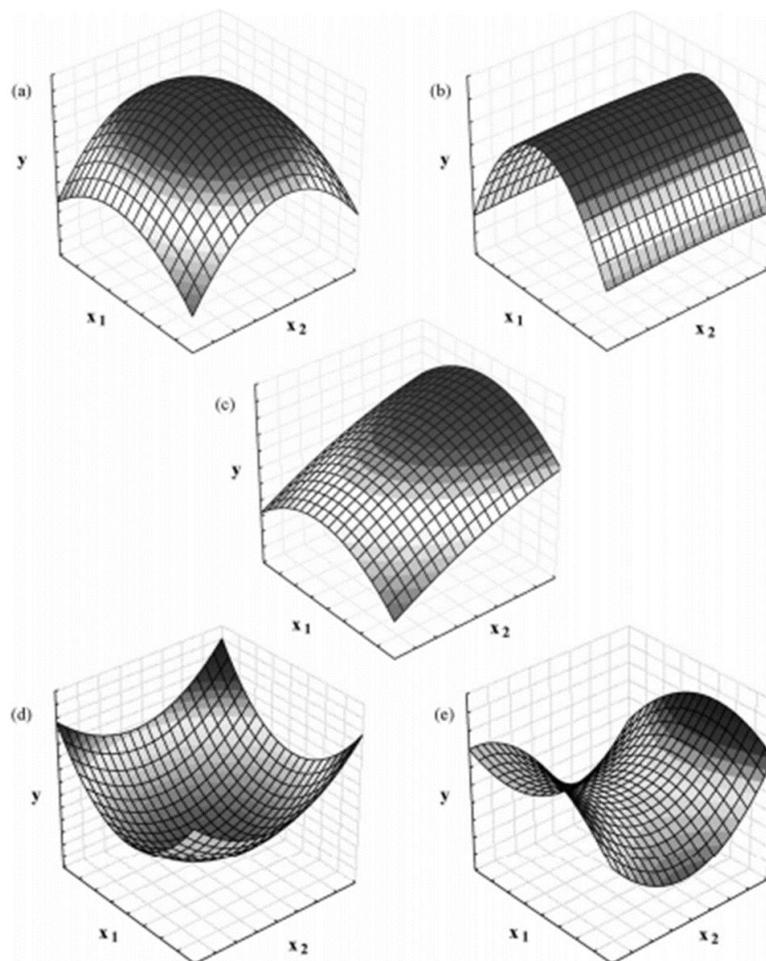


Figura 17. Ejemplos de superficies de respuesta generados a partir de un modelo de optimización cuadrático de dos variables. Punto máximo (a), meseta (b), máximo fuera de la región experimental (c), mínimo (d) y superficie en forma de silla (e).

Fuente: Tomado y traducido de Almeida-Bezerra *et al.* (2008).

En la literatura existe diversos ejemplos de optimización de síntesis de nanopartículas de oro mediante la metodología de superficie de respuesta, en su mayoría los diseños experimentales utilizados son el diseño central compuesto y el Box-Behnken (Honary *et al.*, 2013; Krishnaswamy *et al.*, 2014; Saha y Gupta, 2016; Eskandari-Nojehdehi *et al.*, 2016; Alam *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018).

7.7.1 Diseño Central Compuesto (DCC)

Es uno de los modelos de segundo orden más utilizado, los diseños centrales compuestos pueden ser del tipo factorial o factorial fraccionado con puntos centrales y puntos axiales; este tipo de diseño presenta características como, que requiere un número de experimentos de acuerdo a $N = k^2 + 2k + c_p$, donde, k es el número de factores y c_p es el número de réplicas del punto central (de 3 a 5); los valores de σ dependen del número de variables y se puede calcular a partir de $\alpha = 2^{(k-p)/4}$; todos los factores son analizados en 5 niveles ($-\alpha, -1, 0, 1, +\alpha$) (Almeida-Bezerra *et al.*, 2008). Una representación gráfica de un diseño central compuesto se muestra en la Figura 18, donde en a) se observa un diseño central compuesto para dos variables, mientras b), corresponde a 3 variables con sus respectivos puntos axiales.

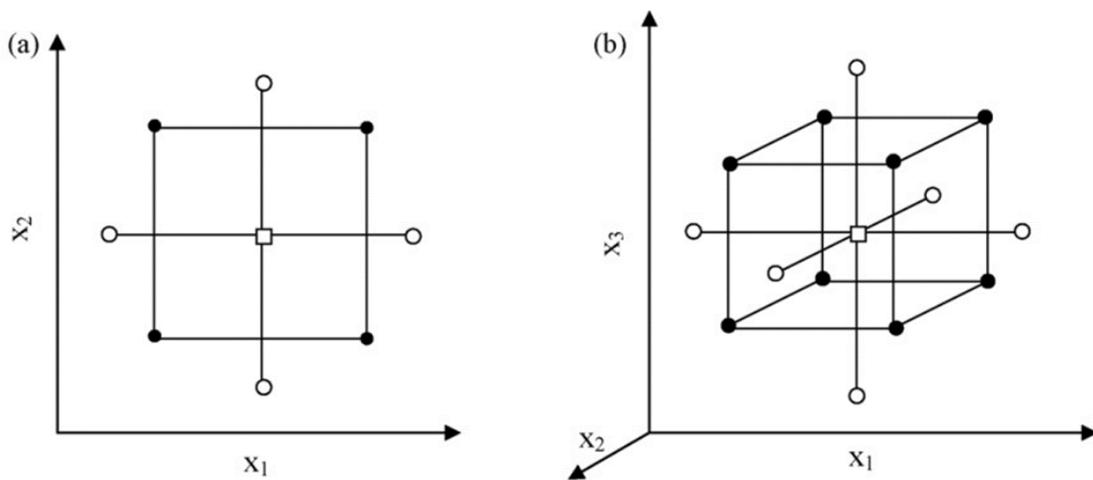


Figura 18. Diseño compuesto central de 2 factores (a); diseño central compuesto de 3 factores (b); (●) puntos del diseño experimental; (○) puntos axiales y (□) puntos centrales.

Fuente: Tomado de Almeida-Bezerra *et al.* (2008)

7.7.2 Diseño Box-Behnken

Este modelo es un modelo de respuesta de segundo orden, estos diseños requieren como mínimo de tres factores y suelen tener menos puntos en el diseño; la Figura 19c muestra

que el diseño Box-Behnken presenta 13 puntos experimentales mientras que el diseño 3^3 presenta 27 (Figura 19b) lo que hace a este modelo más eficiente y económicos que los diseños 3^k (Almeida-Bezerra *et al.*, 2008).

Las principales características de este diseño es que requiere de un número de experimentos de acuerdo con $N = 2k(k - 1) + c_p$ donde k es el número de factores y c_p el número de puntos centrales, los factores solo se pueden ajustar a 3 niveles en intervalos iguales entre niveles (-1, 0, 1). Este diseño es ampliamente utilizado en procesos químicos y físicos (Almeida-Bezerra *et al.*, 2008; Dean *et al.*, 2017).

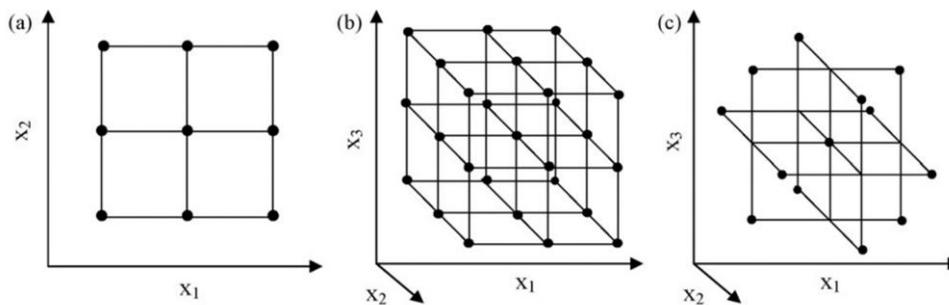


Figura 19. Diseños experimentales a tres niveles: Diseño factorial de optimización de 2 variables (a); diseño de 3 variables (b) y Diseño Box-Behnken con 3 variables (c).
Fuente: Tomado de Almeida-Bezerra *et al.* (2008)

7.8 Producción mundial y nacional de café

El café se cultiva y es procesado en 70 países alrededor del mundo, las especies de café más comercializadas son el café Arabica (*Coffea arabica*) y Robusta (*Coffea canephora*), la producción de café ha incrementado un 65% a nivel mundial en las últimas tres décadas, produciéndose alrededor de 170 millones de sacos de 60 kg en el periodo 2018-2019 (ICO, 2019). Los países con mayor producción son Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia y Etiopía que en conjunto cubren el 70% de la producción mundial, mientras que México en 2019 aportó alrededor del 2.5% de la producción mundial total. En México el café verde es el 14^{vo} producto más exportado, en 2018 México se colocó en el 11^{vo} lugar de países productores, teniendo un crecimiento del 2.9% en comparación con el año anterior. Sin embargo, la producción de 2018 se encuentra por debajo del promedio anual debido a los problemas de sobreproducción que ha habido a nivel mundial y la consecuente baja de precios del mismo producto (ICO, 2019).

De acuerdo con SIAP (2019) México exporta a alrededor de 48 países como Estados Unidos Bélgica, Alemania Italia, Canadá, etc., siendo Estados Unidos su mayor cliente con valores de exportación de más de 200 millones de dólares en 2018. Los tres estados con mayor producción son Chiapas, Veracruz y Puebla aportando 41.3, 24.3 y 15.7% de la producción nacional respectivamente (SIAP, 2019). Veracruz es el segundo estado con mayor producción de café cereza en México (Cuadro 1). De acuerdo con Nava y Hernández, (2017) Chicontepec, Papantla, Atzalan, Misantla, Coatepec, Huatusco, Córdoba, Zongolica, Tezonapa y los Tuxtlas son las principales regiones productoras.

Cuadro 1. Principales estados productores de café cereza en México.

Rank	Entidad federativa	Región	Volumen (Toneladas)	Variación (%) 2017-2018
Total nacional			859,992	2.9
1	Chiapas	Sur-sureste	354,944	4.6
2	Veracruz	Sur-sureste	209,769	7.9
3	Puebla	Centro	135,710	5.2
4	Oaxaca	Sur-sureste	70,454	6.6
5	Guerrero	Centro	38,771	-6.8
6	Hidalgo	Centro	27,748	-18.1
7	San Luis Potosí	Centro-occidente	12,218	40.5
8	Jalisco	Centro-occidente	4,554	1.1
9	Colima	Centro-occidente	3,256	11.1
10	Nayarit	Noroeste	1,564	-88.9

Fuente: SIAP, (2019).

7.8.1 Procesamiento agroindustrial del café cereza

La cosecha del café cereza se realiza de manera manual principalmente; sin embargo, también se puede realizar de manera mecánica, esto es posible en regiones donde el café tiene un proceso de maduración sincronizado para reducir la cantidad de cerezas no maduras cosechadas (Borém, 2014).

El procesamiento *post-cosecha* del café puede realizarse por dos métodos principalmente, la vía seca y la vía húmeda; el primero es un método relativamente sencillo, el café cereza es secado para evitar la descomposición de los azúcares y afectar la calidad del producto final, una vez que la fruta haya alcanzado alrededor de 12% de humedad será descascarado. El proceso de secado puede llevarse a cabo por secado en patios y radiación

solar o secado mecánico y el café puede llevar frutos que no han madurado completamente (Alves *et al.*, 2017; Ferrão, 2009).

El segundo método (vía húmeda) es más complejo en comparación con el primero (Figura 20), presenta algunas desventajas, ya que requiere de más equipamiento y mayor cantidad de insumos como el agua; sin embargo, ofrece una mejor calidad en el producto final (acentúa la acidez y el aroma) y consecuentemente mayor valor económico (Alves *et al.*, 2017). Este método de procesamiento genera residuos industriales tales como, pulpa de café, mucilago y pergamino (Sanz-Uribe *et al.*, 2017).

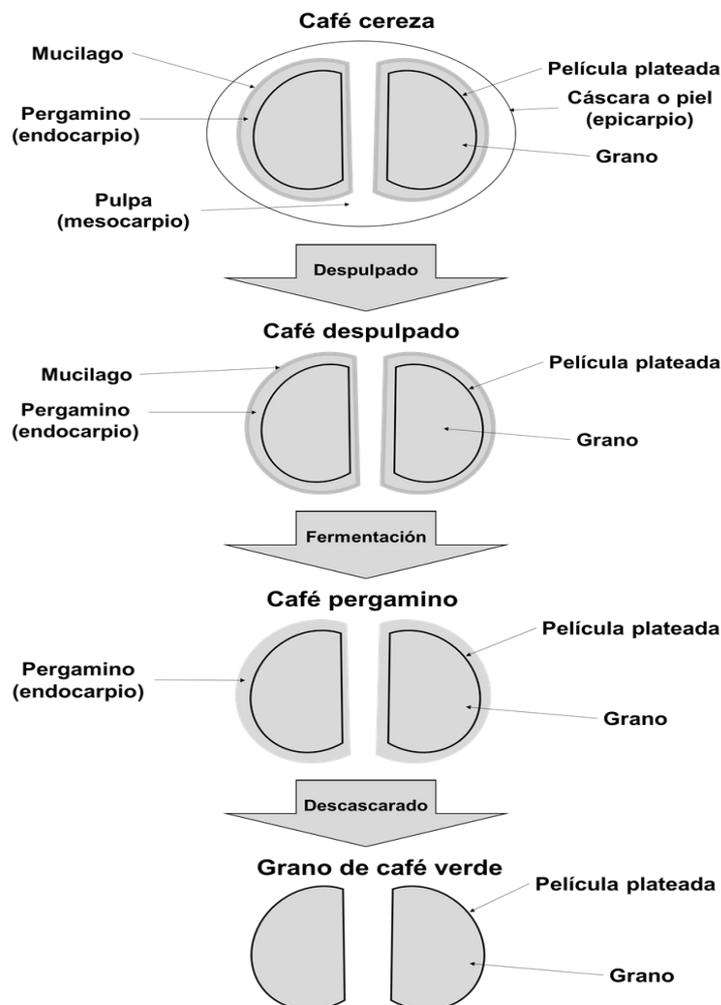


Figura 20. Procesamiento de café por vía húmeda.
Fuente: Tomado y traducido de Alves *et al.* (2017)

En el proceso de despulpado el epicarpio y el mesocarpio del café cereza es retirado, este proceso se ve favorecido por las propiedades viscosas del mucilago; sin embargo, su presencia no favorece las etapas siguientes del proceso, por lo que es necesaria la etapa

de fermentación. Normalmente este proceso se lleva a cabo por fermentación espontánea y tiene efectos sobre la calidad sensorial del producto final, las pectinasas derivadas de la fermentación degradarán al mucilago, este proceso dura entre 24 y 72 h dependiendo de las condiciones iniciales del café cereza, condiciones climáticas, y grado de madurez del fruto (Alves *et al.*, 2017; Sanz-Urbe *et al.*, 2017).

7.8.2 Pulpa de café

La pulpa de café es el mesocarpio del café cereza (Figura 21) y el mayor subproducto que surge a partir del procesamiento del café por vía húmeda, se estima que la pulpa de café corresponde entre 40 y 50% del café cereza producido; es decir que por cada 2 toneladas de café cereza producido alrededor de 1 tonelada es pulpa de café (Roussos *et al.*, 1995). Debido a sus propiedades características de pH (inferior a 5) y al mal manejo la pulpa de café es considerada como un gran contaminante de suelos y agua (Fierro-Cabrales *et al.*, 2018). Por ello se han surgido diferentes investigaciones como alternativa de uso de la pulpa de café en procesos de fermentación, extracción de compuestos antioxidantes, compostaje, entre otros (Blandón-Castaño *et al.*, 1999; López *et al.*, 2013; Peña-Aguilar *et al.*, 2017) con el fin de darle valor agregado.

Las propiedades de la pulpa de café resaltan por poseer cantidades importantes de agentes antioxidantes, fenólicos como ácidos clorogénicos y azúcares fermentables (Cuadro 2); el contenido químico y nutrimental puede variar de acuerdo a el área geográfica y a la especie (Alves *et al.*, 2017). Ramírez-Coronel *et al.*, (2004) reportaron la presencia de cuatro clases de polifenoles presentes en la pulpa de café: flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos, flavanoles y antocianidinas.

El contenido químico nutrimental de la pulpa de café le dan la posibilidad de ser utilizada como sustrato en diversos procesos, así como la extracción de compuestos que permitan desarrollar nuevos productos como suplementos alimenticios o incluso como conservantes naturales alimentarios (Bhoite *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2017).

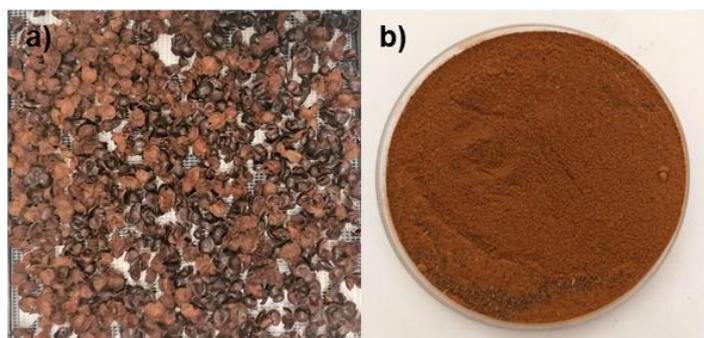


Figura 21. Pulpa de café obtenida del beneficiado húmedo de café (a); pulpa de café deshidratada y triturada (b).

Fuente: Fotografías propias.

Por su composición química y su alto contenido de polifenoles es una alternativa viable a ser utilizado como agente reductor en la síntesis verde de nanopartículas de oro. Además, se ha comprobado que el extracto acuoso de pulpa de café tiene un efecto antibacteriano sobre bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, así como en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (Duangjai *et al.*, 2016).

Cuadro 2. Contenido químico y nutrimental de la pulpa de café (base seca).

Parámetro medido	Valores de medida
Azúcares totales (%)	14.40
Fenoles totales (mg EAG/g pulpa)	4.09
Capacidad antioxidante DPPH (μmol ETrolox/g pulpa)	132.54
Cafeína (%)	2.26
Taninos (%)	3.00
Proteína (%)	10.63
Grasa (%)	5.78
Fibra (%)	36.07
Ceniza (%)	9.58

Fuente: Murthy y Madhava, (2012); Fierro-Cabrales *et al.* (2018)

Literatura citada

- Agunloye E., L. Panariello, A. Gavriilidis, and L. Mazzei. 2018. A model for the formation of gold nanoparticles in the citrate synthesis method. *Chemical Engineering Science*. 191: 318-331.
- Alam M. S., A. Garg, F. H. Pottoo, M. K. Saifullah, A. I. Tareq, O. Manzoor, and M. N. Javed. 2017. Gum ghatti mediated, one pot green synthesis of optimized gold nanoparticles: Investigation of process-variables impact using Box-Behnken based

- statistical design. *International Journal of Biological Macromolecules*. 104: 758-767.
- Aljabali A. A. A., Y. Akkam, M. S. Al-Zoubi, K. M. Al-Batayneh, B. Al-Trad, O. A. Alrob, A. M. Alkilany, M. Benamara, and D. J. Evans. 2018. Synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Ziziphus zizyphus* and their Antimicrobial Activity. *Nanomaterials*. 8: 174.
- Almeida-Bezerra M., R. Erthal-Santelli, E. Padua Oliveira, L. Silveira Villar, and L. Amelia Escaleira. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 76: 965-977.
- Alves R. C., F. Rodrigues, M. Antón-Nunes, A. F. Vinha, and M. B. P. P. Oliveira. 2017. State of the art in coffee processing by-products. *In: Handbook of Coffee Processing By-Products*, (*i.e.*, pp: 1–26). ISBN 9780128112908
- Amendola V., and M. Meneghetti. 2009. Size evaluation of gold nanoparticles by UV–vis spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*. 11: 4277–4285.
- Ananda KR. Rajamanikandan, A. Selva-Sharma, M. Ilanchelian, F. Iqbal-Khan, C. Tilokea, N. Kumar–Katarid, P. Boomie, C. Balakumar, M. Saravanang, S. Palanisamy, M. Rameshi, D. Lai, and A. A. Chuturgoona. 2020. Human serum albumin interaction, in silico and anticancer evaluation of Pine-Gold nanoparticles. *Process Biochemistry*. 89: 98-109.
- Anastas P. and N. Eghbali. 2009. Green chemistry: Principles and practice. *chemical society reviews*. 39: 301–312.
- Arsirim-Uçar D. K., and B. Çabuk. 2020. Emerging antibacterial and antifungal applications of nanomaterials on food products. *In: Nanotoxicity: Prevention, and Antibacterial Applications of Nanomaterials*. Holt S. (ed). (*i.e.*, pp: 1–26) ISBN: 9780128199435
- Balasubramanian S., S. M. Jelastin K., and T. Lurthu P. 2020. Biogenic synthesis of gold nanoparticles using *Jasminum auriculatum* leaf extract and their catalytic, antimicrobial and anticancer activities. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 57: 101620.
- Bankar A., B. Joshi, A. Ravi-Kumar, and S. Zinjarde. 2010. Banana peel extract mediated synthesis of gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 80: 45-50.
- Bhoite R. N., P. N. Navya, P. S. Murthy. 2013. Statistical optimization of bioprocess parameters for enhanced gallic acid production from coffee pulp tannins by *Penicillium verrucosum*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 43: 350–363.
- Blackman J. A., and C. Binns. 2008. Introduction. *In: Handbook of Metal Physics*. Blackman J. A. (ed.). (*i.e.*, pp: 1-16). ISBN 9780444512406
- Blandón-Castaño G., M. T. Dávila-Arias, y N. Rodríguez-Valencia. 1999. Caracterización microbiológica y físico-química de la pulpa de café sola y con mucílago, en proceso de lombricompostaje. *Cenicafé*. 50: 5-23.

- Blinová L., M. Sirotiak, A. Bartošová and M. Soldán. 2017. Utilization of waste from coffee production. Faculty of Materials Science and Technology in Trnava Slovak University of Technology in Bratislava. 40: 92-101.
- Bogireddy N. K. R., L.M. Gomez, I. Osorio-Roman, and V. Agarwal. 2017. Synthesis of gold nanoparticles using *Coffea Arabica* fruit extract. *Advances in nano research* 5: 253–60.
- Bogireddy N. K. R., U. Pal, L. Martinez G., and V. Agarwal. 2018. Size controlled green synthesis of gold nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and their catalytic performance in 4-nitrophenol reduction. *RSC Advances*. 8: 24819–24826.
- Borém F. M., 2014. *Handbook of Coffee Post-Harvest Technology*, ISBN 978-0-9915721-0-6.
- Brust M., M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, and R. Whyman. 1994. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system. *Journal of Chemical Society. Chemical Communications*. 0: 801–802.
- Burges C. 2017. The basis for good spectrophotometric UV-visible measurements. In: *UV-visible spectrophotometry of water and wastewater*. O. Thomas, C. Burges (Eds.). (*i.e.*, pp: 1-35). ISBN 9780444638977
- Casas-Hidalgo A. I., M. Roman-Aguirre, E. Valenzuela, J. Y. Verde-Gomez, A. Camacho-Davila, R. S. Varma, and V.H. Ramos-Sanchez. 2016. Sustainable application of pecan nutshell waste: Greener synthesis of Pd-based nanocatalysts for electro-oxidation of metanol. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41: 23329-23335.
- Carlson R., and J. E. Carlson. 2005. Design and optimization in organic synthesis. in: *data handling in science and technology*. Carlson R. y J. E. Carlson (eds). (*i.e.*, pp: 243-319). ISBN 9780444515278
- CELAC. 2014. Plan para la seguridad alimentaria, nutrición y erradicación del hambre de la celac 2025.
- Chávez-Cortés M. M. y G. Binnqüist Cervantes, (2011). La CFE: Un análisis de la integración de la sustentabilidad en la empresa. *Administración y Organizaciones*. 1: 49-71.
- Chen X., X. Zhao, Y. Gao, J. Yin, M. Bai, and F. Wang. 2018. Green synthesis of gold nanoparticles using carrageenan oligosaccharide and their in vitro antitumor activity. *Marine drugs*. 16: 277.
- Cheng H.-W., Z. R. Skeete, E. R. Crew, S. Shan, J. Luo, and C.-J. Zhong. 2014. Synthesis of gold nanoparticles. *In: Comprehensive Analytical Chemistry*. (*i.e.*, pp: 37–79). ISBN: 9780444632852
- Chudobova D., K. Cihalova, P. Kopel, L. Melichar, B. Ruttkay-Nedecky, M. Vaculovicova, V. Adam, and R. Kizek. 2015. Complexes of metal-based nanoparticles with chitosan suppressing the risk of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infections. *In: Nanotechnology in diagnosis, treatment and prophylaxis of infectious diseases*. (*i.e.*, pp: 217-232). ISBN: 9780128013175

- Clarance P. B. Luvankar, J. Sales, A. Khusro, P. Agastian, J.-C. Tack, M. M. Al Khulaifi, H. A. AL-Shwaiman, A. M. Elgorban, A. Syed, and H.-J. Kim. 2020. Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using endophytic fungi *Fusarium solani* and its in-vitro anticancer and biomedical applications. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 27: 706-712.
- Ciesielski A., and P. Samorì. 2014. Graphene via sonication assisted liquid-phase exfoliation. *Chemical Society Review*. 43: 381–398.
- Contreras-Trigo B., V. Díaz-García, E. Guzmán-Gutiérrez, I. Sanhueza, P. Coelho, S. E. Godoy, S. Torres, and P. Oyarzún. 2018. Slight pH fluctuations in the gold nanoparticle synthesis process influence the performance of the citrate reduction method. *Sensors*. 18: 2246.
- CSA. 2017. Comité de Seguridad Alimentaria Mundial (CSA). Marco estratégico mundial para la seguridad alimentaria y la nutrición (MEM).
- Davarpanaha E., and L. Guilhermino. 2019. Are gold nanoparticles and microplastics mixtures more toxic to the marine microalgae *Tetraselmis chuii* than the substances individually? *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 181. 60-68.
- Dean A., D. Voss, and D. Draguljić. 2017. Design and analysis of experiments. R. DeVeaux, S. E. Fienberg and I. Olkin. Second edition. Springer International Publishing AG, Gewerbstrasse 11, 6330 Cham, Switzerland (Ed.). (*i.e.*, pp: 565-592).
- Dutta A. (2017). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *In: Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, (*i.e.*, pp: 73–93). ISBN: 9780323461405
- Dutta P. P., M. Bordoloi, K. Gogoi, S. Roy, B. Narzary, D. B. Bhattacharyya, P. K. Mohapatra, and B. Mohapatra. 2017. Antimalarial silver and gold nanoparticles: Green synthesis, characterization and in vitro study. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 91: 567-580.
- Eskandari-Nojehdehi M., H. Jafarizadeh-Malmiri, and J. Rahbar-Shahrouzi. 2016. Optimization of processing parameters in green synthesis of gold nanoparticles using microwave and edible mushroom (*Agaricus bisporus*) extract and evaluation of their antibacterial activity. *Nanotechnology Reviews*. 5: 537–548.
- Ferrão J. E. M., 2009. O café, a bebida negra dos sonhos claros. Chaves Ferreira-Publicações S. A., Lisboa, Portugal (Ed.). (*i.e.*, 224 p.)
- Ferreira S. L. C., R. E. Bruns, H. S. Ferreira, G. D. Matos, J. M. David, G. C. Brandão, E. G. P. da Silva, L. A. Portugal, P. S. dos Reis, S. Souza, and W. N. L. dos Santos. 2007. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*. 597: 179-186
- Freestone I., N. Meeks, M. Sax, and C. Higgitt. 2007. The Lycurgus Cup – A Roman Nanotechnology. *Gold Bulletin*. 40: 270-277.
- Goldstein A., Y. Soroka, M. Frušić-Zlotkin, I. Popov, and R. Kohen. 2014. High resolution SEM imaging of gold nanoparticles in cells and tissues. *Journal of Microscopy*. 256: 237-247.

- Haiss W., N. T. K. Thanh, J. Aveyard, and D. G. Fernig. 2007. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV–vis spectra. *analytical chemistry*, (11): 4215–4221.
- Hameliana M., K. Varmiraa, and H. Veisib. 2018. Green synthesis and characterizations of gold nanoparticles using *Thyme* and survey cytotoxic effect, antibacterial and antioxidant potential. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 184: 71-79.
- Hermanson G. T., Preparation of Colloidal Gold-Labeled Proteins, in: G. T. Hemarson (Ed.), *Bioconjugate techniques*, Academic Press Inc., San Diego, 2008, pp. 924–935.
- Herizchi R., E. Abbasi, M. Milani, and A. Akbarzadeh. 2016. Current methods for synthesis of gold nanoparticles, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44:2 596-602.
- Honary S., P. Ebrahimi, and M. Ghasemitabar. 2013. Preparation of gold nanoparticles for biomedical applications using chemometric technique. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* June. 12: 295-298.
- Huang X., and M. A. El-Sayed. 2010. Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT). *Alexandria Journal of Medicine*. 47: 1-9.
- Huang C.-J., P.-H. Chiu, Y.-H. Wang, K.-L. Chen, J.-J. Linn, and C.-F. Yang. 2006. Electrochemically controlling the size of gold nanoparticles. *Journal of The Electrochemical Society*. 153: D193-D198.
- ICO. 2019. Coffee Development Report 2019. Growing for prosperity. Economic viability as the catalyst for a sustainable coffee sector.
- Ismail E., A. Saqer, E. Assirey, A. Naqvi, and R. Okasha. 2018. Successful green synthesis of gold nanoparticles using a *Corchorus olitorius* extract and their antiproliferative effect in cancer cells. *International Journal of Molecular Science*. 19: 2612.
- Johnston R. L. 2012. Metal nanoparticles and nanoalloys. *In: Frontiers of nanoscience*. R. L. Johnston, J.P. Wilcoxon (Eds.). (i.e., pp: 1-41). ISBN 9780080963570
- Kajikawa K., S. Abe, Y. Sotokawa, and K. Tsuboi. 2006. Localized surface plasmon resonance enhanced second-harmonic generation. *In: Handai Nanophotonics*, (i.e., pp: 185–196).
- Klabunde K. J., and R. M. Richards. 2009. *Nanoscale materials in chemistry*, 2nd edition. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (Ed.) (i.e., 777 p.)
- Kharissova O. V., H. V. Rasika D., B. I. Kharisov, B. Olvera P., and V. M. Jiménez P. 2013. The greener synthesis of nanoparticles. *Trend in Biotechnology*. 31: 240-248.
- Khuri A., and S. Mukhopadhyay. Response surface methodology. *Advanced Review*. 2: 128-149.
- Krishnaswamy K., H. Vali, and V. Orsat. 2014. Value-adding to grape waste: Green synthesis of gold nanoparticles. *Journal of Food Engineering*. 142: 210-220.

- Kumar S., K. S. Gandhi, and R. Kumar. 2007. Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method. *industrial & engineering chemistry research*. 46: 3128-3136.
- Leon L., E. J. Chung and C. Rinaldi. 2020. A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications. *In: Nanoparticles for Biomedical Applications, (i.e., pp: 1–4)*. ISBN: 9780128166628
- Li H., Z. Yin, Q. He, H. Li, X. Huang, G. Lu, and H. Zhang. 2011. Fabrication of single- and multilayer MoS₂ film-based field-effect transistors for sensing NO at room temperature. *Small*. 8: 63–67.
- Lim S. H., A. Eun-Young, and Y. Park. 2016. Green synthesis and catalytic activity of gold nanoparticles synthesized by *Artemisia capillaris* water extract. *Nanoscale Research Letters*. 11: 474.
- Liu F., S. Zheng, A. Chaturvedi, V. Zólyomi, J. Zhou, Q. Fu, and Z. Liu. 2016. Optoelectronic properties of atomically thin ReSSe with weak interlayer coupling. *Nanoscale*, 8: 5826–5834.
- López T., A. Prado-Barragán, G.V. Nevárez-Moorillón, J.C. Contreras, R. Rodríguez, y C.N. Aguilar. 2013. Incremento de la capacidad antioxidante de extractos de pulpa de café por fermentación láctica en medio sólido CyTA - *Journal of Food*. 11: 359–365.
- López-Lorente Á. I., and M. Valcárcel. 2014. Analytical nanoscience and nanotechnology. *In: Comprehensive Analytical Chemistry, (i.e., pp: 3–35)*. ISBN: 97804444632852
- López-Rubio A., M. J. Fabra, and M. Martínez-Sanz. 2019. Food packaging based on nanomaterials. *Nanomaterials*. 9: 1224.
- Ma X.-M., M. Sun, Y. Lin, Y.-J. Liu, F. Luo, L.-H. Guo, and G.-N. Chen. 2018. Progress of visual biosensor based on gold nanoparticles. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 46: 1–10.
- Mody V. V., R. Siwale, A. Singh, and H. R. Mody. 2010. Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*. 2: 282-289.
- Murthy P. S., and M. N. Madhava. 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. 66: 45-58.
- Nava M. A. T., y M. I. Hernández S. 2017. Cafeticultura en Veracruz: entre crisis y alternativas. *In: Veracruz, un análisis para el desarrollo*. O. Galicia H. El Colegio de Veracruz, Carrillo Puerto No. 26 Zona Centro CP 91000, Xalapa, Ver. (*i.e., pp: 95-122*).
- Nghiem T. H. L., T. H. La, X. H. Vu, V. H. Chu, and T. H. Nguyen. 2010. Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 1: 1–5.
- Nunes D., A. Pimentel, L. Santos, P. Barquinha, L. Pereira, E. Fortunato, and R. Martins. 2019. Introduction. *In: Metal Oxide Nanostructures. (i.e., pp: 1-19)*. ISBN: 9780128115121

- OCDE. 2016. Adoptando un enfoque territorial para las políticas de seguridad alimentaria y de nutrición. Aspectos clave.
- Oliveira J. P., A. R. Prado, W. J. Keijok, M. R. N. Riveiro, M. J. Pontes, B. V. Nogueira, and M. C. C. Guimarães. 2017. A helpful method for controlled synthesis of monodisperse gold nanoparticles through response surface modeling. *Arabian Journal of Chemistry*. 1: 1878-5352.
- Peña-Aguilar J. M., B. Murúa-Pagola, M. Santos-Basurto, R. Reynoso-Camacho, S.J. Romero-Gómez, M.E. Vázquez-Barrios, y S.L. Amaya-Llano. 2017. Extracción y purificación de cafeína y ácido clorogénico de pulpa de beneficio húmedo de café. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2: 563-569.
- Peters R. J. B., H. Bouwmeester, S. Gottardo, V. Amenta, M. Arena, P. Brandhoff, H. J. P. Marvin, A. Mech, F. Botelho M., L. Quiros P., H. Rauscher, R. Schoonjans, A. K. Undas, M. V. Vettori, S. Weigel, and K. Aschberger. 2016. Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and food. *Trends in Food Science & Technology*. 54: 155-164.
- Pięta E., C. Petiboisb, K. Pogodaa, K. Suchya, D. Liberda, T. P. Wróbela, C. Paluszkiewicz, and W. M. Kwiateka. 2020. Assessment of cellular response to drug/nanoparticles conjugates treatment through FTIR imaging and PLS regression study. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 313: 128039.
- Polte J. 2015. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. *CrystEngComm*. 17: 6809-6830
- Pottathara Y. B., Y. Grohens, V. Kokol, N. Kalarikkal, and S. Thomas. (2019). Synthesis and processing of emerging two-dimensional nanomaterials. *In: Nanomaterials synthesis. (i.e., pp: 1–25)*. ISBN:9780128157510.
- Qian L., W. Su, Y. Wang, M. Dang, W. Zhang, and C. Wang. 2019. Synthesis and characterization of gold nanoparticles from aqueous leaf extract of *Alternanthera sessilis* and its anticancer activity on cervical cancer cells (HeLa), *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 47: 1173-1180.
- Raiford J. A., S. T. Oyakhire, and S. Bent. 2020. Applications of atomic layer deposition and chemical vapor deposition for perovskite solar cells. *Energy & Environmental Science*. 1: 1-50.
- Ramsden J. J. (2016). What is nanotechnology? *In: Nanotechnology. Second edition. (i.e., pp: 1–18)*. ISBN: 9780323393119
- Reetz M. T., W. Helbig, and S. A. Quaiser. 1995. Electrochemical preparation of nanostructured bimetallic clusters. *Chemistry of Materials*. 7: 2227-2228.
- Rosas-Vara D., J. R. Molina-Contreras, F. Villalobos-Piña, J. C. Zenteno, B. Buentello-Volante, O. F. Chacon-Camacho, R. Ayala-Ramírez, C. Frausto-Reyes, R. Hernández-Martínez, and M. A. Ríos-Corripio. Point mutation in the TGFBI gene: surface-enhanced infrared absorption spectroscopy (SEIRAS) as an analytical method. *Chemical Papers*. 74: 1079–1086.
- Rozalen M., M. Sanchez-Polo, M. Fernández-Perales, T. J. Widmann, and J. Rivera-Utrilla. 2020. Synthesis of controlled-size silver nanoparticles for the

- administration of methotrexate drug and its activity in colon and lung cancer cells. *RSC Advances*. 10:10646.
- Ríos-Corripio M. A., B. E. García-Pérez, M. E. Jaramillo-Flores, V. L. Gayou, and M. Rojas-López. 2013. UV–Visible intensity ratio (aggregates/single particles) as a measure to obtain stability of gold nanoparticles conjugated with protein A. *Journal of Nanoparticle Research*. 15: 1624.
- Ríos-Corripio M. A., L. S. Arcila-Lozano, B. E. Garcia-Perez, M. E. Jaramillo-Flores, A. D. Hernández-Pérez, A. Carlos-Martínez, M. Rosales-Perez and M. Rojas-López. 2016. Fluorescent gold nanoparticle-based bioconjugate for the detection of *Salmonella*. *Analytical Letters*, 49: 1862-1873.
- Roussos S., M. de los A. Aquifihuatl, M. del R. Trejo-Hernández, I. Gaime-Perraud, E. Favela, M. Ramakrishna, M. Raimbault, and G. Viniegra-González. 2017. Biotechnological management of coffee pulp- isolation screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 42:756-762.
- Sánchez-Sánchez M. M. 2017. Intervenir en el mundo de los átomos: Feynman y los fulerenos. Universidad Autónoma de Madrid. Fundación General. 57: 1-9.
- Saha N., and S. D. Gupta. 2016. Biogenic synthesis and structural characterization of polyshaped gold nanoparticles using leaf extract of swertia chirata along with process optimization by Response Surface Methodology (RSM). *Journal Clusters Science*. 27:1419–1437.
- Sasidharan S., S. Raj, S. Sonawane, S. Sonawane, D. Pinjari, A. B. Pandit, and P. Saudagar. 2019. Nanomaterial synthesis: chemical and biological route and applications. In: *Nanomaterials synthesis*. (i.e., pp: 27–51). ISBN: 9780128157510
- SDGs. 2019. Sustainable Development Report 2019.
- Shabestariana H., M. Homayouni-Tabrizi, M. Soltani, F. Namvar, S. Azizi, R. Mohamad, and H. Shabestarian. 2017. Green synthesis of gold nanoparticles using *Sumac* aqueous extract and their antioxidant activity. *Materials Research*. 20: 264-270.
- Shi D., Z. Guo, and N. Bedford. 2015. Characterization and Analysis of Nanomaterials. In: *Nanomaterials and Devices*, (i.e., pp: 25–47). ISBN: 9781455777549
- Shobana S, S. Veena, S. S. M. Sameer, K. Swarnalakshmi, and L. A. Vishal. 2020. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus hirsutus* seed extract and its antibacterial activity. *Current Pharmaceutical Biotechnology*.
- SIAP. 2019. Panorama agroalimentario 2019.
- Staley N. E., J. Wu, P. Eklund, Y. Liu, L. Li, and Z. Xu. 2009. Electric field effect on superconductivity in atomically thin flakes of NbSe₂. *Physical Review B*. 80; 184505.
- Tahir K., S. Nazir, B. Li, A. U. Khan., Z. U. H. Khan, P. Y. Gong, S. U. Khan, and A. Ahmad. 2015. *Nerium oleander* leaves extract mediated synthesis of gold nanoparticles and its antioxidant activity. *Materials Letters*. 156: 198-201.

- Ullah M., Md. Equb-Ali, and S. B. Abd-Hamid. 2014. Structure-controlled nanomaterial synthesis using surfactant-assisted ball milling- a review. *Current Nanoscience*. 10: 344-354.
- Varghese J. R., E. Sakho, E. M. Sakho, S. Parani, S. Thomas, O. S. Oluwafemi, and J. Wu. 2019. Introduction to nanomaterials: synthesis and applications. *In: Nanomaterials for Solar Cell Applications, (i.e., pp: 75–95)*. ISBN: 9780128133378
- Vesi H., S. Azizi, and P. Mohammadi. 2018. Green synthesis of the silver nanoparticles mediated by *Thymbra spicata* extract and its application as a heterogeneous and recyclable nanocatalyst for catalytic reduction of a variety of dyes in water. *Journal of Cleaner Production*. 170: 1536-1543.
- Velmurugan C. and N. Radhakrishnan. 2018. Publication analysis of nanotechnology in global perspective: a Scientometric Approach. *Research Journal of Library and Information Science*. 2: 36-49.
- Vladár A. E., and V.-D. Hodoroaba. 2020. Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy. *In: Characterization of Nanoparticles, (i.e., pp: 7–27)*. ISBN: 9780128141823
- Vladár A. E., J. S. Villarrubia, J. Chawla, B. Ming, J. R. Kline, S. List, and M. T. Postek. 2014. 10nm three-dimensional CD-SEM metrology. *Metrology, Inspection, and Process Control for Microlithography XXVIII*. 9050: 1-11
- Xi-Feng Z, L. Zhi-Guo, S. Wei, and G. Sangiliyandi. 2016. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 17: 1534.
- Yi M., and Z. Shen. 2015. A review on mechanical exfoliation for the scalable production of graphene. *Journal of Materials Chemistry A*, 3: 11700–11715.
- Zhang T., M. Dang, W. Zhang, and X. Lin. 2020. Gold nanoparticles synthesized from *Euphorbia fischeriana* root by green route method alleviates the isoprenaline hydrochloride induced myocardial infarction in rats. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 202: 111705.
- Zheng J., H. Zhang, S. Dong, Y. Liu, C. Tai Nai, and H. Suk-Shin. 2014. High yield exfoliation of two-dimensional chalcogenides using sodium naphthalenide, *Nature Communications*. 5: 1-7.

CHAPTER I

GREEN SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES USING AQUEOUS COFFEE PULP EXTRACT (*COFFEA ARABICA*) ANALYZED BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

ENVIADO A LA REVISTA:
CHEMICAL PAPERS



CHAPTER I

Green synthesis of gold nanoparticles using aqueous coffee pulp extract (*Coffea arabica*) analyzed by response surface methodology

Galileo Bonilla Nepomuceno¹, María Antonieta Ríos Corripio², Fernando C. Gómez Merino¹ Miguel Ángel Méndez Rojas³, Leslie Susana Arcila Lozano⁴, Aleida Selene Hernández Cázares^{1*}, Marlon Rojas López^{5*}

¹ *Colegio de Postgraduados. Campus Córdoba. Congregación Manuel León, Amatlan de los Reyes, Córdoba, Ver. C.P. 94500, México.*

² *CONACYT - Colegio de Postgraduados. Campus Córdoba. Congregación Manuel León, Amatlán de los Reyes, Córdoba, Ver. C.P. 94500, México*

³ *Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de las Américas Puebla, Ex-Hda. Sta. Catarina Mártir s/n, San Andrés Cholula, Pue., C.P. 72420, México.*

⁴ *CONACYT - Instituto Politécnico Nacional, CIBA-Tlaxcala, Carretera estatal Tepetitla-Tlaxcala Km. 1.5, Tepetitla, Tlax., C.P. 90700, México*

⁵ *Instituto Politécnico Nacional, CIBA-Tlaxcala, Carretera estatal Tepetitla-Tlaxcala Km. 1.5, Tepetitla, Tlax., C.P. 90700, México*

* Corresponding authors: aleyse@colpos.mx, marlonrl@yahoo.com.mx

Abstract

The green synthesis of gold nanoparticles, using coffee (*Coffea arabica*) pulp extract as reducing agent was achieved and analyzed by response surface methodology (RSM), given the diverse applicability of these nanoparticles containing a wide range of phenolic compounds from the coffee pulp extract. The combined effects of three factors (precursor concentration, reducing agent concentration, and reaction time) on the maximum intensity (*MA*), particle size (*d*) and particles density (*N*) were analyzed. An opposite effect between the precursor and reducing agent during the synthesis was observed, because

while the precursor tends to increase the particle size diminishing the particle density, the reducing agent tends to diminish the particle size increasing the particle density. These effects were observed simultaneously through the response surfaces of particle size and of the particles density. The methodology used allowed the synthesis of nanoparticles with averages particle size between 5-22 nm, and density of particles around 2.9×10^{11} – 3.7×10^{13} (part/mL) depending on the experimental conditions of preparation. The adjusted R^2 value determined for all the cases was of 0.98 (maximum absorbance), 0.99 (particle size) and 0.97 (particles density), clearly indicating that the model can be used to predict or design the response variables in the design space. Different phenolic compounds, present in the coffee pulp extract, coated the surface of these nanoparticles. The chemical evidence of the presence of an organic coating on the gold nanoparticles was proved by Fourier transform infrared measurements. The followed methodology allowed the preparation of gold nanoparticles in a controlled and reproducible form, contributing to the design of new alternatives for the synthesis of specific nanostructures with potentially useful therapeutic properties related to the bioactive compounds present in the coffee pulp extract.

Keywords: green synthesis; gold nanoparticles; coffee pulp extract; response surface methodology, Box-Behnken design.

1.1 Introduction

Green synthesis of metallic nanoparticles, such as gold (Au), silver (Ag), and copper (Cu), using plant extracts as a reducing agent identifies a practical and cheap way to obtain nanomaterials that may possess some of the advantages and properties conferred by organic molecules contained in the chemical extracts of plants, such as antioxidant (Hamelian et al. 2018), anti-inflammatory (Liu et al. 2019), antibacterial (Katas et al. 2018) and antifungal compounds, among several other molecules with biological activity. There are several reports in the literature with examples of nanoparticles prepared using a green synthetic approach, which present cytotoxic effects on cancer cells or catalytic effects for the degradation of toxic pollutant dyes (Bogireddy et al. 2018; Aljabali et al. 2018; Ismail et al. 2018; Rajeshkumar et al. 2018; Mohammed-Siddiq et al. 2019). Additionally, several researchers have reported the development of new green synthetic approaches for the preparation of nanoparticles using plant extracts from coffee (*Coffea arabica*) (Keijok et al. 2019), tea (green tea, black tea, and oolong tea), *Stevia rebaudiana*

leaf, and Croton Caudatus Geisel leaf (Huang et al., 2014; Sadeghi et al. 2015; Vijaya-Kumar et al. 2018). In particular, coffee pulp extract (*Coffea arabica*) contains a wide range of phenolic compounds and their derivatives, such as chlorogenic, caffeic and ferulic acids (Duangjai et al. 2016; Keijok et al. 2019), caffeine, carbohydrates, lipids, and volatile and different heterocyclic compounds (Keijok et al. 2019).

Coffee is one of the most commercialized agricultural products in the world, with an estimated revenue of nearly \$450,000 million UDS for 2020 (Janissen and Huynh 2018; Duangjai et al. 2016). From the total coffee production (~10.2 million tons in 2019) (ICO 2019) more than 40% corresponds to coffee pulp, this agro-industrial waste is considered a strong contaminant of soil and water because its pH is lower than 5.0 (Fierro-Cabrales et al. 2018) and bad waste management is common, affecting the quality of soil and water reservoirs. As a way to avoid this, several groups have focused on finding different uses for coffee pulp, such as composting, drinks, and animal feed products (Janissen and Huynh 2018; Braham and Bressani 1978). However, in the case of animal feeding, only a portion of it can be replaced and previous treatment of the coffee pulp is necessary to avoid bad nutritional absorption (Janissen and Huynh 2018; Braham and Bressani 1978). Therefore, the synthesis of metallic nanoparticles using coffee pulp extract as a green reducing agent could contribute to reducing this agro-industrial waste and also to the generation of new alternatives for the preparation of nanomaterials with potentially useful therapeutic properties related to the presence of several bioactive compounds in aqueous coffee pulp extract.

In this work, we have synthesized gold nanoparticles by green synthesis (AuNP) using aqueous coffee pulp extract as a reducing agent and the performed experiments were analyzed employing a Box-Behnken design. The obtained response surfaces related to maximum intensity of the UV-visible absorption, particle size, and particle density describe the dependence on the considered factors of design: precursor concentration, reducing agent concentration, and reaction time.

1.2 Materials and methods

1.2.1 Materials

The coffee pulp was obtained from producers of the Huatusco, Veracruz, México, and tetrachloroauric acid (HAuCl_4) was purchased from Sigma Aldrich® (Toluca, México).

1.2.2 Aqueous coffee pulp extract

Coffee pulp was cleaned, all residual matter was removed, and it was dried in a food dehydrator (Excalibur®, model 2900ECB, USA) at 40°C for 7 h. The dried coffee pulp was then powdered in a blender machine (MAXXIMUM®, model MaxxMix-MMH, USA). The obtained powder was stored in a hermetic container and kept at room temperature until further use.

An aqueous extract stock was prepared at a concentration of 8 mg/mL (w/v) by mixing 8 g of powdered coffee pulp with 1 L of distilled water; the solution was placed on a hot plate at 85°C for 25 min (Bogireddy et al. 2018) and cooled at room temperature. The solution was sonicated for 30 min in an ultrasonic bath (BRANSONIC®, model CPX3800H) and the sonicated solution was filtered through filter paper (number 1) and stored at cooling temperature in the dark.

1.2.3 Green synthesis of gold nanoparticles (AuNPs)

Coffee pulp extract solution (200 mL) at different concentrations (0.5, 1.25, and 2 mg/mL) were prepared, according to the citrate reduction method (Hermanson 2008) with some modifications. The pH values of different concentrations above were 4.8, 4.6 and 4.5 respectively. Each solution was warmed on a hot plate with magnetic stirring until it reached a temperature of 85°C; then, 1 mL of chloroauric acid (HAuCl₄) at a concentration of 3, 4, and 5% was added to the extract solution. Finally, the mix was kept at 85°C for 20, 40, or 60 min, respectively.

1.2.4 UV-visible spectrophotometry

The absorbance spectra from 190 to 900 nm, with a wavelength step of 2 nm, were measured in an UV-visible spectrophotometer (Thermo Scientific Evolution 600), using distilled water as a baseline. Particle size and density for each AuNPs synthesized were calculated from their UV-visible spectra by using the Haiss model [19].

1.2.5 Size and particle density of AuNPs

A simple method proposed by Haiss et al. (2007) to determine the size and concentration of AuNPs through the information of the UV-Visible spectra were applied.

The particle size was calculated according to the following equation (1):

$$d = \exp\left(B_1 \frac{A_{\text{spr}}}{A_{450}} - B_2\right) \quad (1)$$

where A_{spr} is the absorbance of the surface plasmon resonance, A_{450} is the absorbance at 450 nm, B_1 is the inverse of the slope of the linear fit between A_{spr}/A_{450} and $\ln(d)$, and B_2 is the intercept. Using experimental data reported by Haiss et al. (2007), $B_1=3.0$ and $B_2=2.2$. The calculations of particle diameter using equation (1) allowed size determination of AuNPs.

In addition, particle density (concentration) was estimated using the expression:

$$N = \frac{A_{450} \times 10^{14}}{d^2 \left(-0.295 - 1.36 \exp\left(-\left(\frac{d-96.8}{78.2} \right)^2 \right) \right)} \quad (2)$$

Using both equations and the information from the UV-visible spectra of the fifteen experiments from the Box-Behnken design described in Table 2, we have calculated d and N of the AuNPs obtained from green synthesis with coffee pulp extract. The obtained experimental results are summarized in Table 3.

1.2.6 Scanning electron microscopy

The morphology, size and distribution of AuNPs for some specific selected samples were analyzed using a high resolution, field emission scanning electron microscope (HR- FESEM, MAIA-3, Tescan). A drop of the corresponding AuNPs aqueous suspension in their colloidal state was placed on a silicon crystal and then they were allowed to dry before their electron microscopy analysis.

1.2.7 FTIR spectroscopy

A Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) Bruker model Vertex 70, in the attenuated total reflection (ATR) sampling mode was employed. All the measurements were made in the spectral range from 4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1} , using 120 scans for each sample, with a resolution of 4 cm^{-1} .

1.2.8 Experimental design and statistical analysis

A Box-Behnken design was employed for the statistical analysis of the UV-visible absorbance spectra of all the synthesis by using the Design Expert software version 10. Three independent variables were established: precursor concentration (x_1), reducing agent concentration (x_2) and reaction time (x_3), as shown in Table 1. Thus, 15 experiments or runs generated according to the Box-Behnken design are depicted in Table 2 (coded and real variables).

Table 1. Coded levels for independent variables

Independent variables	Levels		
	-1	0	1
x_1 : Precursor concentration (HAuCl ₄), %	3	4	5
x_2 : Reducing agent concentration (coffee pulp extract), mg/mL	0.5	1.25	2
x_3 : Reaction time, min	20	40	60

Table 2. Independent variables used in the experimental design arrangement.

Measurement	Coded variables			Actual variables		
	x_1	x_2	x_3	Precursor (%) x_1	Reducing agent (mg/mL) x_2	Reaction time (min) x_3
1	-1	-1	0	3	0.5	40
2	1	-1	0	5	0.5	40
3	-1	1	0	3	2	40
4	1	1	0	5	2	40
5	-1	0	-1	3	1.25	20
6	1	0	-1	5	1.25	20
7	-1	0	1	3	1.25	60
8	1	0	1	5	1.25	60
9	0	-1	-1	4	0.5	20
10	0	1	-1	4	2	20
11	0	-1	1	4	0.5	60
12	0	1	1	4	2	60
13	0	0	0	4	1.25	40
14	0	0	0	4	1.25	40
15	0	0	0	4	1.25	40

The proposed response variables were: the maximum absorbance (MA), particle size (d), and particle density (N). The effect of each independent variable on each response variable was determined by using the experimental data on the maximum and minimum

plasmonic absorption of the AuNPs (obtained by UV-visible) fitted through the response surface methodology (RSM) as:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_1^2 + b_5x_2^2 + b_6x_3^2 + b_7x_1x_2 + b_8x_1x_3 + b_9x_2x_3 \dots\dots\dots (1)$$

Where Y is the response variable, x_1 is the precursor concentration, x_2 is the reducing agent concentration and x_3 is the reaction time, b_0 are the intercepts, b_1 , b_2 and b_3 are the coefficients of the linear terms, b_4 , b_5 and b_6 are the coefficients of the quadratic terms, and b_7 , b_8 , and b_9 are the coefficients of the interaction terms. Analysis of variance (ANOVA) was used to determinate the significance of the experimental data.

1.3 Results and discussion

1.3.1 UV-visible spectroscopy

Figure 1 (a, b, c) shows the UV-visible spectra of the AuNPs obtained by chemical reduction of HAuCl₄ (precursor) using coffee pulp extract (reducing agent) with different preparation conditions. For all the spectra, an intense absorption band centered near 520 nm, arose from the AuNPs surface plasmon resonance (SPR) (Cheng et al. 2014). Spectra of the AuNPs obtained with a constant concentration of 0.5 mg/mL of the reducing agent (aqueous coffee pulp extract) and precursor concentrations (HAuCl₄) of 3, 4, and 5%, are shown in Figure 1(a).

The intensity of the SPR band, which varied proportionally with the concentration of AuNPs (Haiss et al. 2007), increased with the precursor concentration, in agreement with Chen et al. (2018). The UV-Vis spectra of the synthesized AuNPs, with the precursor concentration at 5% and reducing agent concentrations 0.5, 1.25, and 2 mg/mL are shown in Figure 1(b). In this case, the intensity of the SPR band also increased proportionally with the reducing agent concentration, as previously observed by Saha and Gupta (2016), suggesting a better efficiency during the synthesis process, due to the relationship between Au⁰ atom saturation and reducing agent concentration during the nucleation stage (Oliveira et al. 2017). Finally, the UV-Vis spectra for the AuNPs prepared when the precursor concentration was fixed at 5% and synthesis times of 20, 40, and 60 min, are shown in Figure 1(c). In contrast to the previously obtained results, the intensity of

the SPR band slightly decreased with the time of synthesis, which was also previously reported by Krishnaswamy et al. (2014).

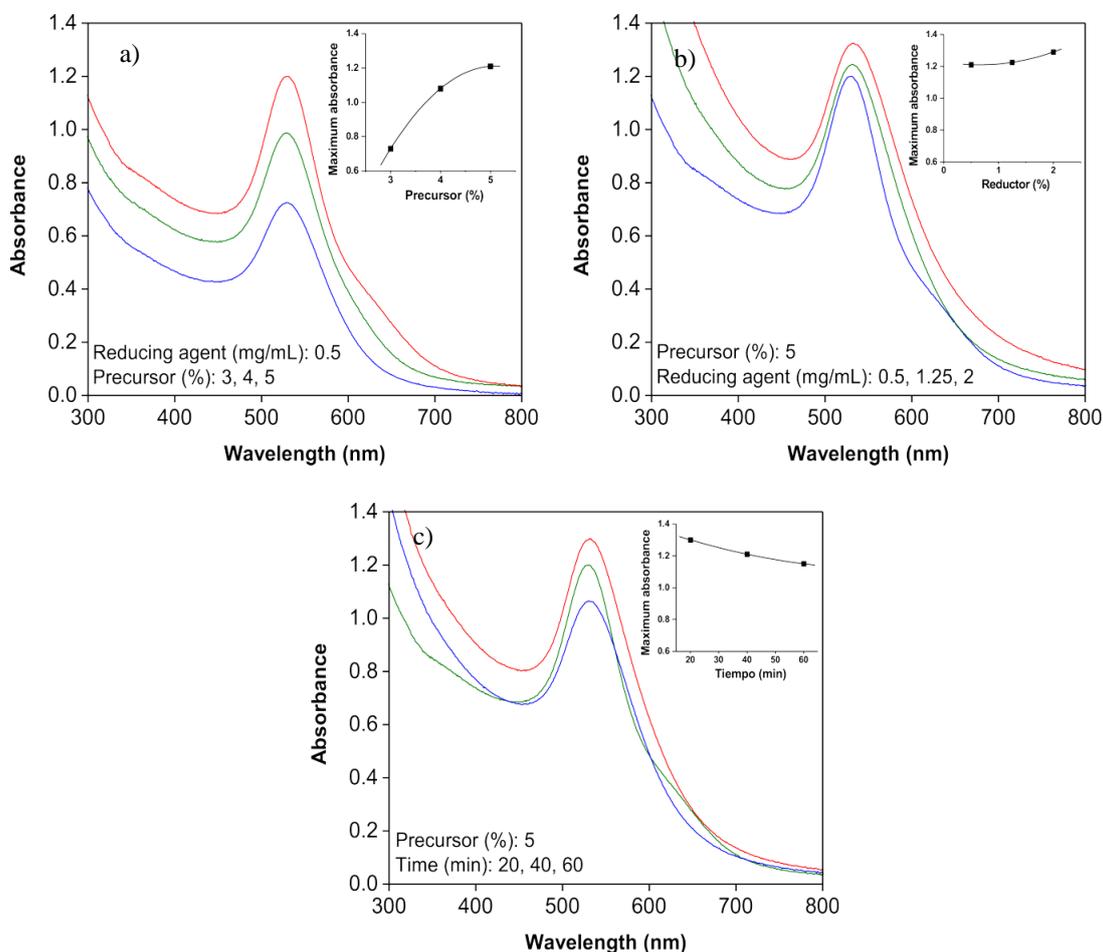


Figure 1. UV-visible spectra of AuNPs synthesized by reduction with coffee pulp extract at different conditions: (a) 0.5 mg/mL of reducing agent, precursor concentrations: 3, 4 and 5%, (b) Precursor concentration of 5%, reducing agent concentrations: 0.5, 1.25, and 2 mg/mL, (c) Precursor agent concentration of 5%, time of synthesis: 20, 40 and 60 min.

1.3.2 Scanning electron microscopy

The morphological features of the AuNPs obtained by the green synthetic approach (using coffee pulp extract as reducing agent) at different conditions of preparation are shown in the SEM images in Figure 2 (a, b, c, d).

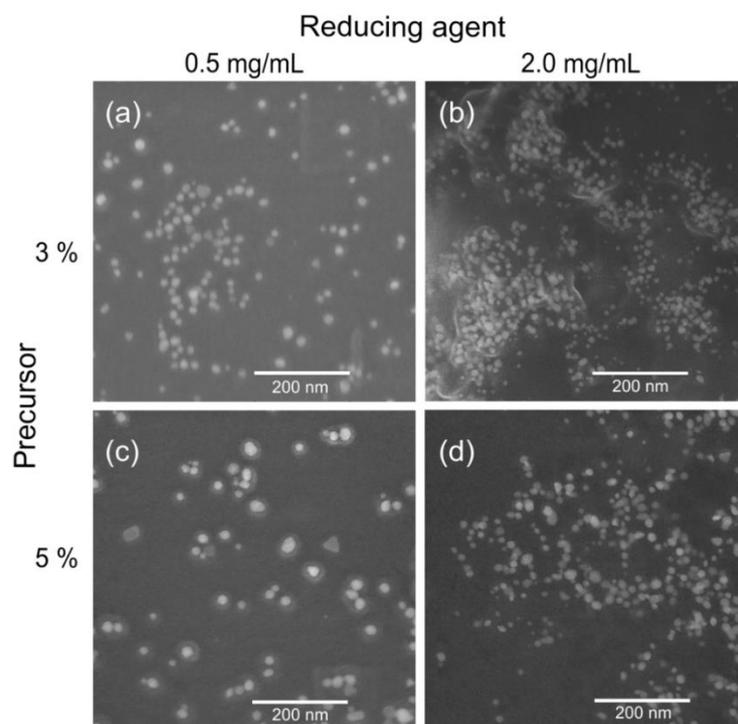


Figure 2. SEM images of AuNPs prepared at different conditions: a) Precursor 3%, and reducing agent 0.5 mg/mL; b) Precursor 3%, and reducing agent 2 mg/mL; c) Precursor 5%, and reducing agent 0.5 mg/mL; d) precursor 5%, reducing agent 2 mg/mL. The reaction time for all the samples was of 40 min.

Four representative samples of AuNPs prepared at the lower and higher concentration of the precursor (3 and 5%) and concentrations of 0.5 and 2.0 mg/mL of the reducing agent respectively, were analyzed by SEM. All these samples were prepared during 40 minutes. These experimental parameters of synthesis represent the limits of the Box-Behnken design shown in Table 1, for a reaction time of 40 min. In the Figure 3, the distribution histograms corresponding to the SEM images show the average particle size (d) estimated by using the Analyze Particles routine of ImageJ software.

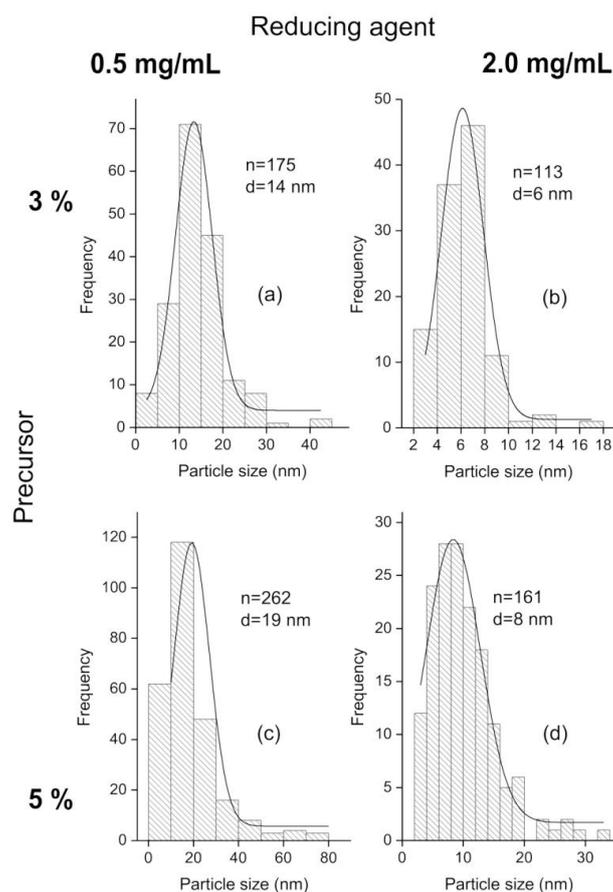


Figure 3. Size distribution histograms obtained from the SEM images of AuNPs prepared at different conditions: a) Precursor 3%, and reducing agent 0.5 mg/mL; b) Precursor 3%, and reducing agent 2 mg/mL; c) Precursor 5%, and reducing agent 0.5 mg/mL; d) precursor 5%, reducing agent 2 mg/mL. The reaction time for all the samples was of 40 min.

1.3.3 Experimental design and statistical analysis

A Box-Behnken response surface design was used to analyze the dependence of responses, MA , d , and particle density (N) as a function of the three independent variables considered in the experimental design: precursor concentration, reducing agent concentration, and reaction time. These experimental (determined by UV-Visible) and predicted values are shown in Table 3. Values of maximum absorbance ranged from 0.73 to 1.30 units, whereas the size of the particle ranged from 5.36 to 22.1 nm. Finally, the density of particles ranged from 5.62×10^{11} to 4.05×10^{13} particles/mL.

Table 3. Experimental values used as response, and predicted values obtained after using the Box-Behnken design as a function of the independent variables.

Independent variables				Responses					
Run	Precursor (%)	Reducing agent (mg/mL)	Reaction time (min)	Maximum absorbance		Particle size (nm)		Particles density	
				Experimental	Predicted	Experimental	Predicted	Experimental	Predicted
1	3	0.5	40	0.73	0.74	17.85	17.17	6.91E+11	5.45E+11
2	5	0.5	40	1.21	1.21	22.10	22.13	5.62E+11	3.86E+12
3	3	2	40	0.78	0.78	5.36	5.33	4.05E+13	3.73E+13
4	5	2	40	1.29	1.28	8.98	9.67	1.25E+13	1.23E+13
5	3	1.25	20	0.77	0.76	8.01	8.46	1.10E+13	1.23E+13
6	5	1.25	20	1.30	1.30	14.03	13.77	2.75E+12	5.10E+11
7	3	1.25	60	0.75	0.75	8.16	8.42	9.65E+12	1.19E+13
8	5	1.25	60	1.15	1.17	12.86	12.41	3.27E+12	2.08E+12
9	4	0.5	20	1.08	1.08	19.50	19.74	7.55E+11	2.91E+11
10	4	2	20	1.08	1.09	7.47	7.05	1.87E+13	2.07E+13
11	4	0.5	60	0.99	0.97	18.08	18.50	8.98E+11	1.20E+12
12	4	2	60	1.07	1.06	7.12	6.89	2.18E+13	2.29E+13
13	4	1.25	40	1.01	1.04	11.09	11.17	4.67E+12	4.80E+12
14	4	1.25	40	1.03	1.04	11.11	11.17	4.80E+12	4.80E+12
15	4	1.25	40	1.09	1.04	11.30	11.17	4.93E+12	4.80E+12

Table 4. Analysis of variance for the three responses.

Response	Source	Sum of squares	<i>df</i>	Mean square	<i>F</i> -Value	<i>P</i> -Value	
Maximum Absorbance	Model	0.4927	9	0.0547	52.11	0.0002	Significant
	Residual	0.0053	5	0.0011	-	-	-
	Lack of Fit	0.0014	3	0.0005	0.245	0.8607	No significant
	Pure Error	0.0038	2	0.0019	-	-	-
	Total	0.4979	14	-	-	-	-
Particle size	Model	362.19	9	40.24	101.68	<0.0001	Significant
	Residual	1.98	5	0.3958	-	-	-
	Lack of Fit	1.95	3	0.6514	52.52	0.0187	Significant
	Pure Error	0.0248	2	0.0124	-	-	-
	Total	364.16	14	-	-	-	-
Particles density	Model	1.62E+27	9	1.80E+26	19.66	0.0022	Significant
	Residual	4.58E+25	5	9.16E+24	-	-	-
	Lack of Fit	4.58E+25	3	1.53E+25	859.95	0.0012	Significant
	Pure Error	3.55E+22	2	1.77E+22	-	-	-
	Total	1.67E+27	14	-	-	-	-

ANOVA was performed for the three models (Table 4), F-test for *MA* had a probability of $p < 0.0002$, which means there was only a 0.02% chance that an F-value of this magnitude could occur due to random noise, while an F-value of 0.245 for lack of fit in the model indicated the fit of the model was no significant relative to the pure error. For *d* and *N*, the F-test had a probability of $p < 0.0001$ and $p < 0.0022$, respectively, and both models were significant. In contrast, the maximum absorbance, particle size, and particles density had a F-value (lack of fit) of 52.52 and 859.95, respectively. Consequently, the fit of both models are significant relative to the pure error; there was an F-value of 1.87% for particle size and 0.12% for particle density and the lack of fit determined could be due to noise. The coefficients of the mathematical expressions of the response surfaces, which were obtained from the regression, are shown in Table 5; where *MA*, *d*, and *N* are the responses, and x_1 , x_2 , and x_3 are the independent variables, precursor concentration, reducing agent concentration, and reaction time, respectively.

For *MA*, x_1 (precursor concentration), x_3 (reaction time), and x_1^2 were significant ($p < 0.05$); in contrast, factors x_2 (reducing agent concentration), interactions x_1x_2 , x_1x_3 ,

x_2x_3 , and quadratic terms of x_2 and x_3 were not significant ($p>0.05$). For d , factors x_1 , x_2 , and x_2^2 were significant ($p<0.05$); for the remaining factors, interaction and quadratic terms (x_3 , x_1x_2 , x_1x_3 , x_2x_3 , x_1^2 , and x_3^2) were insignificant ($p>0.05$). For N , factors x_1 , x_2 , interaction x_1x_2 , and quadratic term x_2 were significant ($p<0.05$); however, factor x_3 , interactions x_1x_3 , x_2x_3 , and quadratic terms x_1 and x_2 were not significant ($p>0.05$). According to the coefficient values, the precursor concentration was the factor with largest effect on MA and d responses, in agreement with Chen et al. (2018). However, the reducing agent had more of an effect on N , followed by the precursor concentration. In addition, reaction time was the factor with the least effect on all responses. The estimation models for MA , d , and N are described by equations (4), (5), and (6) respectively:

$$MA = -0.7651 + 0.6757x_1 - 0.0928x_2 + 0.0023x_3 + 0.0110x_1x_2 - 0.0015x_1x_3 + 0.0012x_2x_3 - 0.0486x_1^2 + 0.0129x_2^2 + 4.4 \times 10^{-6}x_3^2 \dots \dots \dots (4)$$

$$d = 15.5711 + 2.7309x_1 - 18.3877x_2 + 0.1194x_3 - 0.2101x_1x_2 - 0.0164x_1x_3 + 0.0178x_2x_3 + 0.0646x_1^2 + 4.1660x_2^2 - 0.0011x_3^2 \dots \dots \dots (5)$$

$$N = 2.0426 \cdot 10^{13} - 1.3993 \cdot 10^{13}x_1 + 2.2809 \cdot 10^{13}x_2 - 4.0134 \cdot 10^{10}x_3 - 9.4063 \cdot 10^{12}x_1x_2 + 2.4436 \cdot 10^{10}x_1x_3 + 5.0266 \cdot 10^{10}x_2x_3 + 2.4218 \cdot 10^{12}x_1^2 + 1.1143 \cdot 10^{13}x_2^2 - 1.3198 \cdot 10^9x_3^2 \dots \dots \dots (6)$$

A graphical representation of the quality of the models is shown in Figure 4, where the correlation between predicted versus actual measurements of the responses show that the quadratic model fits were adequate, having correlation coefficients R^2 for maximum absorbance, particle size, and particle density of 0.98, 0.99, and 0.97, respectively. The R^2 value for all cases indicate the models can be used to predict the response variables in the design space: maximum absorbance, particle size, and particle density of AuNPs obtained by green synthesis with coffee pulp extract.

Table 5. Regression coefficients and probability values for response variables in the experimental design

Term	Maximum Absorbance		Particle Size		Particles Density	
	Coefficient	Probability	Coefficient	Probability	Coefficient	Probability
Constant	-0.7651	-	15.5711	-	2.0426E+13	-
x ₁ : Precursor	0.6757	< 0.0001	2.7309	0.0001	1.3993E+13	0.0039
x ₂ : Reducer	-0.0928	0.0740	-18.3877	0.0001	2.2809E+13	0.0001
x ₃ :Time	0.0023	0.0295	0.1194	0.1771	4.0134E+10	0.7923
x ₁ ²	-0.0486	0.0345	0.0646	0.8513	2.4218E+12	0.1846
x ₂ ²	0.0129	0.6844	4.1660	0.0008	1.1143E+13	0.0105
x ₃ ²	4.4E-06	0.9205	-0.0011	0.2138	1.3198E+09	0.7510
x ₁ x ₂	0.0110	0.6323	-0.2101	0.6375	9.4063E+12	0.0055
x ₁ x ₃	-0.0015	0.1233	-0.0164	0.3423	2.4436E+10	0.7597
x ₂ x ₃	0.0012	0.2910	0.0178	0.4342	5.0266E+10	0.6393

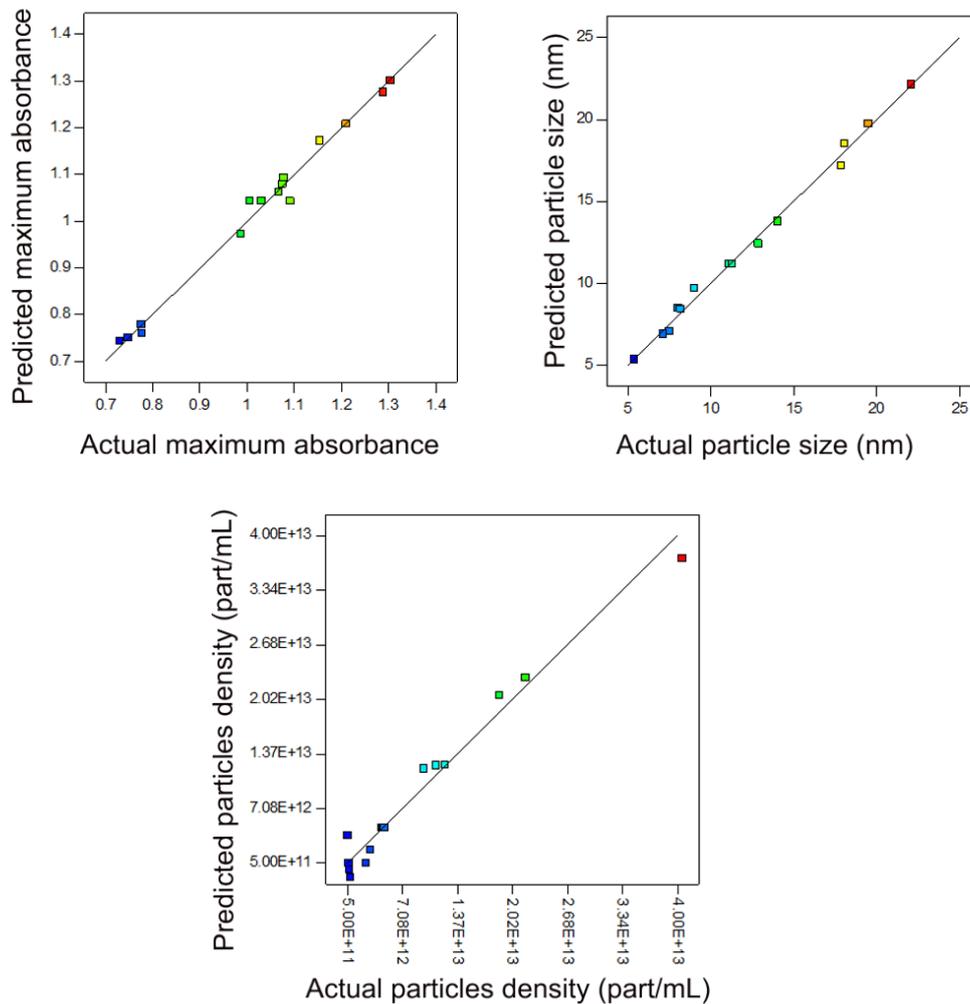


Figure 4. Correlation between predicted versus experimental of each model: (a) maximum absorbance $R^2=0.98$; (b) particle size, $R^2=0.99$; and (c) particles density, $R^2=0.97$. Predicted data were obtained from the response surface calculations by the experimental design.

1.3.4 Analysis of response surfaces

After obtaining the fit model for the maximum absorbance, particle size and particles density, that are represented in equations (4), (5) and (6), three-dimensional response surface plots and contour plots as a function of the independent variables or factors (precursor concentration, reducing agent concentration, reaction time) were obtained, as shown in Figures 5, 6 and 7.

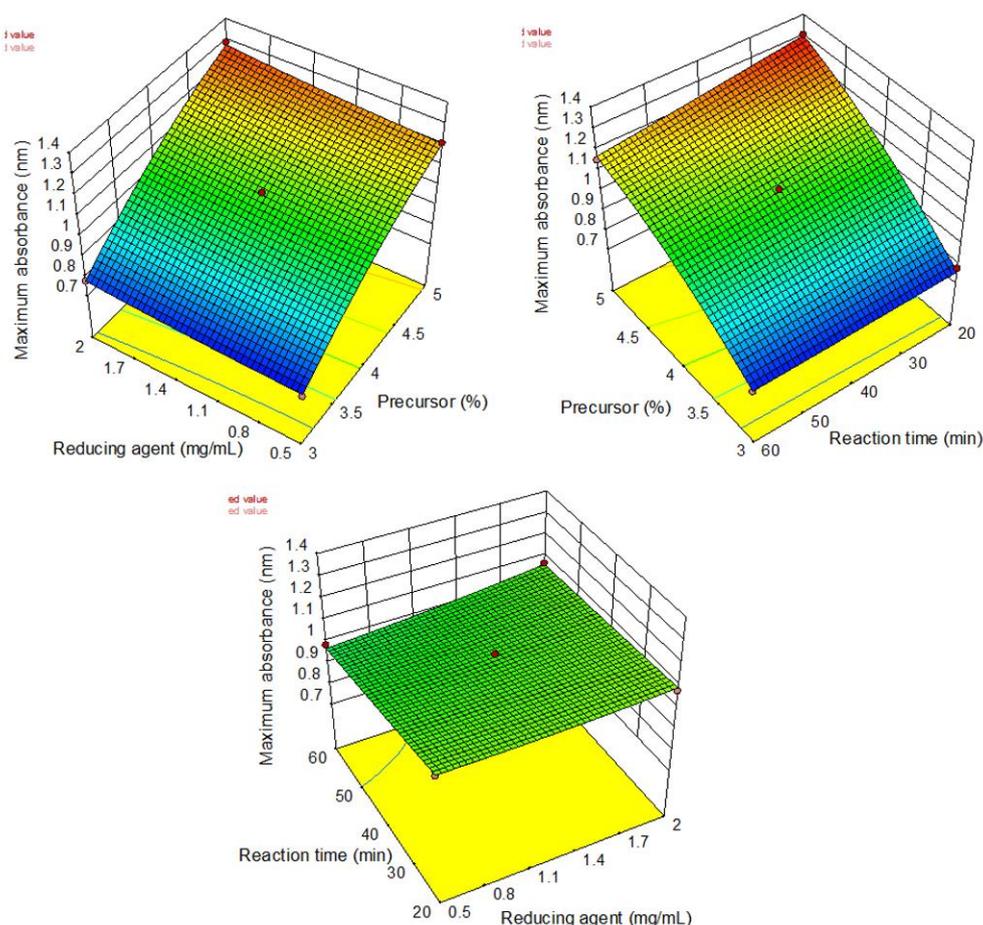


Figure 5. Response surfaces of maximum absorbance (*MA*), that show the effect of the independent variables (factors) used in the experimental design, during the green synthesis of AuNPs.

For *MA* (Figure 5), the response surface indicates how the precursor concentration is the factor with the most effect. *MA* increases with the precursor concentration because a high content of precursor (HAuCl_4) implies a high number of gold atoms that contribute to the formation of nanoparticles absorbing light at the wavelength of the maximum absorbance (~ 520 nm) (Cheng et al. 2014). In a similar way, *MA* also increases with the reducing agent concentration. Reaction time was the factor with the least effect on *MA*, which is corroborated also by the coefficients of regression on the response surface (Table 5), thus

MA diminishes with the time of the reaction. The optimum value for maximum absorbance (1.3) in the design was obtained with the highest level of precursor concentration (5%), the highest level of reducing agent concentration (2 mg/mL), and the lowest level of reaction time (20 min), as observed in Figure 5 (a, b). In addition, these response surfaces obtained from the regression of experimental data using the Box-Behnken design shown in Table 2, agree with the results of *MA*, obtained by UV-visible spectrophotometry shown in Fig. 1.

For *d* (Figure 6 a, b, c), the response surfaces show how both factors, precursor concentration and reducing agent concentration, contribute in an opposing way. While the precursor concentration increased *d*, the reducing agent concentration decreased it. Similar behavior has been reported by Agunloye et al. (2018) for the dependence of particle size on both precursor (HAuCl_4) and sodium citrate concentration. In our case, the reducing agent contains bioactive compounds from the coffee pulp that also serve as surfactants, coating the nanoparticle surface. Additionally, there was no significant dependence of particle size on the reaction time in the analyzed interval 20–40 min, obtaining an average particle size from 5 to 22 nm. Thus, when the precursor concentration is at its maximum level (5%) and reducing agent is at its lowest level (0.5 mg/mL), and the lowest reaction time (20 min), green synthesis generates AuNPs of 22 nm (Figure 6a, Table 3). The interactions between precursor concentration-reducing agent concentration and reducing agent concentration-reaction time are important, therefore both surfaces twist (Fig 6 a, c). Conversely, the precursor concentration-reaction time interaction showed only a small effect on particle size and the surface is almost flat (Fig. 6b).

For particles density (*N*) Figure 7 (a, b, c), the response surfaces show the major effect was given by the reducing agent factor, followed by the precursor concentration. This is also shown by the regression coefficient values in Table 5. The higher particles density was found at maximum level of reducing agent and at lowest level of the precursor concentration (Figure 7a). This result suggests that the particles density (*N*) mainly depends on the reducing agent concentration, constituted by several compounds present on the coffee pulp extract.

Precursor concentration and reducing agent concentration were the factors that had the most important effect on the particle size (d) and on the particles density (N). These factors have opposite effects, because while an increment of the precursor concentration tends to increase the particle size, diminishing the particle density, an increment on the reducing agent tends to diminish the particle size increasing the particle density. This effect was observed simultaneously through the response surfaces for particle size and particle density as shown in Figures 6(a) and 7(a).

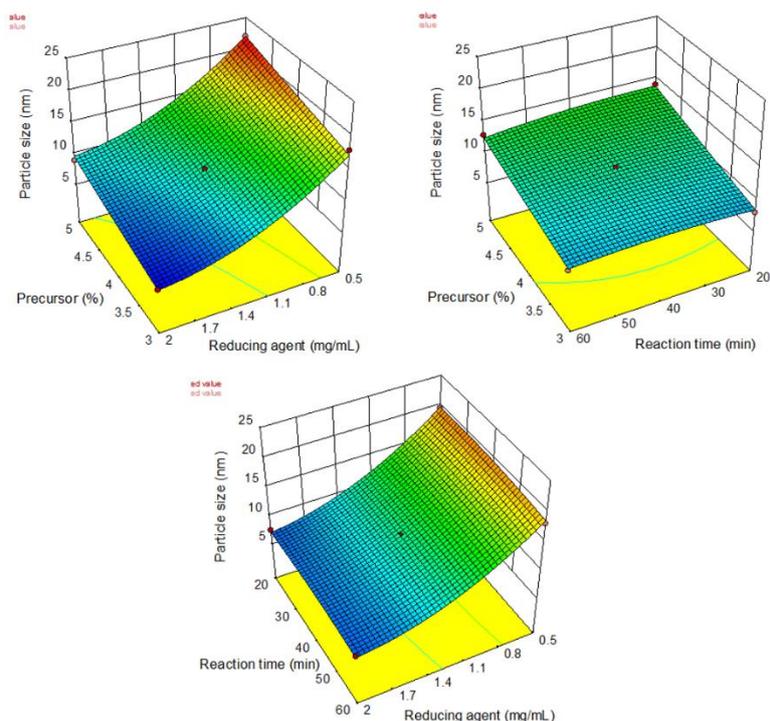


Figure 6. Response surfaces of particle size (d), showing the effect of the independent variables (factors) used in the experimental design, during the green synthesis of AuNPs.

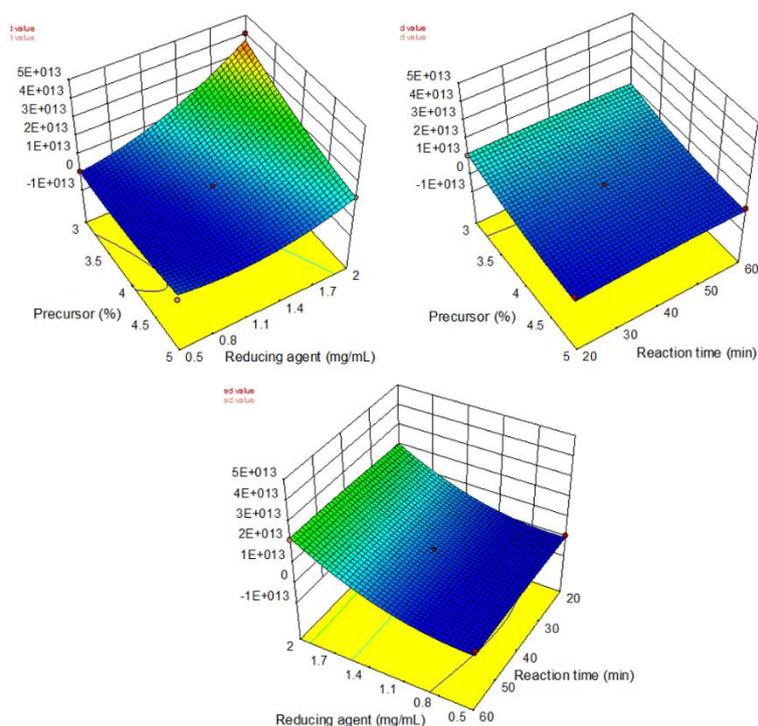


Figure 7. Response surfaces of particles density (N), that show the effect of the independent variables (factors) used in the experimental design, during the green synthesis of AuNPs.

1.3.5 Fourier transform infrared spectroscopy

Several compounds with antioxidant properties, such as, caffeine, and phenolic (chlorogenic, caffeic, and ferulic) acids have been previously identified in coffee pulp extracts (Arellano-González et al. 2011; Duangjai et al. 2016).

Characteristic vibrational bands of this type of compounds were detected in the FTIR spectrum of the coffee pulp extract used as a reducing agent in this work, as shown in Figure 8 (a). The broad band in the region $3300\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ were related with the stretching vibrations of the O-H bond. Also, the bands located at 2925 cm^{-1} and 2857 cm^{-1} were associated with the stretching vibrations of the C-H bonds (Cobaleda et al. 2017) while the bands in the region of $1600\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ were attributed to the carbonyl (C=O) and aromatics groups, basic structural constituents of phenolic compounds (Silva et al. 2014). Finally, the band at 1068 cm^{-1} was related with the (C=O) stretching vibration, typical of carbohydrates present in the coffee pulp extract (Silva et al. 2014).

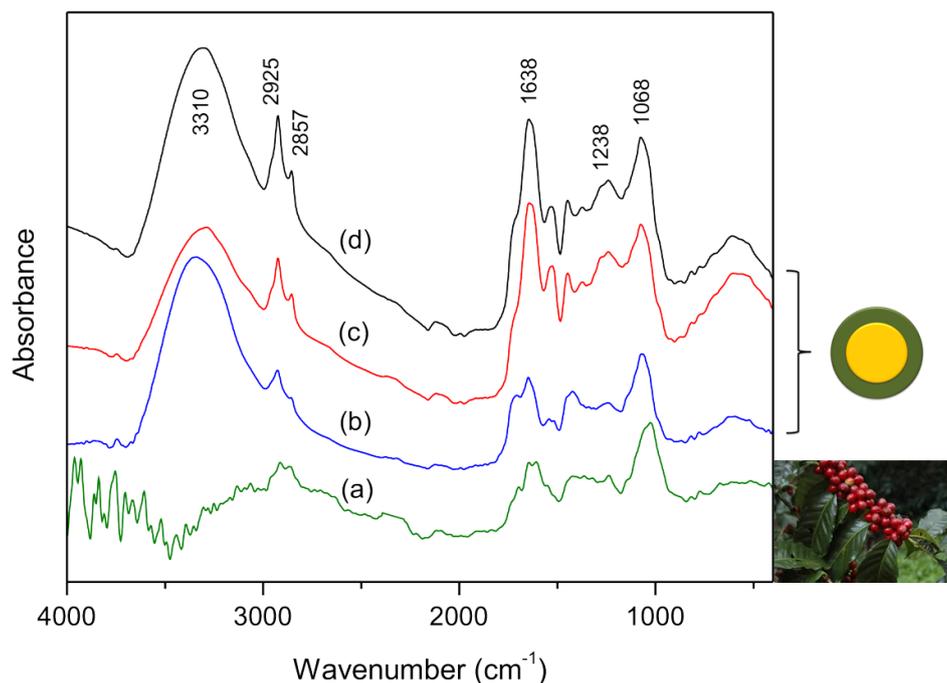


Figure 8. (a) FTIR spectrum of the reducing agent (coffee pulp extract). The rest of the FTIR spectra correspond to AuNPs synthesized under different preparation conditions (precursor concentration, reducing agent concentration, reaction time: (b) 3%, 0.5 mg/mL, 40 min, (c) 3%, 2 mg/mL, 40 min, and (d) 5%, 2 mg/mL, 40 min).

Therefore, the obtained FTIR spectra of the AuNPs synthesized under green chemical reduction show that they are coated with organic molecules contained in the coffee pulp extract. Figure 8 (b, c, d) shows the FTIR spectra of the gold nanoparticles coated with this extract at different conditions of preparation (precursor concentration, reducing agent concentration, reaction time: (b) 3%, 0.5 mg/mL, 40 min, (c) 3%, 2 mg/mL, 40 min, and (d) 5%, 2 mg/mL, 40 min). The FTIR intensity increased with the precursor concentration and reducing agent concentration. Similarly, the UV-visible maximum absorption (*MA*) intensity of the surface plasmon resonance of the AuNPs also increased. In all FTIR spectra of the AuNPs, a high similarity with the spectrum of the coffee pulp extract was observed, which strongly suggests that the organic compounds present in the extract are coating the surface of the AuNPs. The FTIR measurements were realized after centrifugation of the colloidal suspensions and after discarding the supernatant.

1.4 Conclusions

Response surface methodology (RSM) showed to be a useful tool to analyze one spectral property (maximum intensity) and two physical properties (particle size and particles

density) of AuNPs and their dependence on the preparation conditions (precursor concentration, reducing agent concentration and reaction time). In this work, the gold nanoparticles (AuNPs) were successfully prepared through a green synthetic approach that uses coffee pulp extract as reducing agent. The morphology and size of the obtained nanoparticles were evaluated by scanning electron microscopy and UV-vis spectrophotometry. In addition, the presence of organic compounds from the coffee pulp extract on the surface of the AuNPs was proved by Fourier transform spectroscopy (FTIR). These results suggest a viable strategy to synthesize AuNPs with a desired particle size or density in a reproducible and controlled form. The so obtained AuNPs, which are coated on their surface by bioactive compounds coming from the coffee pulp extract, could present useful biological activity, which may make them of interest for applications in the therapeutic area.

1.5 References

Aljabali AAA, Akkam Y, Al Zoubi MS et al (2018) Synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Ziziphus zizyphus* and their antimicrobial activity. *Nanomaterials* 8:174. <https://doi.org/10.3390/nano8030174>

Arellano-González MA, Amírez-Coronel AR, Torres-Mancera T, Pérez-Morales GG, Saucedo-Castañeda G (2011) Antioxidant activity of fermented and nonfermented coffee (*Coffea arabica*) pulp extracts. *Food Technology Biotechnology* 49:374–8

Agunloye E, Panariello L, Gavriilidis A, Mazzei L (2018) A model for the formation of gold nanoparticles in the citrate synthesis method. *Chemical Engineering Science* 191:318–331. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.06.046>

Braham JE, Bressani R (1978) *Pulpa de café composición, tecnología y utilización*. INCAP, Guatemala.

Bogireddy NKR, Pal U, Gomez LM, Agarwal V (2018) Size controlled green synthesis of gold nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and their catalytic performance in 4-nitrophenol reduction. *RSC Advances* 8:24819–24826. <https://doi.org/10.1039/C8RA04332A>

Cobaleda M, Almaraz N, Alanis RE, Uribe JN, González LS, Muñoz G, Morán O, Rojas M (2017) Rapid determination of phenolics, flavonoids, and antioxidant properties of *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem. and *Physalis angulata* L. by infrared spectroscopy

and partial least squares. *Analytical Letters* 51:523-536.
<http://10.1080/00032719.2017.1331238>

Cheng, H-W, Skeete ZR, Crew ER, Shan S, Luo J, Zhong C-J (2014) Synthesis of gold nanoparticles. In. Valcárcel M, López-Lorente I (ed) *Comprehensive Analytical Chemistry*, 1st edn. Elsevier, Poland, pp 37–79.

Chen X, Zhao X, Gao Y, Yin J, Bai M, Wang F (2018) Green synthesis of gold nanoparticles using carrageenan oligosaccharide and their in vitro antitumor activity. *Marine Drugs* 8:1-13. <https://doi/10.3390/md16080277>

Duangjai A, Suphrom N, Wungrath J, Ontawong A, Nuengchamnong N, Yosboonruang A (2016) Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. *Integr Medicine Res* 4:324-331. <https://doi/10.1016/j.imr.2016.09.001>

Fierro-Cabrales N, Contreras-Oliva A, González-Ríos O, Rosas-Mendoza ES, Morales-Ramos V (2018) Chemical and nutritional characterization of coffee pulp (*Coffea arabica* L.). *Agroproductividad*. 11:9-13

Hermanson G (2008) *Bioconjugate techniques*. Academic Press Inc, San Diego

Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG (2007) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV–Vis spectra. *Analytical Chemistry* 79:4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>

Hamelian M, Varmira K, Veisi H (2018) Green synthesis and characterizations of gold nanoparticles using Thyme and survey cytotoxic effect, antibacterial and antioxidant potential. *J of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 184:71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.05.016>

Huang L, Weng X, Chen Z, Megharaj M, Naidu R (2014) Green synthesis of iron nanoparticles by various tea extracts: Comparative study of the reactivity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 130:295–301. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.037>

ICO (2019) Historical data on the global coffee trade. International Coffee Organization. http://www.ico.org/about_statistics.asp?section=Statistics. Accessed 13 may 2020

Ismail E, Saqer A, Assirey E, Naqvi A, Okasha R (2018) Successful green synthesis of gold nanoparticles using a *Corchorus olitorius* extract and their antiproliferative effect in cancer cells. *International J of Molecular Science* 19:2612. <https://doi/10.3390/ijms19092612>

Janissen B, Huynh T (2018) Chemical composition and value-adding applications of coffee industry byproducts: A review. *Resources, Conservation and Recycling* 128:110-117. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.001>

Katas H, Chei-Sin L, Yasser Hamdi Nor Azlan A, Buang F, Fauzi Mh Busra M (2018) Antibacterial activity of biosynthesized gold nanoparticles using biomolecules from *Lignosus rhinocerotis* and chitosan. *Saudi Pharmaceutical* 27: 283-292. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.11.010>

Keijok WJ, Pereira RHA, Alvarez LAC (2019) Controlled biosynthesis of gold nanoparticles with *Coffea arabica* using factorial design. *Scientific Reports* 9:16019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52496-9>

Krishnaswamy K, Vali H, Orsat V (2014) Value-adding to grape waste: Green synthesis of gold nanoparticles. *J of Food Engineering* 142:210-220. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.014>

Liu Y, Kim S, Kim Y-J, Perumalsamy H, Lee S, Hwang E, Yi T-H (2019) Green synthesis of gold nanoparticles using *Euphrasia officinalis* leaf extract to inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation through NF- κ B and JAK/STAT pathways in RAW 264.7 macrophages. *International J of Nanomed* 14:2945–2959. <https://doi/10.2147/IJN.S199781>

Mohammed-Siddiq A, Thangam R, Madhan B, Alam Md S (2019) Green (gemini) surfactant mediated gold nanoparticles green synthesis: Effect on triple negative breast cancer cells. *Nano-Structures and Nano-Objects* 19:100373. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100373>

Oliveira JP, Prado AR, Juvêncio WK, Riveiro MR, Pontes MJ, Nogueira BV, Guimarães MCC (2017) A helpful method for controlled synthesis of monodisperse gold nanoparticles through response surface modeling. *Arabian J of Chemistry* 13:216-226. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.04.003>

Rajeshkumar S, Venkat SK, Ramaiah A, Agarwal H, Lakshmi T, Mohana SR (2018) Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Mangifera indica* leaves and evaluation of their antioxidant and cytotoxic properties in lung cancer (A549) cells. *Enzyme and Microbial Technology* 117: 91-95. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.06.009>

Saha N, Gupta SD (2016) Biogenic synthesis and structural characterization of polyshaped gold nanoparticles using leaf extract of *Swertia chirata* along with process optimization by Response Surface Methodology (RSM). *J of Clust Science* 4:1419–1437. <https://doi.org/10.1007/s10876-016-1009-8>

Silva SD, Feliciano RP, Boas LV, Bronze MR (2014) Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. *Food Chemistry* 150:489-493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.028>

Sadeghi B, Mohammadzadeh M, Babakhani B (2015) Green synthesis of gold nanoparticles using *Stevia rebaudiana* leaf extracts: Characterization and their stability. *J of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 148:101-106. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.025>

Vijaya-Kumar P, Mary-Jelastin SK, Prakash KS (2018) Green synthesis of gold nanoparticles using *Croton Caudatus* Geisel Leaf extract and their biological studies. *Mater Letters* 236:19-22. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.10.025>

CONCLUSIONES GENERALES

El extracto acuoso de pulpa de café demostró tener la capacidad para actuar como agente reductor en la síntesis verde de nanopartículas de oro, así como que sus componentes bioactivos actuaron como agentes de recubrimiento en las nanopartículas obtenidas. La Metodología de Superficie de Respuesta permitió conocer los niveles más adecuados de los factores (concentración del precursor, concentración del reductor y tiempo de reacción) así como su significancia. Pudimos observar que el factor tiempo es el parámetro con menor influencia durante la síntesis, lo que se traduce como un ahorro de energía y que el extracto es capaz de reducir al precursor de manera eficiente. El factor “concentración del agente precursor” resultó ser el factor con mayor importancia ya que este permitió obtener el mejor rendimiento en su nivel más alto. El valor más alto para *MA* fue encontrado en los niveles máximos de concentración del agente precursor y concentración del agente reductor, y el nivel mínimo de tiempo de reacción. Se encontró que al incrementar la concentración de agente reductor el tamaño de partícula disminuía y por tanto la densidad de partículas incrementaba. La espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier permitió conocer los grupos funcionales asociados a los componentes orgánicos de la pulpa de café. Las nanopartículas obtenidas podrían tener potencial para ser aplicadas en el área médica y en la industria alimentaria en el diseño de empaques.

RECOMENDACIONES GENERALES

Se recomienda para futuras investigaciones:

- Evaluar la capacidad antioxidante de las nanopartículas, ya que las lecturas de FTIR indican la presencia de grupos funcionales asociados a compuestos fenólicos.
- Evaluar si las nanopartículas poseen propiedades antibacterianas, ya que se ha comprobado que la pulpa de café tiene propiedades antibacterianas ante *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, así como en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (Duangjai *et al.*, 2016).
- Comprobar si la pulpa de café puede participar en la síntesis de otras nanopartículas metálicas de gran interés como de plata o cobre.

ANEXOS

A1. Anexos del Capítulo I

A 1.1 Pretratamiento de la pulpa de café.



Figura 1. Pasos de pretratamiento de la pulpa de café. a) Limpieza de la pulpa, b) deshidratado de pulpa de café, c) molienda y d) Pulpa de café seca y pulverizada (producto final).

A 1.2 Preparación del extracto acuoso de pulpa de café.



Figura 2. Extracto acuoso de pulpa de café. a) Pesado de la muestra, b) Extracción mediante calor, c) Sonicación y d) Extracto acuoso de pulpa de café.

A 1.3 Síntesis verde de nanopartículas de oro.

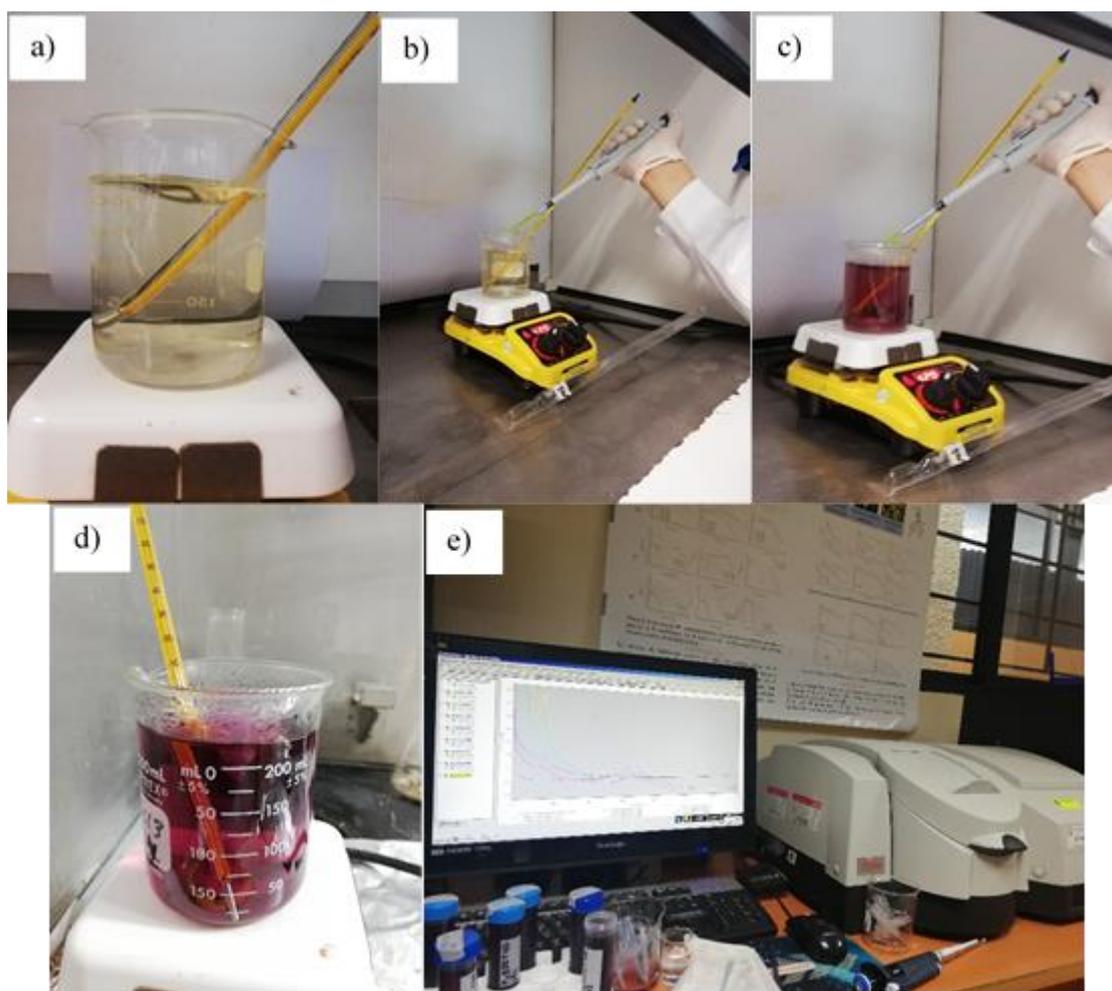


Figura 3. Síntesis verde de nanopartículas de oro. a) Calentamiento del extracto acuoso de pulpa de café, b) Adición del agente precursor (HAuCl_4), c) Reducción del agente precursor y formación de nanopartículas de oro, d) Suspensión coloidal de nanopartículas de oro obtenidas por síntesis verde, e) Medición de la Resonancia de Plasmón Superficial mediante espectrofotometría UV-visible.

A 1.4 Pretratamiento de muestra para lectura por Microscopía electrónica de Barrido.

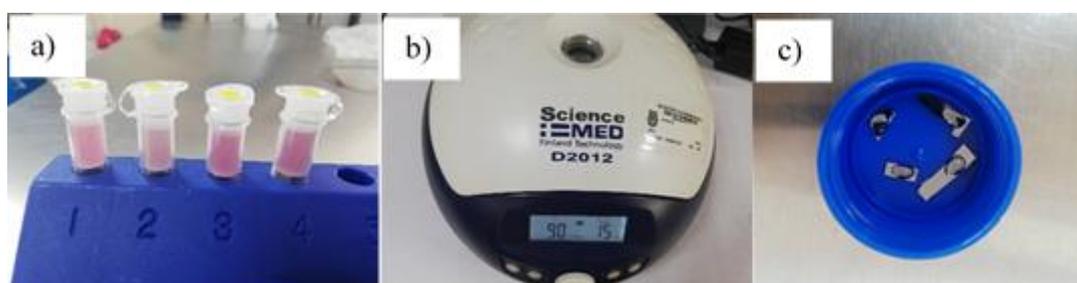


Figura 4. Preparación de la muestra para ser sometida a lectura por Microscopía Electrónica de Barrido. a) Muestras seleccionadas y colocadas en microtubos, b) Lavado por fuerza centrífuga, c) Muestras fijadas sobre cristales de silicio.