



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos



"Extractos de piel plateada de café para el desarrollo de nanopartículas de plata"

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
 Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

I.Q. Al. Cynthia Alicia Téllez Barrón

Dirigido por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

SINODALES

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Presidente

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Secretario

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Vocal

Dr. Emilio Álvarez Parrilla

Suplente

Dr. Luis Arturo Godínez Mora-Tovar

Suplente

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

 MSP Sergio Pacheco Hernández
 Director de la Facultad

 Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña.
 Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
 Querétaro, Qro, Diciembre, 2017

RESUMEN

El café es un producto alimenticio de importancia global debido a su alto consumo. Durante los procesos industriales para la obtención de café tostado y café soluble se generan diferentes tipos de desechos, los más importantes son el café gastado y la piel plateada de café. Estos residuos representan una fuente de contaminación ambiental debido a su alta carga de materia orgánica y a la presencia de sustancias tóxicas para las plantas y microorganismos del suelo. Sin embargo, en su composición poseen una gran cantidad de compuestos fenólicos que pueden ser utilizados para la síntesis verde de nanopartículas de plata, lo cual representa una alternativa sustentable y amigable con el medio ambiente. Hoy en día las nanopartículas de plata (AgNPs) son utilizadas en las industrias médica, textil y alimenticia porque poseen actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas. En este trabajo se propuso la síntesis verde a partir de extractos de piel plateada de café de nanopartículas de plata estables y con actividad microbiológica. Se obtuvieron cuatro diferentes tipos de extractos acuoso-etanólicos a partir de piel plateada de café a los cuales se les evaluó la capacidad antioxidante usando los ensayos de ABTS, DPPH y Folin Ciocalteu, y su perfil químico fue determinado por HPLC/ DAD y UPLC-MS. Las AgNPs fueron sintetizadas con los extractos ricos en ácido clorogénico. Se empleó espectroscopia UV-Vis para confirmar la formación del plasmón de superficie en el rango característico para este tipo de material. Se evaluó la influencia de la concentración del extracto, la temperatura, el tiempo de reacción y el pH sobre el proceso de síntesis de las AgNPs y se observó una mayor velocidad de formación a pH básico. Mediante espectroscopia FTIR se observó que los grupos funcionales de los compuestos antioxidantes pueden participar en la formación de nanopartículas de plata. Se sintetizaron nanopartículas esféricas e irregulares a partir de los cuatro extractos de piel plateada de café y tuvieron un diámetro menor a 100 nm. Las nanopartículas sintetizadas a partir del extracto C presentaron la mayor actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

Palabras clave: Piel plateada de café, nanopartículas de plata, síntesis verde, actividad antimicrobiana.

SUMMARY

Coffee is a food product of global importance due to its high consumption. During the industrial processing of roasted and soluble coffee different types of waste are generated, the most important are: the spent and the silver skin of coffee. These residues represent a source of environmental pollution because its high load of organic material and the presence of toxic to plants and soil microorganisms. However, its composition has a large number of phenolic compounds that can be used for green synthesis of silver nanoparticles, which represents a sustainable and friendly alternative for environment. Nowadays silver nanoparticles (AgNp) are widely used in the food, textile and medical industry; because they possess antimicrobial activity against positive and negative Gram bacteria. In this work, green synthesis of stable silver nanoparticles with antimicrobial activity was proposed using silver-skin coffee extracts. Four different types of aqueous-ethanol extracts were obtained from the silver skin of coffee, which were evaluated for their antioxidant capacity using the Folin Ciocalteu, ABTS and DPPH assays, and their chemical profile was determined by HPLC/DAD and UPLC-MS. AgNPs were synthesized with the extracts, rich in chlorogenic acid. UV-Vis spectroscopy was used to confirm the formation of the surface plasmon in the characteristic range for this type of material. The influence of the concentration of the extract, the temperature, the reaction time and the pH on the synthesis process of the AgNp were evaluated, observing that at basic pH the formation of AgNp was very fast. Fourier transform infrared spectra revealed that the functional groups of antioxidant compounds may coordinate or complex into silver nanoparticles. Spherical and irregular shaped nanoparticles were synthesized from the four extracts of coffee silver skin and have a diameter ≤ 100 nm. The nanoparticles synthesized from the extract C have the greatest antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*.

Keywords: Coffee silver skin, silver nanoparticles, green synthesis, antimicrobial activity.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por su presencia en mi vida, a mis padres por ser el motor que me impulsa a hacer y ser lo que soy. A mi hermano por estar cuando lo he necesitado y por el apoyo que me brinda para finalizar mi tesis. A mi tía Adriana, tía Martha y tío Martínez porque siempre me han brindado su ayuda y comprensión.

A las hermanas Rojo Sámano (Gaby y Camila) por ser ejemplo e inspiración de mujeres exitosas y por su infinito apoyo durante esta etapa.

A los amigos que tuve la fortuna de conocer durante la maestría Karla, Memo, Jorge, Astrid, Richie, Cami, Ale; Cinthya, Maguie y Eli, que hoy forman parte importante de mi vida y con los cuales compartí tantos momentos. Especialmente agradezco a Maguie por su amistad, guía y ayuda para la realización de este proyecto y Memo por ser el mejor amigo y compañero de laboratorio

A mis mejores amigos Gabo, Jary, Miri y Jessy que siempre forman parte importante en mis proyectos de vida, los quiero, gracias por todo y por tanto.

A la Dra. Sandra por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo y a mis sinodales por haber realizado importantes aportaciones a este proyecto.

Al Dr. Peniche por haber sido el mejor asesor y por haberme escuchado y apoyado durante mi paso por el posgrado de química.

Agradezco a Ma. Lourdes Palma Tirado por su asistencia en la obtención de resultados mediante Microscopía Electrónica de Transmisión.

Agradezco Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Tabla de contenido

RESUMEN	ii
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1 Café	3
1.2 Estructura del café	4
1.3 Procesamiento del café	5
1.4 Composición del café.....	6
1.5 Composición química de la piel plateada de café.....	7
1.5.1 Fibra dietaria	7
1.5.2 Proteína, grasas y cenizas	8
1.6 Extractos de piel plateada de café.....	10
1.6.1 Actividad antioxidante de la piel plateada de café	10
1.7 Nanopartículas.....	11
1.7.1 Métodos de síntesis	11
1.7.2 Síntesis de nanopartículas de plata	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	17
3. HIPÓTESIS.....	18
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 General	18
4.2 Específicos.....	18
5. METODOLOGÍA	19
5.1 Materiales	19
5.1.1 Cepas.....	19
5.2 Preparación de extractos	19
5.2.1 Determinación de capacidad antioxidante	20
5.2.2 Determinación de fenoles totales	21
5.3 Síntesis verde de nanopartículas de plata.....	25
5.3.1 Centrifugación de nanopartículas de plata.....	29
5.4 Caracterización de nanopartículas de plata.....	29

5.4.1	UV-Vis	29
5.4.2	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	29
5.4.3	Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	29
5.5	Análisis de estabilidad	30
5.6	Caracterización microbiológica	30
5.6.1	Lavado de cepas	30
5.6.2	Difusión en placa (Halo de inhibición).....	30
5.7	Análisis estadístico	31
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1	Obtención de extractos	32
6.1.1	Rendimientos de extracción	33
6.2	Caracterización de extractos	35
6.2.1	Capacidades antioxidantes.....	35
6.2.2	Contenido de compuestos fenólicos por HPLC-DAD.....	37
6.2.3	Identificación de compuestos por UPLC-MS.....	42
6.3	Nanopartículas de plata	47
6.3.1	Síntesis de nanopartículas de plata y su análisis UV-vis.....	47
6.3.2	Estabilidad de las nanopartículas de plata.....	55
6.3.3	Caracterización fisicoquímica.....	60
6.3.4	Caracterización microbiológica	68
7.	CONCLUSIONES	75
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	77

Índice de cuadros

Cuadro 1. Composición nutricional de la piel plateada de café (g por 100g).....	8
Cuadro 2. Condiciones para la determinación de compuestos fenólicos por HPCL.	22
Cuadro 3. Condiciones para la determinación de compuestos fenólicos en los extractos de piel plateada de café por UPLC.....	23

Cuadro 4. Condiciones para la determinación de compuestos fenólicos en los extractos de piel plateada de café por UPLC.....	24
Cuadro 5. Diseño experimental para síntesis verde de las nanopartículas de plata.	26
Cuadro 6. Diseño experimental para síntesis verde de las nanopartículas de plata empleando pH básicos.....	27
Cuadro 7. Condiciones de extracción para la piel plateada de café y resultados previos.....	32
Cuadro 8. Porcentaje de rendimiento de los extractos de piel plateada de café...	34
Cuadro 9. Capacidades antioxidantes de los extractos de piel plateada de café..	36
Cuadro 10. Estándares de compuestos analizados por HPLC.....	38
Cuadro 11. Características espectrofotométricas del ácido clorogénico y protocatecuico de los extractos de piel plateada de café obtenidos por UPLC-DAD-MS.....	43
Cuadro 12. Características espectrofotométricas de la cafeína de los extractos de piel plateada de café obtenidos por UPLC-DAD-MS.....	44
Cuadro 13. Análisis de la formación del plasmón de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas bajo diferentes condiciones a partir de los extractos de piel plateada de café.	50
Cuadro 14. Análisis del plasmón de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café empleando pHs básicos.....	51
Cuadro 15 Picos observados en los espectros de los extractos de piel plateada de café y las nanopartículas de plata centrifugadas.....	65

Índice de figuras

Figura 1 Sección típica de una cereza de café.....	4
Figura 2. Esquema de producción de la piel plateada de café a partir del proceso húmedo.	5
Figura 3 Mecanismo de síntesis de nanopartículas.....	12

Figura 4. Posibles componentes químicos del extracto de planta responsables de la bio-reducción de iones metálicos.	14
Figura 5. Mecanismo propuesto para la acción antibacterial de las nanopartículas de plata. 1-atracción electrostática, 2-producción de radicales libres, cambios en la permeabilidad, alteración de la respiración, fuga del contenido intracelular, 3-modulación de los perfiles de fosfotirosina de las proteínas, involucrados en la progresión del ciclo celular y la síntesis de polisacáridos de capsula, 4- interacción con los grupos SH-; inhibición de la función y síntesis de proteínas, 5-interacción con moléculas que contienen fósforo (ADN).....	17
Figura 6. Extractos de piel plateada de café.....	34
Figura 7. Cromatograma HPLC de estándares de compuestos obtenido a 280nm	38
Figura 8. Cromatogramas HPLC-DAD de los extractos de piel plateada de café obtenidos a 280nm.....	40
Figura 9. Concentración de ácido clorogénico en los extractos de piel plateada de café.	41
Figura 10. Compuestos identificados en los extractos de piel plateada de café ...	42
Figura 11. Espectros de masas del ácido protocatecuico.....	45
Figura 12. Espectros de masas de la cafeína.....	46
Figura 13. Cambio de coloración por la formación de nanopartículas de plata.	49
Figura 14. Posible mecanismo de formación de las nanopartículas de plata a partir de compuestos fenólicos.....	49
Figura 15. Plasmón de superficie de las nanopartículas de plata obtenidas a partir de diferentes condiciones de obtención empleando los extractos de piel plateada de café.	51
Figura 16. Reacción de reducción de los iones plata	52
Figura 17. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los 4 diferentes extractos de piel plateada a pH 10.....	53
Figura 18. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los 4 diferentes extractos de piel plateada a pH 11.....	53

Figura 19. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los 4 diferentes extractos de piel plateada a pH 12.	54
Figura 20. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café a pH básicos al tiempo 0.	56
Figura 21. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café a pH básicos después de 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.....	56
Figura 22. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café a pH básicos después de 3 meses de almacenamiento en refrigeración.....	57
Figura 23. Imagen TEM de las nanopartículas de plata obtenidas a partir del extracto C de PP a pH=10, después de 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.	58
Figura 24. Histograma de distribución de tamaños de nanopartículas de plata sintetizadas a partir del extracto de piel plateada de café C después de tres meses de almacenamiento a temperatura ambiente.....	59
Figura 25. Histogramas de distribución de tamaños de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café a pH= 10: a) AgNPs extracto A; b) AgNPs extracto B; c) AgNPs extracto C; d) AgNPs extracto D.	61
Figura 26-Imágenes TEM de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de una solución de 1mg/mL de extractos de piel plateada de café a pH=10: a) AgNPs extracto A; b) AgNPs extracto B; c) AgNPs extracto C, d) AgNPs extracto D.	62
Figura 27. Imágenes de TEM de las nanopartículas de plata centrifugadas, sintetizadas a partir de extractos de piel plateada de café a pH=10: a) AgNPs extracto A; b) AgNPs extracto B; c) AgNPs extracto C, d) AgNPs extracto D.	63
Figura 28.-Histogramas de distribución de tamaños de las nanopartículas de plata centrifugadas, sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café A, B, C y D a pH 10.	64
Figura 29. Espectros FTIR de los extractos de piel plateada.	66
Figura 30 Espectros FTIR de las nanopartículas de plata centrifugadas sintetizadas a partir de los extractos de PP.....	67

Figura 31. Diámetros de halo de inhibición de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café contra E.Coli: a) AgNPs extractoA; b) AgNPs extracto B; c) AgNPs extracto C; d) AgNPs extracto D.

..... 69

Figura 32 Diámetros de halo de inhibición de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café contra L.Monocytogenes: a) AgNPs extractoA; b) AgNPs extracto B; c) AgNPs extracto C; d) AgNPs extracto D. 70

Figura 33. Nanopartículas de plata dispersas en agua desionizada [1000ug/mL] 73

INTRODUCCIÓN

El café es un producto alimenticio de gran importancia debido a su alto consumo e impacto en la economía global, generándose grandes cantidades de residuos industriales durante su procesamiento. Las compañías de café producen anualmente más de 2 millones de toneladas de subproductos principalmente el café utilizado (CU) y la piel plateada (PP) (Jiménez-Zamora *et al.*, 2015). El café utilizado es el residuo de sólidos obtenido durante la preparación de café instantáneo, mientras que la PP es el tegumento que cubre al grano de café, la cual es removida por completo como resultado del proceso de tostado de los granos (Machado *et al.*, 2012). Durante éste proceso el residuo de piel plateada de café puede llegar a representar hasta el 3% en peso del grano de café (Murthy & Madhava, 2012).

Estos residuos generados durante el procesamiento del café representan serios problemas ambientales ya que son altamente contaminantes para las tierras, debido a la presencia de compuestos orgánicos que generan una alta demanda química de oxígeno, entre ellos la cafeína y los polifenoles, que resultan tóxicos para plantas y microorganismos (Nabais *et al.*, 2008, Mussatto *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2012; Ricardo *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 1998). La PP es desechada debido a la falta de una metodología efectiva para su uso, en algunos países es empleada como fertilizante o simplemente quemada (Machado *et al.*, 2012). Esto último conlleva a un efecto negativo sobre el medio ambiente, por lo cual la transformación de este subproducto para la obtención de productos valiosos para otros propósitos es sumamente atractiva.

De acuerdo a diversos estudios se conoce que la PP posee una alta concentración de fibra dietaria soluble, además contiene: celulosa, hemicelulosa, proteínas, grasas, polifenoles, minerales y productos formados por la reacción de Maillard durante el proceso de tostado, como las melanoidinas (Borrelli *et al.*, 2004). Estos compuestos presentan diferentes propiedades como actividad

antioxidante, actividad prebiótica y acción inhibitoria sobre la enzima hialuronidasa; también se ha reportado su uso para realizar fermentaciones en estado sólido (Borrelli *et al.*, 2004; Narita & Inouye, 2014).

En investigaciones realizadas sobre la capacidad antioxidante de la PP se ha demostrado que los extractos metanólicos y acuosos poseen actividad antioxidante (Pourfarzad *et al.*, 2013); la cual depende de la temperatura y tiempo de extracción (Costa *et al.*, 2014; Narita & Inouye, 2012; Pourfarzad *et al.*, 2013).

Actualmente se ha generado un gran interés en el uso de extractos de plantas para la biosíntesis de nanopartículas de metales, debido a la gran disponibilidad de las plantas, representando una alternativa sustentable, de bajo costo, efectiva y amigable con el ambiente.

Los extractos de las plantas pueden actuar como agentes reductores y estabilizadores de la reacción en la síntesis de las nanopartículas debido a la presencia de biomoléculas como proteínas, aminoácidos, vitaminas, polisacáridos, ácidos orgánicos, etc. (Iravani, 2011). Los estudios realizados hasta el momento se han enfocado principalmente en la biosíntesis de nanopartículas de oro (Coman *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2016) y plata (Dhand *et al.*, 2016; Espenti *et al.*, 2016; Rao *et al.*, 2016).

Las nanopartículas de plata son importantes debido a las propiedades antibacteriales de la plata cero-valente y a la fácil reducción de las sales de plata (I) a plata cero-valente.

Es por lo anteriormente mencionado que el objetivo de este estudio fue analizar la capacidad de extractos de la piel plateada del café como agente reductor en la síntesis de nanopartículas de plata.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Café

El café es el producto alimenticio más importante del mundo debido a su impacto en la economía, es el segundo producto comercializado en el mundo después del petróleo. La bebida de café es ampliamente consumida y consiste en una infusión preparada a partir de los granos molidos y tostados (Esquivel & Jiménez, 2012a). La Organización Internacional del Café estima que la producción mundial de café durante 2015-2016 corresponde a 8.6 millones de toneladas y el consumo reportado durante 2014 fue de 9 millones de toneladas (ICO, 2016). En México durante 2015-2016 la producción corresponde a 234 mil toneladas y el consumo es de 144 mil toneladas, según lo reportado por la ICO (2016).

Las especies de café son arbustos de hoja perenne o árboles pequeños originarios de las montañas de Etiopía que pertenecen a la familia botánica *Rubiaceae* y el género *Coffea* (Patay *et al.*, 2016). El café se cultiva principalmente en áreas tropicales y subtropicales a una altitud de 200-1200 m, en un área entre 25° N de latitud y 25° S de latitud, conocida como el “cinturón del café” (Narita & Inouye, 2014; Patay *et al.*, 2016).

Las principales especies cultivadas para la producción de café son: el *Coffea arabica*, conocido como café arábica el cuál representan aproximadamente el 75% de la producción global y el *Coffea canephora*, conocido como café robusta que representa el 24% de la producción global (Narita & Inouye, 2014). Durante 2015 el mayor importador de café fue la Unión Europea, seguido de Estados Unidos y Japón. En el mismo año Brasil es el país que encabeza la lista de exportaciones, seguido de Vietnam y Colombia (IOC, 2016).

1.2 Estructura del café

El fruto de café (también llamado baya o cereza) posee una superficie lisa, piel exterior dura o pericarpio, los frutos inmaduros generalmente son de color verde, pero se vuelven rojo-violeta o rojo oscuro al madurar (incluso amarillo o naranja en genotipos particulares) (Esquivel & Jiménez, 2012b).

El fruto de café denominado también cereza del café (Figura 1), es ovalado y mide aproximadamente 10 mm, este fruto está constituido por varias capas (Narita & Inouye, 2014). Una de ellas es el pericarpio, el cual cubre la pulpa amarillenta, fibrosa y dulce o mesocarpio exterior. La siguiente es una capa translúcida, incolora, delgada, viscosa, altamente hidratada de mucilago, también conocida como capa de pectina. Después se encuentra el pergamino o endocarpio amarillento y finalmente, la piel plateada cubre cada hemisferio del grano de café o endospermo (Esquivel & Jiménez, 2012a).

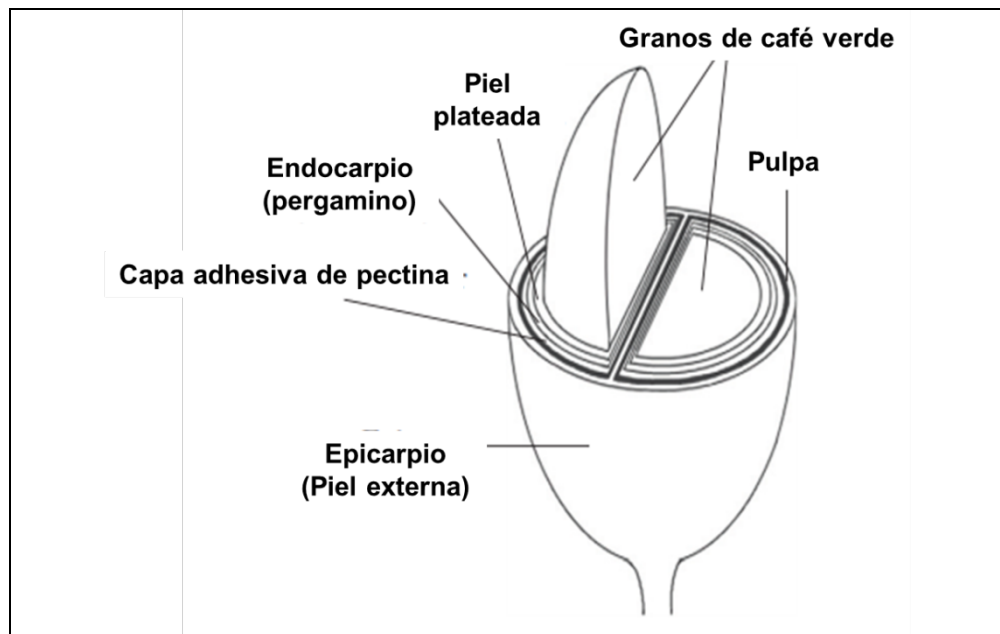


Figura 1. Sección típica de una cereza de café.

Adaptado de Narita & Inouye, 2014.

1.3 Procesamiento del café

Los granos de café verde generalmente son obtenidos mediante dos procesos: la purificación y el trillado. Para el proceso de purificación se emplean dos métodos; uno en húmedo (Figura 2) y el otro en seco. En ambos procesos la piel externa, la pulpa, la capa de pectina y el pergamino son completamente removidos del grano de café verde. Sin embargo, una porción de la piel plateada (PP) del café permanece en el grano de café verde después del tratamiento.

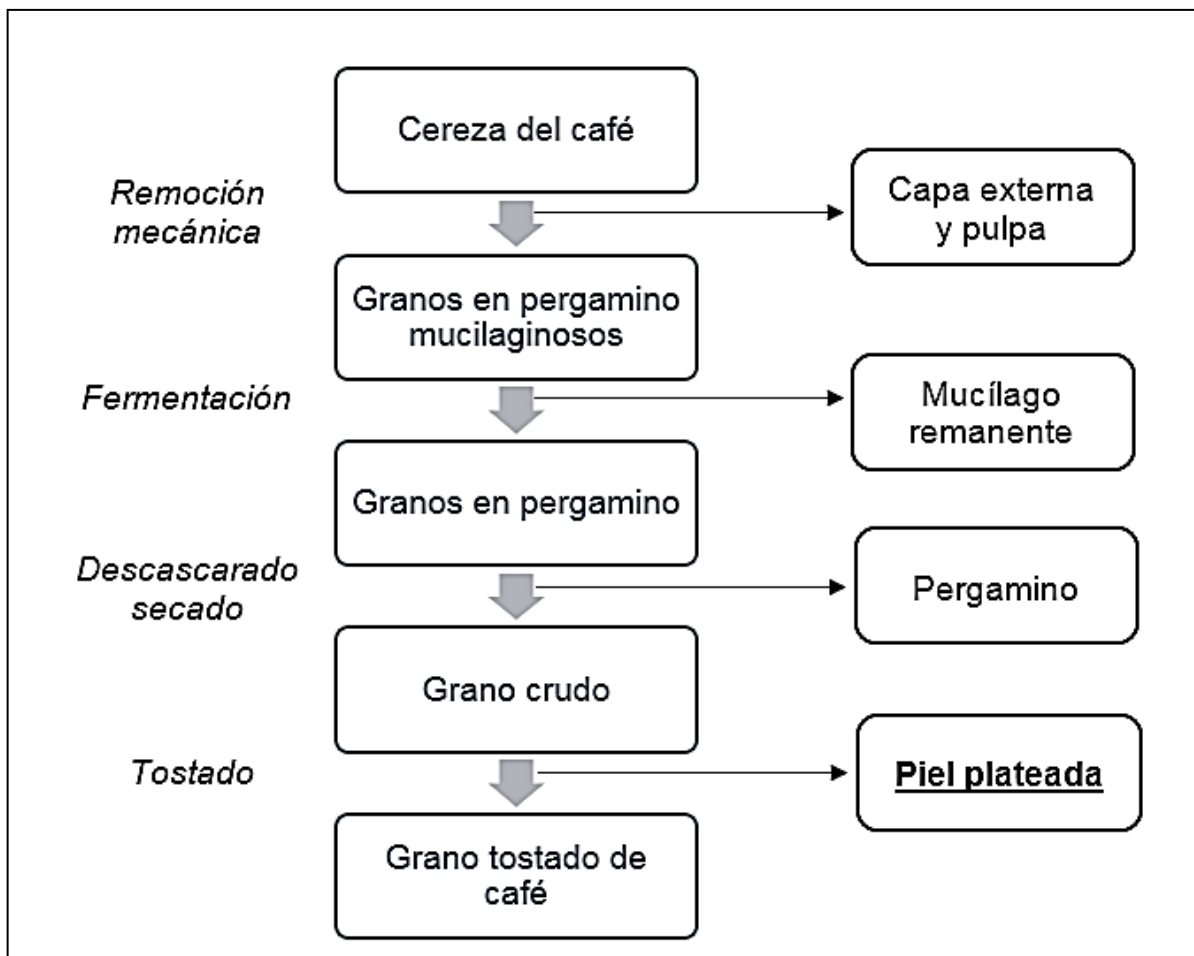


Figura 2. Esquema de producción de la piel plateada de café a partir del proceso húmedo.

Adaptado de Borrelli *et al.*, 2004.

En el método seco, el fruto de café entero (cereza) es secado junto con la pulpa y mucílago, mientras que en el método húmedo se requiere de la remoción de la pulpa y el mucílago antes del secado del fruto (estado pergamino). La calidad del producto húmedo es mayor a la del producto seco, esto debido a que durante el proceso de fermentación que se lleva a cabo en agua se emplean temperaturas más bajas (Napolitano, *et. al.*, 2007).

Para el tostado de los granos se emplea calor seco con temperaturas entre 200 - 300°C y agitación constante, para asegurar un calentamiento uniforme. En estas condiciones ocurren cientos de reacciones químicas como las reacciones de Maillard y Strecker, así como la degradación de proteínas, polisacáridos, trigonelina y ácidos clorogénicos (Napolitano *et al.*, 2007); también algunos de los azúcares son transformados a CO₂ y otros caramelizados, contribuyendo al sabor y color del café tostado (Narita & Inouye, 2014).

Como parte de este proceso se genera la piel plateada (Figura 2), el único subproducto del proceso de tostado de los granos en grandes cantidades por los tostadores de café a gran escala (Narita & Inouye, 2014).

El café obtenido mediante cualquiera de los dos procesos es consumido por la población y su composición química y efectos sobre la salud han sido ampliamente utilizados.

1.4 Composición del café

El café contiene minerales que pueden proporcionar hasta el 8% de la ingesta diaria de Cr y puede ser una fuente natural de Mg; una media de 63.7 mg/taza (100mL) ha sido reportada (Napolitano *et. al.*, 2007; Patay *et al.*, 2016). Además contiene ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido cafeíco, ácido sinápico, ácido nicotínico, trigonelina, ácido quinolínico, ácido tánico, ácido pirogálico, kaempferol, entre otros (Patay *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que los compuestos presentes en el café tienen diferentes tipos de actividades como: antioxidantes, hepatoprotectivas, antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias e hipolipidémicas (Patay *et al.*, 2016).

Cabe resaltar que el café es la mayor fuente de ácidos clorogénicos en la dieta humana, entre ellos algunos subgrupos de isómeros como los ácidos cafeoilquínicos, ácidos dicafeoilquínicos, ácidos feruloilquínicos (Hečimović *et al.*, 2011). Los principales ácidos presentes en el café verde son el 3-,4-, y 5- ácido cafeoilquínico (3-,4-, y 5-CQA), 3,4-, 3,5-, y 4,5- ácidos dicafeoilquínico (3,4-, 3,5- y 4,5-, DCQA), y 3-,4-, y 5- ácidos feruloilquínicos (3-,4-, y 5-FQA), entre otros. Otros compuestos bioactivos encontrados en el café verde son las metilxantinas: cafeína, teobromina y la teofilina, siendo la cafeína el principal alcaloide presente en el café (Baeza *et al.*, 2014).

1.5 Composición química de la piel plateada de café

La piel plateada (PP) de los granos de café contiene varias clases de compuestos: ácidos fenólicos, diterpenos, xantinas, fibra dietaria, grasas, ceniza y precursores de vitaminas. Otro compuesto que debe ser considerado en la PP del café es el 5-hidroximetil furfural (HMF), formado durante el tostado del café (Del Campo, 2010), el cual es citotóxico, irrita los ojos, la piel y las membranas mucosas a altas concentraciones (Rodrigues *et al.*, 2015).

1.5.1 Fibra dietaria

La PP del café tiene un alto contenido de fibra dietaria (50-60%), de la cual el 15% es soluble y el 85% insoluble. El contenido de fibra dietaria es más alto que en otras plantas alimenticias como la manzana (28.43%), brócoli (28.94%), col (22.41%), zanahoria (28.4%), salvado de trigo (41.97%), salvado de avena (28.60%) y papa (2.85%). La PP del café contiene aproximadamente 30% de lignina, y los polisacáridos son 17.8% de glucano, 4.7% de xilano, 2% de

arabinano, 3.8% de galactano y 2.6% de manano. El bajo contenido de monosacáridos es un posible efecto del bajo contenido de azúcares reductores (Narita & Inouye, 2014).

1.5.2 Proteína, grasas y cenizas

La PP de café contiene proteína (16.2-19.0%), grasa (1.56-3.28), cenizas, (7%), cafeína (0.81-1.37%) y su composición mineral no ha sido dilucidada aún. Los contenidos de cafeína de la PP son menores que en el grano de café (1-3% en grano). En un estudio realizado por Napolitano *et al.* (2007) se investigaron 7 tipos de PP provenientes de diferentes áreas de cultivo y especies, las cuales difieren en su contenido de proteína, grasas, carbohidratos, azúcares reductores, cafeína, fibra dietaria total, fibra dietaria insoluble y fibra dietaria soluble, encontrando que no existía una correlación significativa entre la variedad geográfica, las condiciones de cultivo y su composición química (Narita & Inouye, 2014).

En el composición de la PP del café.

Cuadro 1. Composición nutricional de la piel plateada de café (g por 100g). se muestra una recopilación de resultados obtenidos de la composición de la PP del café.

Cuadro 1. Composición nutricional de la piel plateada de café (g por 100g).

Componente	PP				
	_*A	Arabica* ^B	Canephora* ^C	Arabica* ^C	_* ^D
Proteínas	18.6±0.6	18.6±0.3	17.9-19.0	18.4-19.0	16.2
Grasas	2.2±0.1	2.2±0.5	2.50-2.92	1.56-3.28	N.A.
Carbohidratos	62.1±1.6	65.1±1.2	47.0-80.5	34.6-52.0	N.A.

Azúcares reductores	0.2±0.01	N.A.	N.D.	N.D.	N.A.
Humedad	7.3±0.4	7.1±0.2	N.A.	N.A.	4.7
Minerales (Cenizas)	7.0±0.2	7.0±0.2	N.A.	N.A.	N.A.
Cafeína	N.A. ^a	N.A.	0.81-1.37	0.83-1.16	N.A.
Ocratoxina A	<4 ppb	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Fibra total dietaria	62.4±0.6	62.4±0.5	53.4-69.2	56.4-65.9	N.A.
Fibra insoluble dietaria	53.7±0.2	53.7±0.4	48.5-64.2	50.1-60.7	N.A.
Fibra soluble dietaria	8.8±0.4	8.8±0.6	4.9-9.3	5.0-6.3	N.A.
Glucano	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	17.8
Xilano	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	4.7
Arabinano	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	2.0
Galactano	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	3.8
Manano	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	2.6
Lignina	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	30.2
Grupos acetilo	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	3.0
Extractivos	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	15.0

N.A. No aplica. N.D. No detectada

De Borelli *et al.*, 2004 y Napolitano *et al.*, 2006 **(A)**; Pourfarzad *et al.*, 2013 **(B)**; Napolitano *et al.*, 2007 **(C)** and Mussatto *et al.*, 2012 **(D)**.

Adaptada de Narita & Inouye, 2014.

1.6 *Extractos de piel plateada de café*

Investigaciones han demostrado que los rendimientos de extracción de sólidos solubles obtenidos a partir de la PP mediante la extracción acuosa cambian con la temperatura de extracción. En un estudio realizado por Narita e Inouye (2012) reportaron que los rendimientos de extracción a 25°C y 80°C fueron de 16% (p/p en materia seca) y 19% (p/p en materia seca), respectivamente. Furusawa y colaboradores (2011) reportaron que las cantidades de azúcares totales en el extracto acuoso de la PP fueron de 29.5% (p/p en la materia seca) y que el extracto contenía polisacáridos ácidos. Se sugiere que estos polisacáridos son sustancias pécticas porque estas tienen un alto contenido de ácido urónico.

1.6.1 *Actividad antioxidante de la piel plateada de café*

Diversos estudios han demostrado que los extractos de la PP de café poseen capacidad antioxidante, por ejemplo Borrelli y colaboradores en 2004 reportaron que extractos metanólicos de la PP de café evaluados mediante el ensayo de ABTS poseen una capacidad de captación de radicales similar a la del salvado de trigo, el cual es conocido por tener una alta actividad antioxidante.

Otro estudio realizado por Narita & Inouye (2012), permitió encontrar que al aumentar la temperatura de extracción se incrementaba la actividad antioxidante determinada por los métodos de DPPH y H-ORAC.

La capacidad antioxidante del extracto acuoso de PP a 25° C, determinada por el método H-ORAC de 354 $\mu\text{mol TE/g}$ de extracto es superior a los valores obtenidos de frutas como arándano, ciruela, frambuesa, manzana y naranja; y vegetales como zanahoria, pimiento verde y espinacas los cuales tienen valores de 5-70 $\mu\text{mol TE/g}$ (Narita & Inouye, 2014).

1.7 Nanopartículas

Las nanopartículas son agregados de átomos de 1-100 nm (El-Nour, *et al.*, 2010), son de gran interés debido a su pequeño tamaño y gran área superficial, lo cual le proporciona propiedades físicas y químicas diferentes con respecto al material en su estado natural con la misma composición química, por ejemplo, propiedades mecánicas, biológicas y estéricas, actividad catalítica, conductividad eléctrica y térmica y punto de fusión. (Iravani, 2011).

La síntesis de nanopartículas metálicas es un área activa de investigación académica y de aplicación en nanotecnología. Existen una gran variedad de procedimientos químicos y físicos para la síntesis de nanopartículas metálicas. (Thakkar *et al.*, 2010)

1.7.1 Métodos de síntesis

Los métodos para sintetizar nanopartículas se pueden clasificar de acuerdo a su tipo de enfoque en: “de arriba hacia abajo” o de “abajo hacia arriba”. En la síntesis de arriba hacia abajo las nanopartículas se producen a partir de la reducción del tamaño de un material de partida adecuado, esta reducción se lleva a cabo con diversos tratamientos químicos y físicos; por ejemplo: técnicas litográficas (UV, haz de electrones o iones), ablación laser, campos ultrasónicos, técnicas mecánicas (molienda mecánica, lijado, pulido). Los métodos de arriba hacia abajo pueden producir imperfecciones en la estructura superficial y representa su mayor limitación debido a que la superficie química y otras propiedades físicas de las nanopartículas son altamente dependientes de la estructura superficial (Mittal *et al.*, 2013a; Rotello, 2012).

En la síntesis de abajo hacia arriba, las nanopartículas son construidas a partir de formas (partículas) más pequeñas, por ejemplo mediante la unión de

átomos y moléculas. La producción de nanopartículas bajo este enfoque se realiza por precipitación química/electroquímica, condensación atómica/molecular, entre otros; aunque se lleva a cabo principalmente mediante síntesis química y biológica. El posible mecanismo de formación de las nanopartículas considerando este enfoque se muestra en la Figura 3 (Mittal *et al.*, 2013a).

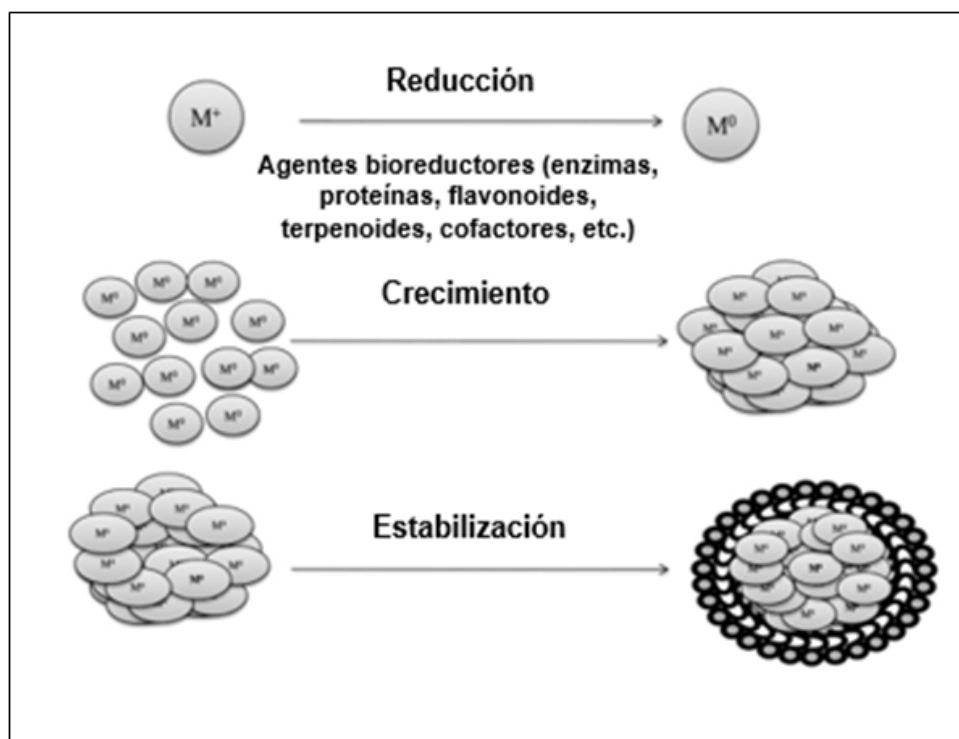


Figura 3. Mecanismo de síntesis de nanopartículas.

Adaptado de Mittal *et al.*, 2013

Entre los métodos empleados para la síntesis de nanopartículas uno de los más simples involucra la reducción de la sal metálica tetrafluoroborato de plata ($AgBF_4$) con borohidruro de sodio ($NaBH_4$) en agua. También existe un método electroquímico el cual involucra la electro-reducción del nitrato de plata ($AgNO_3$) en una solución acuosa en presencia de poli etilenglicol. Además posteriormente a este método de síntesis se requiere de su estabilización mediante la adición de agentes coloidales protectores (Prabhu & Poulouse, 2012).

1.7.1.1 Síntesis verde

Las técnicas para obtener nanopartículas usando reactivos de origen natural como vitaminas, azúcares, extractos de plantas, polímeros biodegradables y microorganismos como agentes reductores y estabilizantes pueden ser consideradas una alternativa atractiva para la nanotecnología. De los materiales anteriormente mencionados, los materiales basados en plantas parecen ser los mejores candidatos para la biosíntesis de nanopartículas a gran escala. Se cree que el agente clave en esta síntesis son los polifenoles (Kharissova *et al.*, 2013).

Los microorganismos son capaces de sintetizar nanopartículas, pero la velocidad de síntesis es lenta y se limita a un número de formas y tamaños. En la actualidad los hongos están ganando popularidad como nano-fábricas para la síntesis verde de nanopartículas. En general, los materiales biológicos proporcionan un método ambientalmente amigable para producir materiales eliminando la necesidad de usar reactivos tóxicos y peligrosos (Kharissova *et al.*, 2013).

La síntesis verde de nanopartículas proporciona una ventaja sobre otros métodos ya que es simple, costo-efectiva, reproducible y comúnmente resulta en materiales más estables, reduce el impacto ambiental comparado con los métodos de producción fisicoquímica, si no también puede ser usada para producir grandes cantidades de nanopartículas que están libres de contaminación y tienen un tamaño y morfología bien definidas (Mittal *et al.*, 2013a).

1.7.1.1.1 Uso de extractos para la síntesis de nanopartículas

Una razón importante para la investigación de plantas, extractos o polvos obtenidos a partir de estas para la síntesis de nanopartículas es su fácil disponibilidad; sin embargo, los agentes reductores en el extracto se encuentran en mayores concentraciones que en toda la planta o polvo (Rajan *et al.*, 2015). Se

sabe que la fuente del extracto de la planta influye en las características de las nanopartículas, esto debido a que los diversos extractos contienen diferentes concentraciones y combinaciones de agentes reductores orgánicos.

Típicamente una bioreducción empleando un extracto de planta involucra la mezcla del extracto acuoso con una solución acuosa de la sal metálica, la reacción se puede dar a temperatura ambiente y es generalmente completada en pocos minutos; además de la participación de los fitoquímicos en la reacción de reducción también estabilizan las nanopartículas sintetizadas (

Figura 4. Posibles componentes químicos del extracto de planta responsables de la bioreducción de iones metálicos.

Adaptada de (Mittal *et al.*, 2013b)

). En vista de los diferentes químicos involucrados, el proceso de bioreducción es relativamente complejo (Mittal *et al.*, 2013a; Rajan *et al.*, 2015).

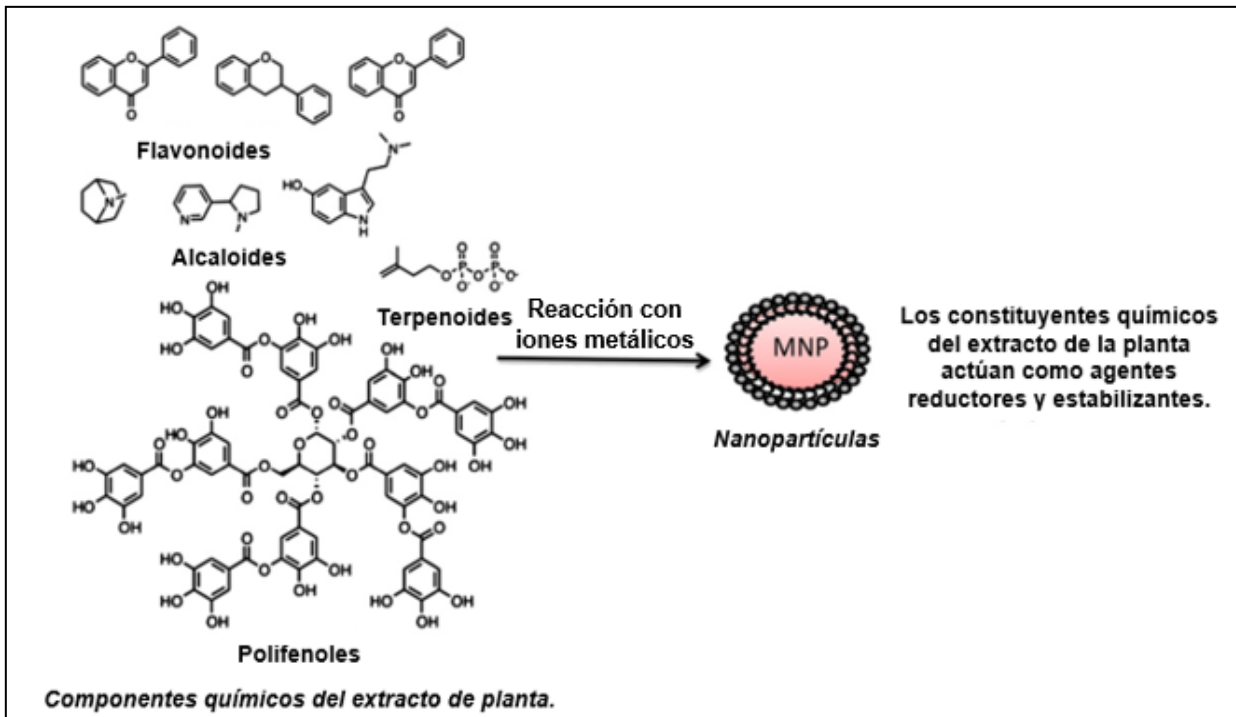


Figura 4. Posibles componentes químicos del extracto de planta responsables de la bio-reducción de iones metálicos.

Adaptada de (Mittal *et al.*, 2013b)

1.7.2 Síntesis de nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata son sintetizadas debido a las propiedades antibacteriales de la plata cero-valente y a la fácil reducción de las sales de plata (I) a plata cero-valente. Se utiliza la reducción química como el método más empleado para la preparación de nanopartículas de plata como dispersiones coloidales, estables en agua o solventes orgánicos. Los reductores usados comúnmente son borohidruro, citrato de sodio, ascorbato e hidrógeno elemental (Kharissova *et al.*, 2013).

La reducción de los iones de plata (Ag^+) en solución acuosa generalmente produce plata coloidal con diámetros de partícula de varios nanómetros, este

proceso se realiza en varias etapas. Inicialmente, la reducción de de los iones de Ag^+ permite la formación de átomos de plata (Ag^0), posteriormente se da la aglomeración en clusters oligoméricos. Estos clusters dan lugar a la formación de partículas coloidales de plata (Abou El-Nour *et al.*, 2010)

1.7.2.1 Usos y aplicaciones de nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata han sido utilizadas ampliamente como agentes antibacteriales en la industria médica, almacenamiento de alimentos, sector textil y numerosas aplicaciones ambientales. Los productos hechos con nanopartículas de plata han sido aprobados por diversas organizaciones como la FDA, EPA la SIAA de Japón (Abou El-Nour *et al.*, 2010).

El uso de las nanopartículas de plata en el sector alimentario, se encuentra en actividades agrícolas donde las AgNPs se emplean para prolongar la conservación de frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos. Estas nanopartículas pueden aplicarse junto con un recubrimiento biodegradable en los frutos, mediante la inmersión de los mismos en una solución para formar el recubrimiento (Mendez, 2009). Además de su uso en la conservación de frutos, las AgNPs también son empleadas en la fabricación de materiales en contacto con los alimentos, eliminando hasta en un 90% el crecimiento de microorganismos en los alimentos (Ávalos *et al.*, 2013), siendo una alternativa a otros métodos de conservación de alimentos que emplean la radiación o el tratamiento térmico.

1.7.2.2 Acción antimicrobiana de las nanopartículas de plata y su mecanismo de acción

Se han propuesto dos posibles mecanismos de toxicidad de las nanopartículas de plata. En el primero se basa en el tamaño de las nanopartículas de plata que al poseer una gran área superficial permite el contacto con la

bacteria, la cual puede permitir que las partículas se unan a la membrana celular y penetren fácilmente dentro de la bacteria. La segunda es el efecto de interferencia de las nanopartículas o iones de plata con la cadena respiratoria en la membrana citoplasmática de la bacteria, resultando en la muerte celular (Wong & Liu, 2010).

Al comparar la acción de los iones de plata y las nanopartículas de plata, los datos principalmente sugieren que los iones de plata reaccionan con el grupo tiol de las proteínas, produciendo la inactivación de la bacteria. A bajas concentraciones (mol/L) de las nanopartículas se presenta daño a la replicación de DNA debido al desacoplamiento del transporte de electrones a partir de la fosforilación oxidativa, lo cual inhibe a las enzimas de la cadena respiratoria o interfiere con la permeabilidad de la membrana (agregar referencia). En otro estudio realizado por Durán y colaboradores (2010), se reportó que una exposición de células de *E. coli* a nanopartículas de plata alteran la expresión de un conjunto de proteínas de choque térmico y envoltura, además de una pérdida masiva de potasio intracelular y disminución de los niveles de ATP, culminando en una pérdida de la viabilidad celular. Otro posible mecanismo es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species por sus siglas inglés) mediante las nanopartículas de plata y iones de plata (Figura 5)(Durán *et al.*, 2016).

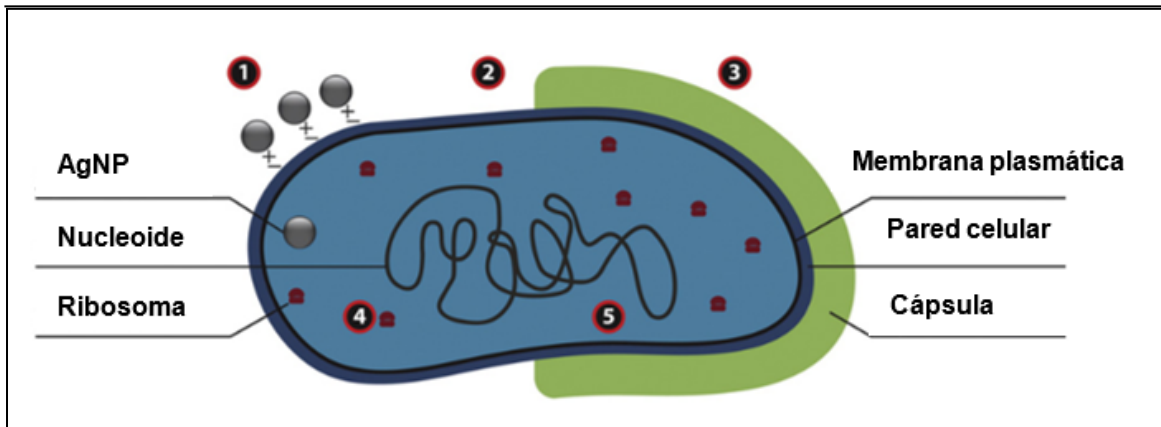


Figura 5. Mecanismo propuesto para la acción antibacteriana de las nanopartículas de plata. 1) Atracción electrostática, 2) Producción de radicales libres, cambios en la permeabilidad, alteración de la respiración, fuga del contenido intracelular, 3) Modulación de los perfiles de fosfotirosina de las proteínas, involucrados en la progresión del ciclo celular y la síntesis de polisacáridos de capsula, 4) Interacción con los grupos SH-; inhibición de la función y síntesis de proteínas, 5) Interacción con moléculas que contienen fósforo (ADN).

Adaptada de Durán *et al.*, 2016.

2. JUSTIFICACIÓN

La PP del café es un residuo generado durante el proceso de tostado y su disposición representa un problema ambiental, es por ello que es necesario encontrar alternativas para su empleo. Las nanopartículas de plata son utilizadas en el área de alimentos debido a su actividad antibacteriana. En este trabajo se propone usar extractos de piel plateada de café para la producción de nanopartículas de plata estables y con actividad antimicrobiana que pudieran ser incorporadas en empaques de alimentos.

3. HIPÓTESIS

Los compuestos reductores presentes en los extractos de la PP de café permitirán la síntesis de nanopartículas de plata estables y con capacidad antimicrobiana.

4. OBJETIVOS

4.1 General

- ✓ Obtener nanopartículas de plata mediante síntesis verde empleando extractos de piel plateada de café y caracterizarlas fisicoquímica y microbiológicamente.

4.2 Específicos

- ✓ Obtener y caracterizar químicamente los extractos de piel plateada de café.
- ✓ Sintetizar nanopartículas de plata empleando los extractos de piel plateada de café.
- ✓ Caracterizar fisicoquímicamente las nanopartículas de plata.
- ✓ Evaluar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata.

5. METODOLOGÍA

5.1 Materiales

Residuo de piel plateada de café (variedad arábica) proporcionado por la empresa La organización (Heroica Escuela Naval Militar 708, Reforma, 68050 Oaxaca, Oax). Etanol grado reactivo, ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), agar soya tripticaseina, caldo soya tripticaseina, reactivo de Folin-Ciocalteu, borohidruro de sodio, carbonato de sodio, ácido acético, acetonitrilo, ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico), DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidino-propano)), fluoresceína, ácido fórmico, buffer de fosfato potasio, trolox. Estándares de: ácido cafeíco, cafeína, ácido ferúlico, ácido vainillínico, ácido trans cinámico, kaempherol, ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido elágico, quercetina.

5.1.1 Cepas

- ✓ *E. coli* ATCC 25922
- ✓ *L. monocytogenes* ATCC 35152

5.2 Preparación de extractos

Se pesó 1 g de piel plateada de café y se añadieron 50 mL de una mezcla de solventes etanol-agua bajo condiciones de tiempo y temperatura determinadas. Se realizaron 4 tratamientos, los parámetros de extracción se muestran en

Cuadro .

Cuadro 2. Parámetros de extracción

Extracción	% Etanol/Agua	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
A	50/50	40	60
B	50/50	50	90
C	25/75	30	60
D	25/75	60	90

Las extracciones se realizaron en una parrilla de calentamiento con agitación constante (600 rpm) y la temperatura se monitoreó durante el proceso. Los extractos obtenidos se rotaevaporaron para eliminar el solvente etanólico, Posteriormente se sometieron a un proceso de liofilización y se guardaron en recipientes de plástico opacos dentro de un desecador para su posterior uso.

5.2.1 Determinación de capacidad antioxidante

5.2.1.1 Ensayo DPPH

La capacidad antioxidante se determinó empleando el método de decoloración DPPH establecido por Brand y colaboradores (Brand-Williams *et al.*, 1995) con algunas modificaciones. Se preparó una solución metanólica de DPPH 1.5×10^{-4} M. La solución de DPPH se ajustó a una absorbancia de 0.7 a 1.0 a una longitud de onda de 520 nm. Las muestras se prepararon a una concentración de 5mg/mL a partir de los extractos de piel plateada secos.

La reacción se llevó a cabo en una microplaca de 96 pozos. Para el análisis de las muestras se añadieron 20 μ L de los extractos de piel plateada de café y 200 μ L de solución de DPPH, cada muestra fue realizada por triplicado. Se preparó

una curva de calibración de 50-800 μM empleando como estándar Trolox. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Spectra Max 190 y los resultados fueron expresados en μmol equivalentes de Trolox por gramo de extracto seco.

5.2.1.2 *Ensayo ABTS*

Las mediciones de capacidad antioxidante por ABTS se realizaron a una longitud de onda de 734 nm en una microplaca de 96 pozos en un espectrofotómetro Spectra Max 190. El radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ se generó mediante la reacción de 5 mL de ABTS 7 mM con 88 μL persulfato de potasio 140 mM a temperatura ambiente (25°C) y protegida de la luz. Se tomaron 500 μL del radical y se diluyeron con 20-25 mL de etanol, la absorbancia de esta solución debe tener una absorbancia entre 0.7-1.0. Se realizó una curva de calibración de 50-800 μM de Trolox. Las muestras se prepararon a una concentración de 5mg/mL a partir de los extractos de piel plateada de café secos.

El análisis de las muestras se realizó por triplicado, para éste se tomaron 20 del extracto de piel plateada de café y 200 de $\text{ABTS}^{+\cdot}$. Los resultados se reportaron como μmoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto seco.

5.2.2 *Determinación de fenoles totales*

5.2.2.1 *Método Folin-Ciocalteu*

El contenido de fenoles totales de los extractos se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por Singleton y Rossi con algunas modificaciones (Singleton & Rossi, 1965). Las muestras se prepararon a una concentración de 5mg/mL a partir de los extractos de piel plateada secos. Se empleó una micro placa de 96 pozos en la cual se adicionaron 150 μL de reactivo de Folin (1:10), 30 μL del extracto de piel plateada de café y posteriormente 120

μL de Na_2CO_3 . Después de 2h se leyó la microplaca en un espectrofotómetro Spectra Max 190 a una longitud de onda de 765 nm. Se realizó una curva de calibración de ácido gálico de 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados se reportaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramos de extracto seco.

5.2.2.2 *Determinación de compuestos fenólicos mediante HPLC*

Para la determinación de los compuestos fenólicos se empleó un equipo HPLC/DAD Agilent 1260 Infinity. La separación se realizó a 35°C en una columna Agilent fase reversa Sorbax XDB-C18 de 4.6 x 250 mm, 5 μm de tamaño de partícula. Volumen de inyección de 20 μL y longitud de onda de 280 nm.

Las fases móviles utilizadas fueron: ácido acético 1% (A) y acetonitrilo (B) con un flujo de 1 mL/min. Las condiciones para la corrida fueron las siguientes:

Cuadro 3. Condiciones para la determinación de compuestos fenólicos por HPCL.

Tiempo (min)	Solvente B (%)
0.00	13
2.00	20
4.00	15
8.00	40
13.00	50
16.00	13

Se emplearon los siguientes estándares para la cuantificación de los compuestos: ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogénico, cafeína, ácido vainillínico, rutina, ácido elálgico, ácido cumárico, sinápico, ácido ferúlico, quercetina, ácido transcinámico y kaempherol.

5.2.2.3 Identificación de compuestos fenólicos por UPLC

Para la identificación de los compuestos fenólicos presentes en los cuatro tipos de extractos se emplearon las siguientes condiciones:

Condiciones cromatográficas

Fase móvil A: Ácido fórmico 75 mM

Fase móvil B: Acetonitrilo

Temperatura de columna: 30°C, Temperatura de muestra: 10°C

Flujo: 0.250 mL/ min

Volumen de inyección: 3 uL

Longitud de onda: 280nm

Cuadro 4. Condiciones para la determinación de compuestos fenólicos en los extractos de piel plateada de café por UPLC.

Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0.00	95	5
1.10	90	10
1.20	85	15
3.00	79	21
5.50	73	27
7.00	50	50
7.50	1	99
8.50	95	5

Método de adquisición: MSe

Modo de ionización: ESI (-)

Capilaridad: 2.0 kV
Voltaje de cono: 40 V
Temperatura de fuente: 120°C
Temperatura de desolvatación: 450°C
Cono de gas: 50
Gas de desolvatación: 800 L/h
Energía de colisión
Baja energía: 5eV
Rampa de alta energía: 10-45eV

Para la identificación de la cafeína presente en las muestras se empleó un modo de ionización ESI (+) , a continuación se muestran las condiciones bajo las cuáles se realizó el análisis.

Condiciones cromatográficas

Fase móvil A: Ácido fórmico 75 mM

Fase móvil B: Acetonitrilo

Temperatura de columna: 30°C, Temperatura de muestra: 10°C

Flujo: 0.250 mL/ min

Volumen de inyección: 3 uL

Longitud de onda: 280nm

Cuadro 2. Condiciones para la determinación de compuestos fenólicos en los extractos de piel plateada de café por UPLC.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0.00	95	5
1.10	90	10
1.20	85	15
3.00	79	21

5.50	73	27
7.00	50	50
7.50	1	99
8.50	95	5

Método de adquisición: MSe

Modo de ionización: ESI (+)

Capilaridad: 3.5 kV

Voltaje de cono: 40 V

Temperatura de fuente: 120°C

Temperatura de desolvatación: 450°C

Cono de gas: 50

Gas de desolvatación: 800 L/h

Energía de colisión

Baja energía: 5eV

Rampa de alta energía: 15-35eV

5.3 Síntesis verde de nanopartículas de plata

Para la síntesis verde de nanopartículas se empleó una solución de nitrato de plata (AgNO_3) 1 mM, que se puso en contacto con diferentes concentraciones de los 4 extractos de piel plateada y se evaluó el efecto de la temperatura, el pH y el tiempo de reacción sobre la formación de las nanopartículas de plata. La síntesis se llevó a cabo bajo un diseño experimental factorial fraccionado, el diseño se muestra en el Cuadro 3. La variable respuesta a medir fue el plasmón de superficie.

Cuadro 3. Diseño experimental para síntesis verde de las nanopartículas de plata.

N° Experimento	Extracto	pH	Tiempo (min)	T (°C)	Concentración (mg/mL)
1	B	11	60	90	5
2	A	11	60	60	1
3	B	11	60	90	5
4	D	6	60	90	1
5	A	11	60	60	1
6	D	6	60	90	1
7	A	6	30	90	5
8	C	6	60	60	5
9	A	11	60	60	1
10	D	11	30	60	5
11	D	11	30	60	5
12	C	11	30	90	1
13	B	6	30	60	1
14	B	6	30	60	1
15	C	11	30	90	1
16	C	6	60	60	5
17	B	11	60	90	5
18	C	11	30	90	1
19	B	11	60	90	5
20	A	11	60	60	1
21	B	6	30	60	1
22	D	11	30	60	5
23	C	6	60	60	5
24	D	6	60	90	1

25	D	11	30	60	5
26	A	6	30	90	5
27	D	6	60	90	1
28	B	6	30	60	1
29	C	6	60	60	5
30	C	11	30	90	1
31	A	6	30	90	5
32	A	6	30	90	5

Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min.

Posteriormente se realizó un diseño experimental para evaluar la influencia de los pH básicos en la formación de nanopartículas de plata a temperatura ambiente (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Cuadro 4. Diseño experimental para síntesis verde de las nanopartículas de plata empleando pH básicos

N°	Extracto	pH
1	D	11
2	A	11
3	D	10
4	C	10
5	B	11
6	B	10
7	A	12
8	C	11
9	A	10
10	B	11

11	B	10
12	C	12
13	A	12
14	D	12
15	A	10
16	D	12
17	C	10
18	C	12
19	A	11
20	C	11
21	B	10
22	D	11
23	D	11
24	A	12
25	B	12
26	D	12
27	A	10
28	D	10
29	C	12
30	D	10
31	B	12
32	A	11
33	B	11
34	C	11
35	C	10
36	B	12

Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min.

5.3.1 *Centrifugación de nanopartículas de plata*

Las nanopartículas obtenidas mediante síntesis verde a pH 10 fueron separadas por centrifugación a 15,000 rpm por 20 min y lavadas con agua destilada en dos ocasiones, posteriormente se secaron a 80°C por 12 h horas para su posterior caracterización (Shameli *et al.*, 2012).

5.4 *Caracterización de nanopartículas de plata*

5.4.1 *UV-Vis*

La formación de nanopartículas de plata se confirmó mediante un análisis UV-Vis con un espectrómetro Spectra Max 190 utilizándose un rango de longitudes de onda de 350-700 nm. Se emplearon microplacas de 96 pozos y para la medición se tomaron 80 µL de la muestra.

5.4.2 *Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)*

Las muestras de extracto seco y de nanopartículas de plata separadas por centrifugación se analizaron mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier y se realizó un barrido de longitudes de onda de 4000 cm⁻¹ hasta 650 cm⁻¹.

5.4.3 *Microscopia electrónica de transmisión (TEM)*

La morfología y tamaño de las nanopartículas obtenidas se examinó utilizando un microscopio electrónico de transmisión electrónica JOEL modelo JEM-1010. Los diámetros de las estructuras se obtuvieron por medio del Software

ImageJ, a partir de las micrografías obtenidas. Se consideraron 50 mediciones de las estructuras para la obtención del diámetro medio.

Para la preparación de la muestra se colocó una gota de 20 μL de la solución que contenía las nanopartículas de plata y después se sumergió la rejilla durante un minuto, se retiró la rejilla de la solución y dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente observarse al microscopio.

5.5 *Análisis de estabilidad*

Para el análisis de la estabilidad de las nanopartículas de plata obtenidas, se emplearon soluciones de 1 mg del extracto por mL de solución de nitrato de plata 1 mM a tres diferentes pH: 10, 11 y 12. Se midió como variable respuesta el plasmón de superficie por espectroscopia UV-vis, como se detalla en el apartado 6.4.1.

5.6 *Caracterización microbiológica*

5.6.1 *Lavado de cepas*

Las cepas de los diferentes microorganismos (*E. coli* y *L. monocytogenes*) se incubaron en caldo soya tripticaseína por 24 h a 37 °C, posteriormente se centrifugaron a 10000 RPM durante 5 min, el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de solución salina estéril al 8.5% y se centrifugó nuevamente a 10000 RPM por 5 min, finalmente se realizó un lavado extra.

5.6.2 *Difusión en placa (Halo de inhibición)*

En tubos conteniendo 6 mL de agar soya tripticasa (AST) fundido y atemperado a 45°C se inocularon 5 μL de los cultivos previamente lavados, se agitaron en vórtex y se vaciaron en cajas Petri estériles y se dejaron solidificar. Una vez solidificado el agar se colocaron 10 μL de las nanopartículas de plata obtenidas

por centrifugación a 6 diferentes concentraciones (200, 300, 400, 600, 800 y 1000 μg AgNPs/mL) y se incubaron a 37°C durante 24 h. El halo de inhibición se midió empleando un vernier. El control positivo utilizado fue cloranfenicol. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

5.7 Análisis estadístico

Los análisis se llevaron a cabo por triplicado y se calculó la media \pm el error estándar empleando el paquete estadístico JMP 8. Para la comparación de medias entre tratamientos se utilizó la prueba de Tukey, en el caso de las pruebas microbiológicas se realizó la prueba de Dunnet.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención de extractos

Las condiciones de extracción empleadas para la obtención de los extractos de piel plateada de café que se utilizaron en la síntesis verde de las nanopartículas de plata fueron las reportadas previamente por Costa *et al.* (2014) quienes evaluaron 100 diferentes tipos de extracciones modificando los parámetros de temperatura, polaridad del solvente, realizando mezclas etanol-agua, y tiempo de extracción encontrando las mejores condiciones para la obtención de mayores capacidades antioxidantes y mayor concentración de compuestos bioactivos. En el Cuadro 5 se muestran los resultados obtenidos por Costa *et al.* (2014).

Cuadro 5. Condiciones de extracción para la piel plateada de café y resultados previos.

Extracción	Condiciones	Resultado
A	50% A/50% E a 40°C por 60 min.	Mayor concentración de taninos y mayor actividad antioxidante FRAP
B	50% A/50% E a 50°C por 90 min.	Mayor contenido fenólico
C	25% A/ 75% E a 30°C por 60 min.	Mayor capacidad antioxidante (DPPH)
D	25% A/ 75% E a 60°C por 90min.	Mayor extracción de flavonoides

Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. A: Agua; E: Etanol

Se emplearon estas condiciones de extracción para analizar su influencia en la estabilidad, tamaño, forma, concentración y/o actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de estos extractos. Se ha reportado que la presencia de carbohidratos, terpenoides, flavonoides y ciertas proteínas pueden tener efectos reductores y estabilizantes en la síntesis de nanopartículas (Amin *et al.*, 2012) y que las condiciones de extracción (pH, tiempo, temperatura, solvente, método, etc.) afectan la cantidad y tipo de compuestos que pueden obtenerse (Bravo *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2014; Pinela *et al.*, 2016).

Después de obtener los 4 diferentes tipos de extracto éstos fueron liofilizados. Se eligió la liofilización como proceso para su conservación ya que se basa en la remoción de agua a bajas temperaturas y presiones (alto vacío) lo que presenta ciertas ventajas como lo son una pérdida mínima de compuestos químicos volátiles y compuestos termosensibles; además el transporte y almacenamiento se pueden llevar a cabo a temperatura ambiente (Bhambere *et al.*, 2015).

6.1.1 Rendimientos de extracción

Se calcularon los porcentajes de rendimiento de los extractos de piel plateada de café liofilizados y los resultados se muestran en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** El mayor rendimiento se obtuvo en el extracto B (50% agua/50% etanol a 50°C por 90 min) mientras que el menor porcentaje de rendimiento se obtuvo para el extracto A (50% A/50% E a 40°C por 60 min).

Los rendimientos obtenidos en los cuatro tipos de extracciones realizadas fueron menores a los reportados previamente por Narita e Inouye (2012), donde se obtuvieron rendimientos para los extractos liofilizados de piel plateada de café de 19 ± 1 % (p/p) para una extracción acuosa de 1 g de PP en 50 mL a 80°C por 60 min y 16 ± 1 % (p/p) para una extracción acuosa a 25°C por 60 min.

Cuadro 6. Porcentaje de rendimiento de los extractos de piel plateada de café.

Tratamiento	Rendimientos (% p/p)
A	6.38 ± 0.55 ^b
B	10.18 ± 0.55 ^a
C	8.06 ± 0.55 ^{ab}
D	7.93 ± 0.55 ^{ab}

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de tres réplicas. Se realizó comparación de medias con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$). Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min.

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran los 4 diferentes tipos de extracto de piel plateada de café obtenidos y se puede observar que poseen difente coloración. Estas diferencias pueden deberse a que al modificar las condiciones de extracción se obtienen diferentes tipos de compuestos y/o diferentes concentraciones de los mismos.

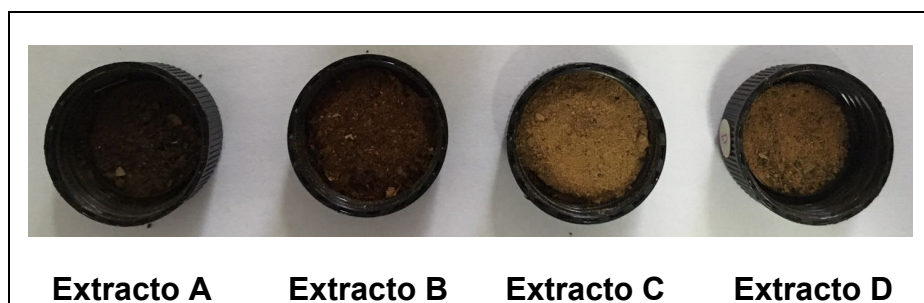


Figura 6. Extractos de piel plateada de café.

Las melanoidinas son compuestos poliméricos y coloreados que resultan como producto final de la reacción de Maillard, presentan coloración debido a los muchos enlaces de aminoácidos y grupos heterocíclicos que contienen. Las melanoidinas de bajo peso molecular son solubles en agua, lo que coincide con lo observado en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** ya que los extractos A y B son los que presentan una coloración café oscura y fueron los obtenidos a partir de las condiciones de extracción en las cuales se empleó una mayor concentración de agua.

6.2 Caracterización de extractos

6.2.1 Capacidades antioxidantes.

La capacidad antioxidante de los extractos de piel plateada de café fue medida empleando diferentes ensayos: Folin Ciocalteu, ABTS y DPPH (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Se considera que este tegumento mantiene parte de los compuesto polifenólicos que son constituyentes normales del café y además contiene melanoidinas formadas durante el proceso de tostado del café, siendo estos compuestos los responsables de conferirle capacidad antioxidante (Borrelli *et al.*, 2004).

La cantidad y tipo de compuestos extraídos a partir de plantas dependen del método de extracción empleado, su naturaleza química, el tamaño de las partículas, tiempo y temperatura de extracción, polaridad del solvente, pH, etc; por lo que pueden esperarse diferencias en composición y actividad antioxidante a partir de una misma matriz vegetal empleando diferentes condiciones de extracción (Mokrani & Madani, 2016).

En este caso no se observó ninguna diferencia estadística en la capacidad antioxidante de los extractos medida por los ensayos Folin Ciocalteu y DPPH, mientras que en el caso del ensayo ABTS se obtuvo una mayor capacidad

antioxidante para los extractos C y D y una menor capacidad para los extractos A y B (Cuadro 7).

Cuadro 7. Capacidad antioxidante de los extractos de piel plateada de café.

Extracto	Folin mg eq. Ác. Gálico/ g extracto seco de PP	ABTS µMol Trolox/ g extracto seco de PP	DPPH µMol Trolox/ g extracto seco de PP
A	40.77 ± 1.39 ^a	198.9 ± 3.5 ^a	146.9 ± 7.3 ^a
B	40.94 ± 1.29 ^a	206.6 ± 5.0 ^a	123.5 ± 19.8 ^a
C	46.93 ± 4.00 ^a	306.0 ± 20.8 ^b	96.3 ± 8.0 ^a
D	43.30 ± 2.52 ^a	265.7 ± 1.5 ^b	91.7 ± 13.4 ^a

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de tres réplicas. Se realizó comparación de medias con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$). Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min.

Los resultados de Folin son similares a los reportados por Narita e Inouye (2012) para una extracción acuosa de la piel plateada de café (PP) a 80°C a 60 min (35 mg Ác. Gálico/ g de extracto de PP) y por Mesías *et al.* (2014) que extrajeron empleado agua hirviendo y agitando 10 min a 250 RPM obteniendo valores de 31 mg de ác. gálico/ g de extracto de PP. En el caso de la capacidad antioxidante por DPPH los resultados obtenidos para los 4 extractos fueron mayores a los reportados por Narita e Inouye (2012) para los extractos acuosos de

piel plateada extraídos a 25°C y 80°C por 60 min (74 ± 13 $\mu\text{mol TE/g}$ de extracto de PP y 75 ± 18 $\mu\text{mol TE/g}$ de extracto de PP, respectivamente).

Se obtuvieron valores de capacidad antioxidante por ABTS mayores a los reportados por Mesías *et al.* (2014) para extractos de piel plateada de café Arábica (85.20 ± 1.91 $\mu\text{mol TEAC/g}$). Esto puede deberse al método de extracción empleado, en ese experimento se agitó la PP durante sólo 10 minutos a 250 RPM con agua hirviendo y factores como la temperatura y el tiempo pueden afectar la extracción de compuestos fenólicos.

Podemos observar que los mayores valores de actividad antioxidante medidas por el ensayo DDPH corresponden a los tratamientos en los cuales se empleó una mayor concentración de agua (A y B) lo que pudo influir en una mayor extracción de compuestos fenólicos ya que el agua puede presentar una mayor solvatación de los compuestos antioxidantes presentes en los extractos como resultado de las interacciones (puentes de hidrógeno) entre los sitios polares de las moléculas antioxidantes y el solvente (Boeing *et al.*, 2014).

La capacidad antioxidante de los extractos se puede correlacionar con la capacidad de estos para reducir los iones de plata y formar las nanopartículas de plata, como se observó en un experimento realizado por Jena *et al.* (2016) donde el propósito fue el de verificar el papel de los antioxidantes en la reducción de iones de Ag^+ mezclaron el extracto de la planta *Cassytha filiformis* y DPPH. Después de 20 min de incubación le añadieron una solución de nitrato de plata y no observaron el cambio a coloración café característico de la formación de las nanopartículas ni la banda propia de las nanopartículas cuando lo analizaron por espectroscopia UV-vis. Lo cual indica que el consumo de los antioxidantes para la neutralización del radical DPPH impidió que se llevara a cabo la reducción de los iones de plata debido a la falta de antioxidantes libres en la solución (Jena *et al.*, 2016).

6.2.2 Contenido de compuestos fenólicos por HPLC-DAD.

Los extractos de plantas pueden actuar como agentes reductores y estabilizantes en la síntesis de nanopartículas e influyen sobre las características de éstas ya que poseen diferentes concentraciones y combinaciones de agentes reductores orgánicos. (Mittal *et al.*, 2013b). Es por ello que es importante la determinación de los compuestos presentes en los extractos empleados.

Los extractos de piel plateada de café obtenidos fueron caracterizados mediante un análisis por HPLC con detector de arreglo de diodos. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra el cromatograma obtenido para la mezcla de estándares utilizada para detectar y cuantificar los compuestos presentes en los extractos de piel plateada de café.

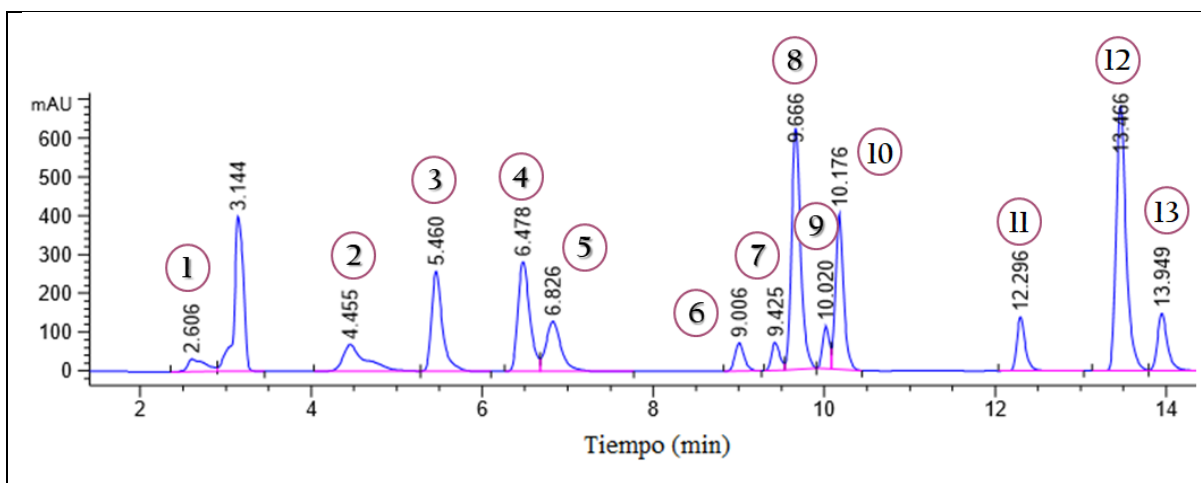


Figura 7. Cromatograma HPLC de mezcla estándares de compuestos por HPLC-DAD.

En el **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.** se listan los compuestos incluidos la mezcla de estándares para la identificación y cuantificación de los compuestos presentes en los extractos de piel plateada de café.

Cuadro 8. Estándares de compuestos analizados por HPLC

Nº Pico	Compuesto químico
---------	-------------------

1	Ácido gálico
2	Ácido protocatecuico
3	Ácido clorogénico
4	Cafeína
5	Ácido vainillínico
6	Rutina
7	Ácido elágico
8	Ácido cumárico
9	Sinápico
10	Ácido ferúlico
11	Quercetina
12	Ácido transcinámico
13	Kaempferol

De los compuestos analizados sólo se cuantificó el ácido clorogénico, y su presencia se confirmó mediante un análisis por UPLC acoplado a masas (7.2.3). Los cromatogramas de las muestras de los extractos de piel plateada café se muestran en la Figura 8. Cromatogramas de los extractos de piel plateada de café HPLC-DAD, en todas las muestras se observa el pico al tiempo de retención correspondiente al ácido clorogénico y uno más al tiempo correspondiente al ácido elágico, éste último no se cuantificó debido a que no se identificó posteriormente en el análisis UPLC-MS.

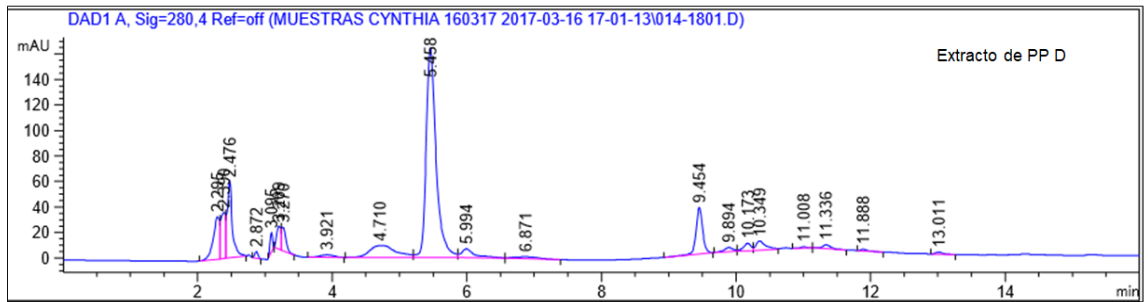
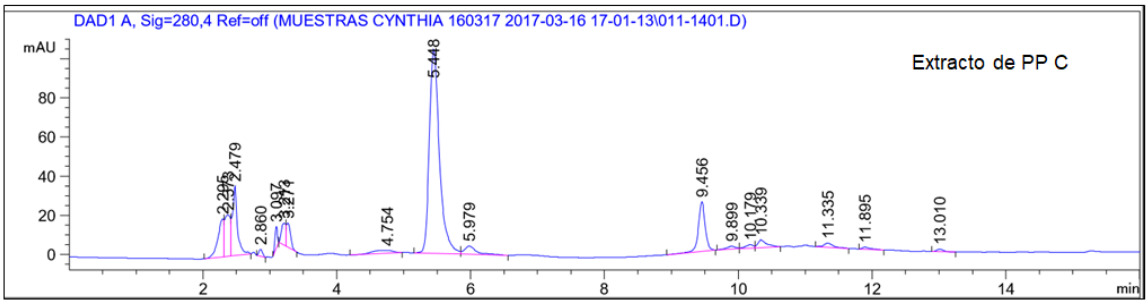
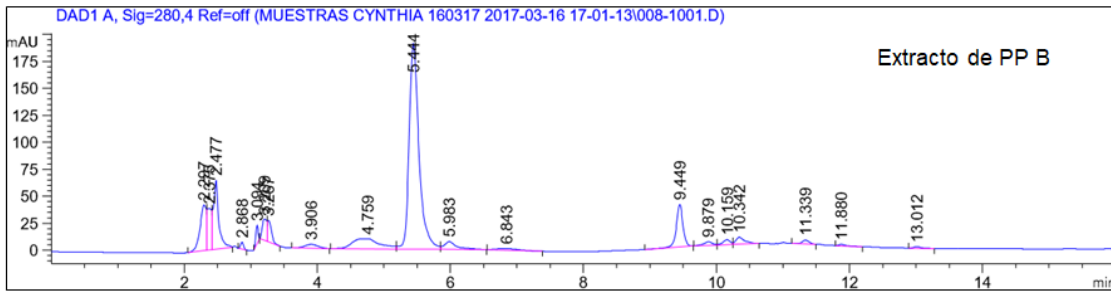
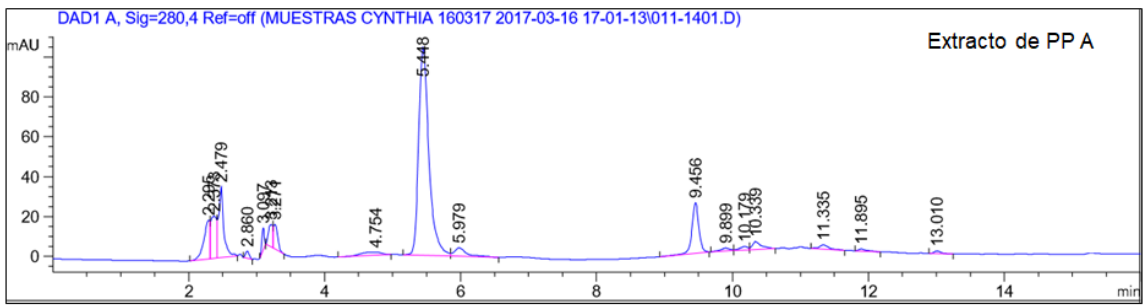


Figura 8. Cromatogramas de los extractos de piel plateada de café HPLC-DAD

En el se presentan los resultados de concentración de ácido clorogénico donde se puede observar que los extractos B y D presentaron una mayor concentración de ácido clorogénico mientras que el extracto C presentó la menor concentración.

La diferencia en concentraciones puede deberse a que las condiciones de extracción B y D presentan los mayores tiempos (90 min) y temperaturas de extracción (50 y 60°C, respectivamente) lo cual coincide con lo reportado por (Li *et al.*, 2005) donde observó que la extracción del ácido clorogénico es temperatura y tiempo dependiente.

Cuadro 11. Concentración de ácido clorogénico en los extractos de piel plateada de café.

Extracto	mg Ác. Clorogénico/ g extracto seco PP
A	21.99 ± 1.99 ^{ab}
B	27.01 ± 1.99 ^a
C	14.51 ± 1.99 ^b
D	30.59± 1.99 ^a

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de tres réplicas. Se realizó comparación de medias con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$). Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada

En el caso de la polaridad de la mezcla de solventes hay que considerar que en general los compuestos fenólicos son compuestos polares los cuales usualmente son extraídos con solventes polares y los perfiles de estos compuestos difieren dependiendo de la polaridad del solvente o mezcla de estos (Wissam *et al.*, 2012) En el se puede observar que el extracto de piel plateada C presenta la menor concentración de ácido clorogénico y éste extracto además de obtenerse empleando un tiempo y una temperatura menores (30°C y 60 min) a los empleados para los extractos B y D también utilizó la mezcla de solventes de menor polaridad (25% agua/ 75% etanol).

Los resultados obtenidos de concentración de ácido clorogénico son mayores a los obtenidos por Mesías *et al.* (2014) donde se obtuvieron 11.18 mg de ácido clorogénico por g de extracto de PP de café arábica y 68.52 mg de ácido clorogénico por g de extracto de PP de café robusta. Es importante considerar que las condiciones de extracción fueron diferentes, el tiempo de agitación fue menor (10 min) que el empleado en los cuatro tipos de extracciones realizadas en este proyecto y el solvente fue 100% agua. Como ya se había mencionado la polaridad del solvente, el tiempo y la temperatura de extracción son factores que afectarán directamente los rendimientos de extracción de los compuestos de interés, existen reportes en la literatura donde se observa que a polaridades altas como 100% agua el rendimiento de extracción es menor a los obtenidos con mezclas de agua-etanol, agua-metanol, agua-acetona (Mussatto, *et al.*, 2011; Wissam *et al.*, 2012).

En 2013 Hwa Jung y colaboradores sintetizaron nanopartículas de plata esféricas y de formas irregulares con un diámetro promedio de 19.29 ± 8.23 nm empleando ácido clorogénico como agente bioreductor (Noh *et al.*, 2013).

6.2.3 Identificación de compuestos por UPLC-MS

A continuación se presentan los resultados obtenidos del análisis mediante UPLC-MS (Cuadro 92 y Cuadro 103). Se observa que en los 4 extractos de piel

plateada de café están presentes los mismos compuestos: cafeína, ácido protocatecuico y ácido 3-o-cafeoilquinico ().

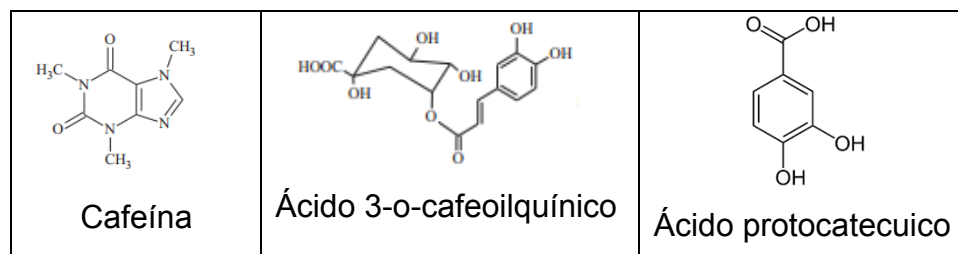


Figura 9. *Compuestos identificados en los extractos de piel plateada de café.*

Adaptado de Rodrigues & Bragagnolo (2013)

La identificación de los isómeros de los ácidos clorogénicos se realiza analizando su patrón de fragmentación. En el caso de los extractos de PP se confirmó la presencia del ácido 3-o-cafeoilquinico ya que presenta una molécula desprotonada a un valor de m/z de 353 y un pico base a un valor de m/z de 135 característico para este isómero (Cuadro 11). Los compuestos identificados coinciden con lo reportado en la literatura para bebidas de café de grano molido tostado analizadas por HPLC-DAD-MS, donde se detectaron ácidos clorogénicos, cafeína, ácido cumárico, etc. (Rodrigues & Bragagnolo, 2013).

Cuadro 92. Características espectrofotométricas del ácido clorogénico y protocatecuico de los extractos de piel plateada de café obtenidos por UPLC-DAD-MS.

Extracto de PP	Pico	TR (min)	Compuesto	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmentos (m/z)
A	1	1.5	Ácido protocatecuico	153.0177	109.02841
	2	2.1	Ácido	353.0842	191.05458; 135.04412

			clorogénico		
B	1	1.53	Ácido protocatecuico	153.0186	109.02893
	2	2.11	Ácido clorogénico	353.0862	191.05537; 135.04458
C	1	1.53	Ácido protocatecuico	153.0183	109.02888
	2	2.11	Ácido clorogénico	353.0856	191.05494; 135.04424
D	1	1.53	Ácido protocatecuico	153.0164	109.02740
	2	2.11	Ácido clorogénico	353.0814	191.05269; 135.04267

Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada

En un estudio realizado por Bresciani y colaboradores (2014) identificaron y cuantificaron 10 compuestos diferentes por UHPLC-LITMS en piel plateada de café, entre estos los ácidos 3-cafeoilquinico y el 5-cafeoilquinico como mayoritarios, ácidos feruloquinicos y cafeína, lo cual coincide con lo obtenido por UPLC-MS en nuestro estudio.

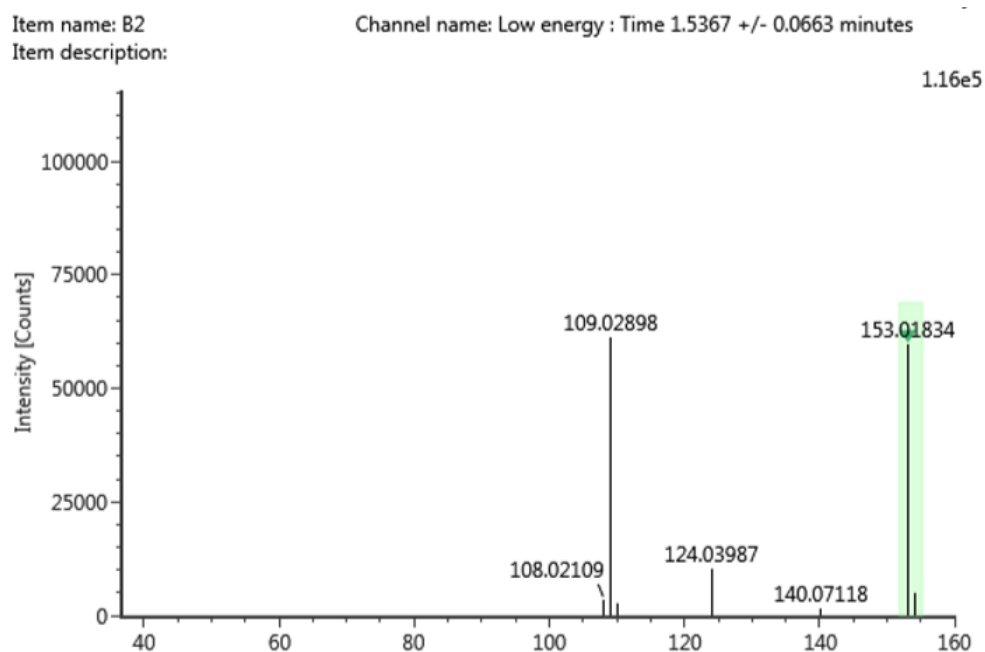
Cuadro 103. Características espectrofotométricas de la cafeína de los extractos de piel plateada de café obtenidos por UPLC-DAD-MS.

Extracto de PP	Pico	TR (min)	[M-H]⁺(m/z)	Fragmentos (m/z)
A	1	2.12	195.0814	138.06700; 110.07210; 83.06107.
B	1	2.13	195.0813	138.06698; 110.07212; 83.06110.
C	1	2.15	195.0857	138.06695; 110.07209; 83.06112.

D	1	2.15	195.0885	138.06688; 110.07203; 83.06109
----------	---	------	----------	--------------------------------

Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada

A continuación se muestran ejemplos de los espectros de masas obtenidos para las diferentes muestras de extractos de piel plateada de café analizadas por UPLC-MS (Figura 101 y Figura 112).



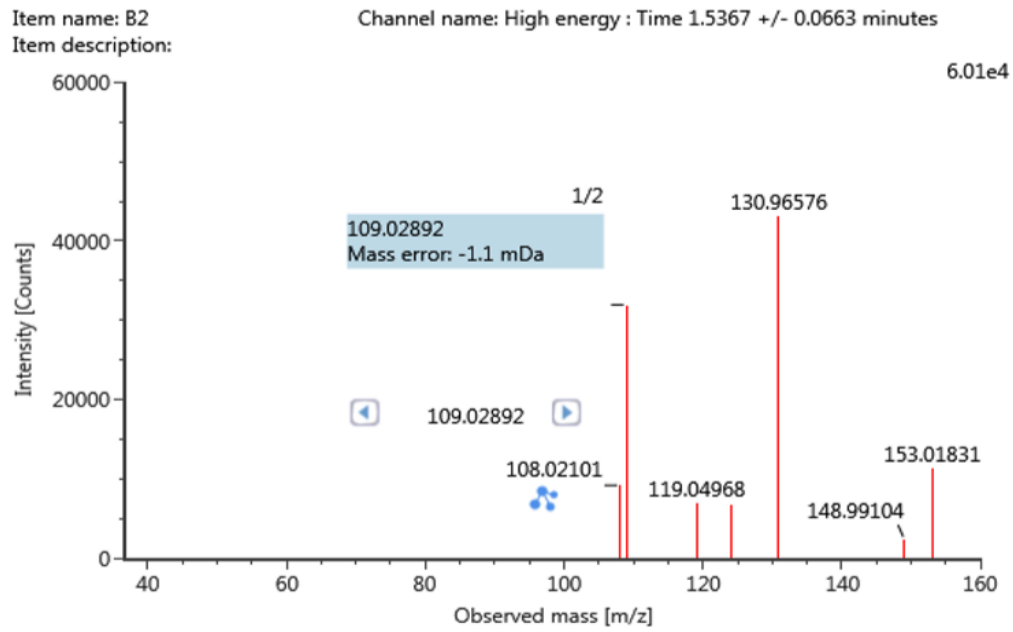
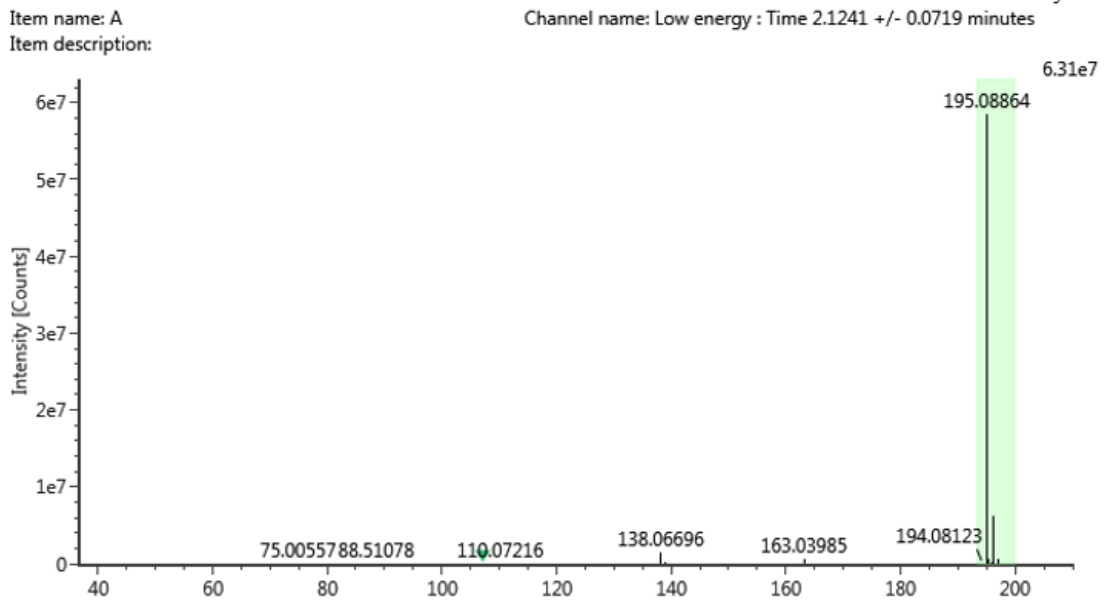


Figura 10. Espectros de masas del ácido protocatecuico.



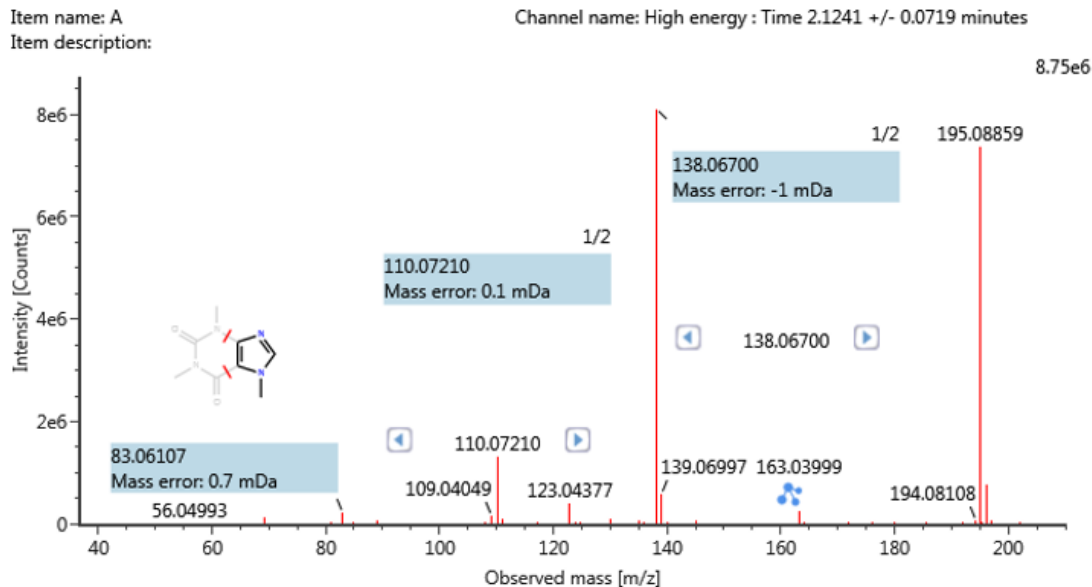


Figura 11. Espectros de masas de la cafeína

6.3 Nanopartículas de plata

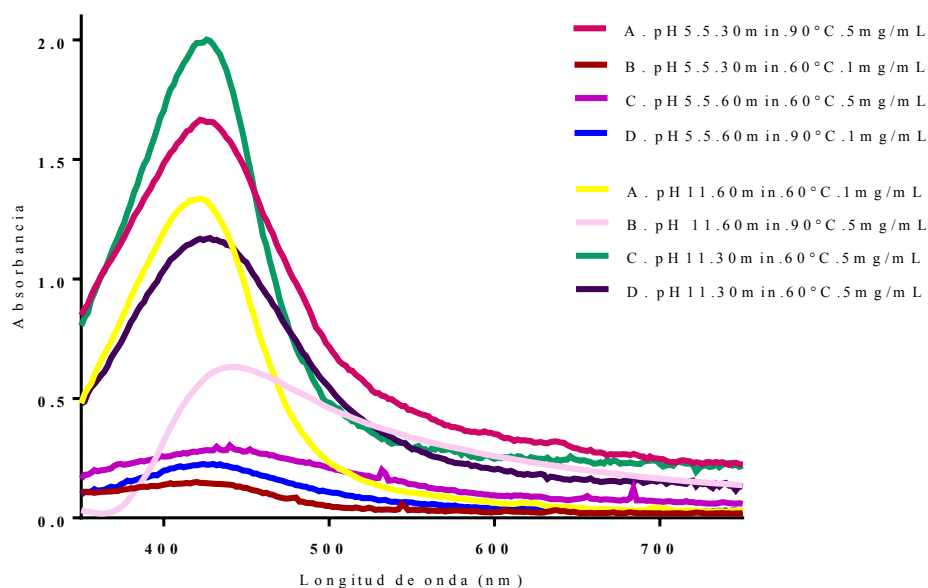
6.3.1 Síntesis de nanopartículas de plata y su análisis UV-vis.

Las nanopartículas generalmente se caracterizan mediante la determinación de su tamaño y forma ya que estas propiedades influyen en sus posibles aplicaciones. Se emplea la espectroscopia UV-Vis para detectar la formación de nanopartículas de plata ya que este tipo de materiales presentan un fenómeno característico conocido como resonancia del plasmón de superficie que se da debido al acoplamiento entre la radiación electromagnética externa que oscila en el tiempo con los electrones libres de la nanopartícula metálica. Esta propiedad depende del tipo de partícula, la forma, el tamaño, etc. En el caso de las

nanopartículas de plata la zona característica para que se presente este fenómeno es en el rango de 400-500 nm (Dhand *et al.*, 2016; Mittal *et al.*, 2013b).

Las condiciones de síntesis planteadas en el primer diseño experimental (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) fueron establecidas en base a que ya que existen reportes sobre la influencia de estos factores (temperatura, tiempo de reacción y pH) sobre la forma, tamaño y estabilidad de las nanopartículas obtenidas. Se ha reportado que a temperaturas más altas se aumenta la velocidad de conversión de los iones Ag^+ lo que se relaciona con nanopartículas más pequeñas y con un rango de distribución de tamaños más estrecho, el tiempo influye sobre la cantidad de nanopartículas sintetizadas y el pH influye sobre la velocidad de reacción y la estabilidad de las nanopartículas (Zhan *et al.*, 2011; Dwivedi & Gopal, 2010).

Los espectros de absorción de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los diferentes tipos de extractos de piel plateada de café empleando diferentes tiempos, temperaturas y pH, se muestran en la Figura 15 y el análisis de los datos obtenidos a partir de estos espectros se muestra en el Cuadro 13. Se observa que en todos los casos se obtuvo el máximo de absorbancia dentro del rango de longitudes de onda característico para las nanopartículas de plata (400-500 nm).



Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada

Figura 12. Plasmón de superficie de las nanopartículas de plata obtenidas a partir de diferentes condiciones de obtención empleando los extractos de piel plateada de café.

Además, en todos los casos se observó un cambio de coloración de amarillo pálido a café rojizo después de someter la mezcla (extracto de PP + solución de nitrato de plata 1mM) a las diferentes condiciones de reacción este cambio es característico de la formación de nanopartículas de plata (). El color que exhiben las nanopartículas de plata es debido a la excitación de todos los electrones libres en la banda de conducción lo que provoca una fase de oscilación (Prabu & Johnson, 2015).

Existen estudios que han buscado correlacionar la resonancia del plasmón de superficie con la forma y el tamaño de las nanopartículas se reporta que la

simetría de las nanoestructuras determina la forma en la que son polarizadas y que el número de formas de polarización correlaciona con el número de picos que se observan, en el caso de las nanopartículas esféricas se tiene sólo un pico debido a que una esfera pequeña puede ser polarizada solamente en un modo dipolar, esto coincide con los espectros obtenidos para las nanopartículas de plata sintetizadas y se comprobó mediante microscopía de transmisión electrónica (Ashkarran & Bayat, 2013).

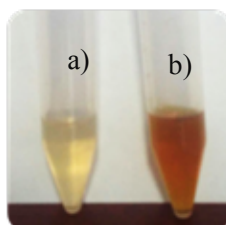


Figura 13. Cambio de coloración por la formación de nanopartículas de plata. Tubos con solución de AgNO_3 1mM adicionados con extracto de piel plateada de café: a) Tubo a temperatura ambiente; b) Tubo a temperatura ambiente a pH básico.

Se puede suponer que la presencia de compuestos fenólicos como el ácido clorogénico y el ácido protocatecuico identificados en todos los extractos obtenidos participaron en la formación de las nanopartículas de plata ya que pueden actuar como agentes reductores de los iones de Ag^+ a nanopartículas al oxidarse durante la reacción (Ajitha *et al.*, 2015). En la Figura 14 se muestra el posible mecanismo de formación de las nanopartículas de plata considerando los grupos OH presentes en la estructura de los compuestos fenólicos.

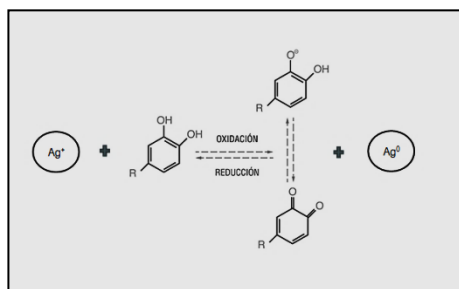


Figura 14. Posible mecanismo de formación de las nanopartículas de plata a partir de compuestos fenólicos.

Se ha correlacionado el tamaño de partícula con la longitud de onda a la cual aparece el plasmón de superficie, esto debido a que en partículas grandes se requiere una menor energía para que los electrones cambien de su posición de equilibrio porque se encuentran lo suficientemente separados, por lo tanto a menores longitudes de onda se esperan partículas de menor tamaño (Ashkarran & Bayat, 2013). En el Cuadro 13 se puede observar que las longitudes de onda a las que se observó el plasmón de superficie no presentan una variación significativa por lo que se esperarían resultados similares de tamaño.

Cuadro 11. Análisis de la formación del plasmón de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas bajo diferentes condiciones a partir de los extractos de piel plateada de café.

Extracto de P	pH	Tiempo (min)	T (°C)	Concentración (mg/mL)	λ Absorbancia máx. (nm)	Absorbancia máx.
A	5.5	30	90	5	420.67 ± 2.31 ^a	1.72 ± 0.06 ^{ab}
	11	60	60	1	421.33 ± 1.15 ^a	1.28 ± 0.05 ^{bc}
B	5.5	30	60	1	423.00 ± 4.24 ^a	0.09 ± 0.06 ^d
	11	60	90	5	436.67 ± 11.02 ^a	0.49 ± 0.19 ^d
C	5.5	60	60	5	431.33 ± 9.02 ^a	0.38 ± 0.09 ^d
	11	30	90	1	424.00 ± 2.00 ^a	1.82 ± 0.20 ^a
D	5.5	60	90	1	423.33 ± 6.11 ^a	0.40 ± 0.30 ^d
	11	30	60	5	426.00 ± 3.46 ^a	1.02 ± 0.30

Los resultados se presentan como la media ± error estándar de tres réplicas. Se realizó comparación de medias con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$). Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada. T: Temperatura

Al realizar este diseño experimental se observó que las mayores intensidades de absorbancia se obtuvieron para las nanopartículas sintetizadas a pH básico (pH=11), el incremento en la intensidad de la absorbancia puede deberse a la formación de un mayor número de partículas como resultado de la bio-reducción de los iones plata presentes en la solución (Ahmad & Sharma, 2012).

Además empleando estas condiciones de síntesis a pH básico se observó el cambio de coloración inmediatamente al realizar el cambio, por lo que se decidió realizar un nuevo experimento en el que sólo se emplearon pH básicos (pH=10, 11 y 12) para observar si existía alguna diferencia significativa en los resultados obtenidos a estos pH (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis del plasmón de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café empleando pHs básicos.

Extracto	pH	λ Absorbancia máx. (nm)	Absorbancia máx.
A	10	414.00 \pm 5.29 ^{ab}	1.57 \pm 0.54 ^a
	11	415.33 \pm 1.15 ^{ab}	1.31 \pm 0.23 ^a
	12	407.67 \pm 9.24 ^b	1.34 \pm 0.39 ^a
B	10	428.67 \pm 11.72 ^a	1.72 \pm 0.96 ^a
	11	415.33 \pm 1.15 ^{ab}	1.67 \pm 0.29 ^a
	12	418.00 \pm 3.46 ^{ab}	1.22 \pm 0.18 ^a
C	10	412.67 \pm 4.16 ^{ab}	1.37 \pm 0.21 ^a
	11	414.00 \pm 2.00 ^{ab}	1.57 \pm 0.33 ^a

	12	409.33 ± 8.33 ^b	1.78 ± 0.11 ^a
D	10	417.33 ± 3.06 ^{ab}	1.16 ± 0.32 ^a
	11	419.33 ± 3.06 ^{ab}	1.17 ± 0.29 ^a
	12	414.00 ± 0.00 ^{ab}	1.64 ± 0.29 ^a

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de tres réplicas. Se realizó comparación de medias con la prueba de TUKEY ($\alpha=0.05$). Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada

En el cuadro anterior se observa que no existe diferencia estadística significativa entre los valores de absorbancia máxima, la única diferencia se da en los valores de longitud de onda a los cuales se detectó el plasmón de superficie de la nanopartículas de plata, obteniéndose los menores valores para el pH=12, lo cual se puede correlacionar con tamaños de diámetro menores de la nanopartícula. Existen reportes en la literatura donde se establece la influencia de los pH básicos sobre la cinética de la reacción y los potenciales redox, esto conlleva a un aumento en la velocidad de reducción de los iones y a la obtención de diámetros menores (Zhan *et al.*, 2011).

Se debe de considerar que los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos que probablemente participen en la reducción del ión Ag^+ (Figura 16) se pueden encontrar desprotonados a pH básicos favoreciendo la reacción de reducción y aumentando la velocidad de reacción.

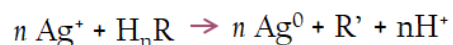


Figura 15. Reacción de reducción de los iones plata

En las figuras Figuras 17, 18 y 19 se muestran los espectros de los plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los

extractos de piel plateada de café a pH=10, pH=11 y pH =12 respectivamente y se puede observar que para todos los pHs básicos utilizados el intervalo en el cual se obtiene la máxima absorbancia está entre 414 y 420 nm por lo cual se podrían esperar tamaños similares de nanopartículas de plata. Las intensidades de absorbancia son similares entre los pH 10 y 11 y ligeramente mayores para el pH=12 en casi todos los casos, excepto para el extracto B para el cual presenta la menor intensidad a pH 12. La intensidad de absorbancia se puede correlacionar con la concentración de nanopartículas de plata y ya que todas la absorbancias se encuentran cercanas entre sí y se presenta una mayor facilidad para ajustar el pH básico a 10 se decidió continuar la caracterización fisicoquímica y microbiológica con las nanopartículas sintetizadas este pH.

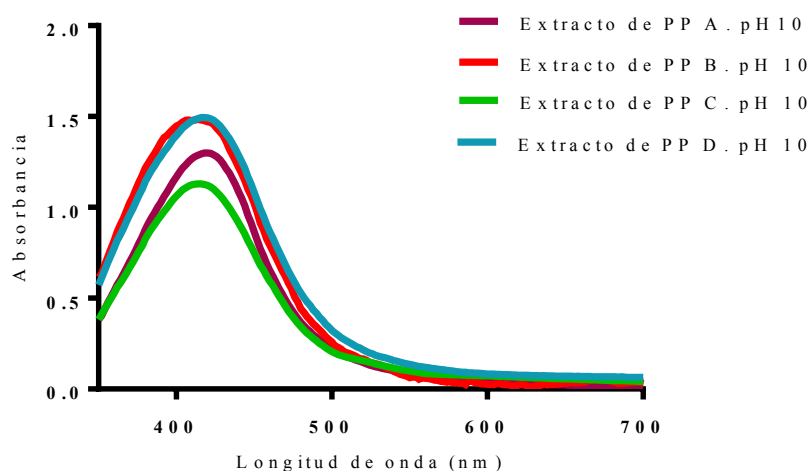


Figura 16. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los 4 diferentes extractos de piel plateada a pH 10.

Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada

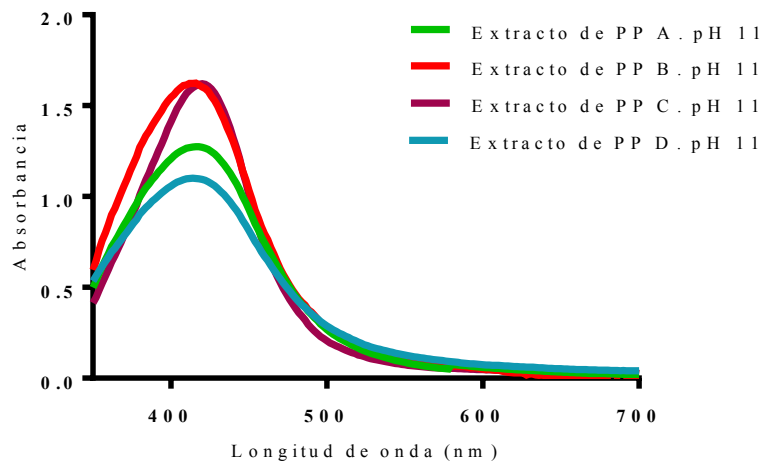


Figura 17. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los 4 diferentes extractos de piel plateada a pH 11.

Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada

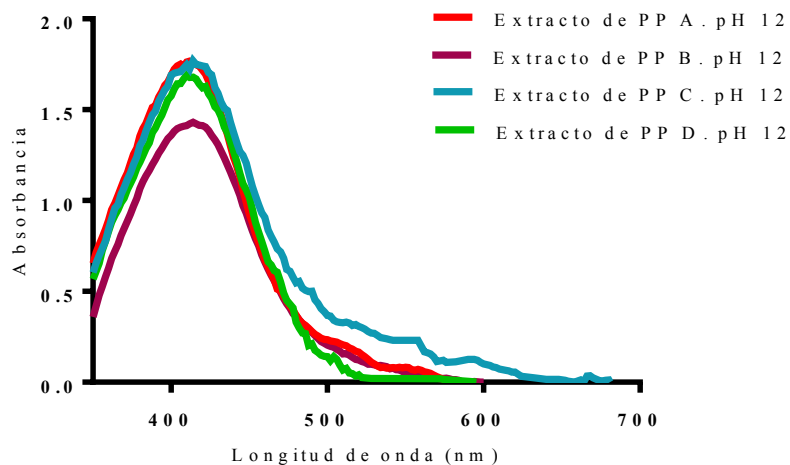


Figura 18. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los 4 diferentes extractos de piel plateada a pH 12.

Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada

6.3.2 Estabilidad de las nanopartículas de plata

Las posibles aplicaciones de las nanopartículas de plata dependen de su tamaño, forma, carga superficial, etc; por lo que la estabilidad de las nanopartículas es de suma importancia ya que sí se forman aglomerados de gran tamaño pueden perder su efectividad y limitar su uso (Wong & Liu, 2010). Es por esto que se realizó un análisis de estabilidad de las nanopartículas sintetizadas a partir de sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada a diferentes pH: 10, 11 y 12 durante 3 meses. Todas las muestras de nanopartículas de plata almacenadas a temperatura ambiente y en refrigeración presentaban la coloración café, c color característico de las nanopartículas de plata en solución.

Se monitoreo el plasmón de superficie de las muestras empleando espectroscopia UV-vis para identificar el plasmón de superficie característico de las nanopartículas de plata. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.20** se muestran los espectros de los plasmones de superficie de las nanopartículas de plata al tiempo cero, se puede observar que todos presentan un pico de absorbancia máxima dentro del rango característico para las nanopartículas de plata (400-500 nm). Posteriormente las muestras se dividieron y una mitad se colocó a temperatura ambiente y la otra en refrigeración (4°C). Se realizó el monitoreo semanal mediante el análisis UV-vis sin observarse cambios significativos, se presentan los espectros de las muestras a los 3 meses. En la Figura **19**. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de PP de café a pH básicos al tiempo 0.

Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada

21 se tienen los correspondientes al almacenamiento a temperatura ambiente y en la Figura **19**. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de PP de café a pH básicos al tiempo 0. *Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada*

22 los espectros de las muestras que estuvieron en refrigeración. No se detectaron cambios significativos en el plasmón de superficie lo cual nos permite sugerir que las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café son estables. Esto coincide con lo esperado ya que los

constituyentes químicos de los extractos no sólo favorecen la formación de las nanopartículas de plata sino que también participan como agentes estabilizantes que impiden la aglomeración de las nanopartículas (Mittal *et al.*, 2013b).

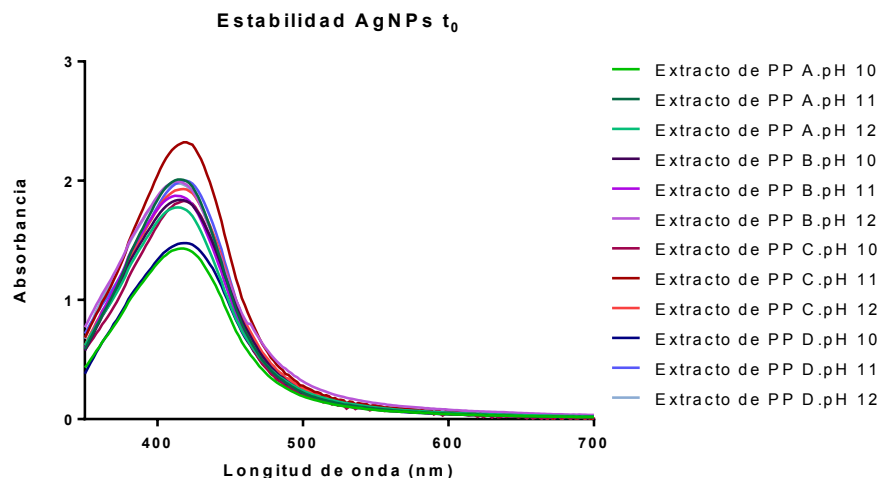


Figura 19. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de PP de café a pH básicos al tiempo 0.

Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada

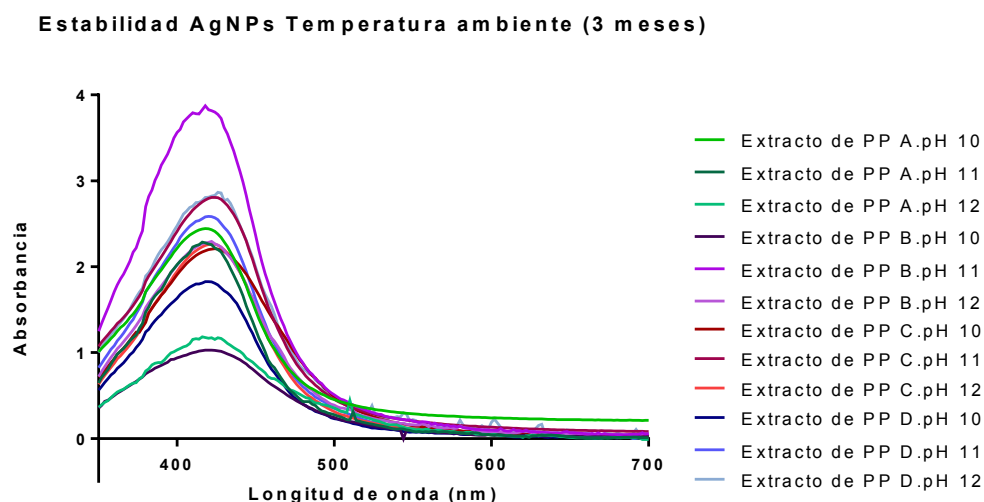


Figura 20. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café a pH básicos después de 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.

Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada

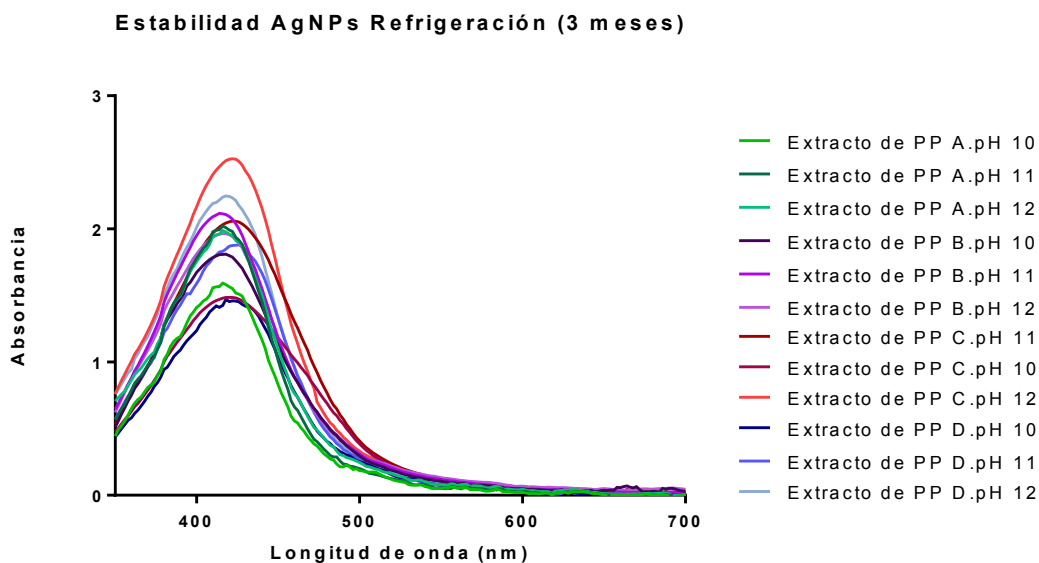


Figura 21. Plasmones de superficie de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café a pH básicos después de 3 meses de almacenamiento en refrigeración.

Tratamiento A: 50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min; Tratamiento B: 50 % agua/ 50% etanol a 50 °C x 90 min; Tratamiento C: 25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min; Tratamiento D: 25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min. PP: Piel plateada

Analizando las Figuras 20, 21 y 22 se observa que los plasmones de superficie de las muestras a temperatura ambiente y refrigeración presentan un desplazamiento hacia la derecha en la longitud de onda a la cual se observó la máxima absorbancia, 416-422 nm aproximadamente, comparados con la medición realizada al tiempo cero donde se observó en un rango de 410-416 nm, esto podría correlacionarse con tamaños de nanopartículas de plata mayores, además en el caso de las muestras a temperatura ambiente se observa un ensanchamiento en los picos esto se correlaciona con una mayor polidispersión de tamaños (Ashkarran & Bayat, 2013).

Para verificar el estado de las nanopartículas de plata se eligió una muestra de las almacenadas a temperatura ambiente durante 3 meses y se analizó mediante microscopia electrónica de transmisión con el fin de comprobar lo observado en los espectros de UV-vis. En la Figura 23 se muestra la micrografía obtenida.

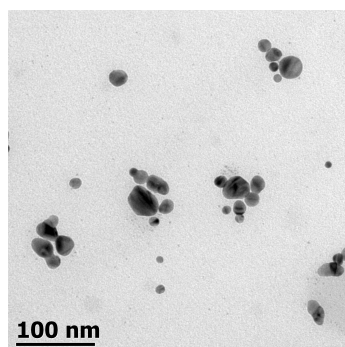


Figura 22. Imagen TEM de las nanopartículas de plata obtenidas a partir del extracto C de PP a pH=10, después de 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.

En la Figura 24 se muestra el histograma de frecuencia de tamaños de las partículas de la muestra analizada por TEM. Se pudo corroborar lo observado en los espectros ya que el ensanchamiento del pico representa la polidispersión de los tamaños y el desplazamiento a la derecha un aumento en la concentración de nanopartículas de mayor tamaño. Para el tiempo cero de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir del extracto C de piel plateada de café a pH 10 se tenía más del 60% en un tamaño de 10 nm mientras que después de tres meses la frecuencia relativa disminuyó para este tamaño y aumentó para tamaños mayores.

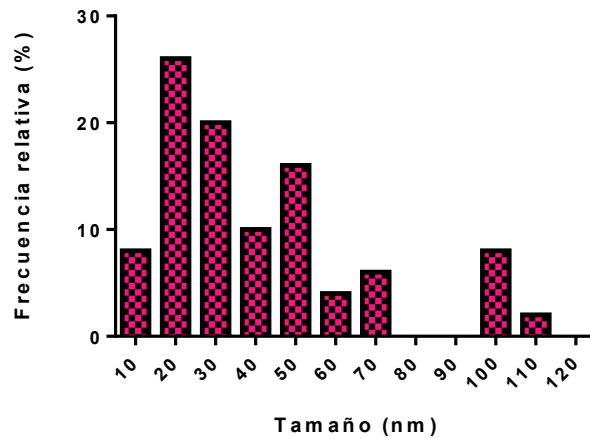


Figura 23. Histograma de distribución de tamaños de nanopartículas de plata sintetizadas a partir del extracto de piel plateada de café C después de tres meses de almacenamiento a temperatura ambiente.

Como se observa en la Figura 223 y Figura 234 la mayoría de las partículas de plata siguen presentando un tamaño menor a los 100 nm. Por lo cual se puede sugerir que las nanopartículas sintetizadas a pH básicos son estables después de tres meses de almacenamiento a temperatura ambiente, lo cual coincide con lo observado mediante espectroscopia UV-vis, donde se sigue observando el plasmón de superficie característico para este tipo de nanomaterial.

Estos resultados fueron similares a los encontrados para nanopartículas de plata en solución acuosa con un rango de tamaño entre 10-34 nm usando almidón soluble como agente reductor y estabilizante (Vigneshwaran *et al.*, 2006). También se han realizado nanopartículas de plata a partir de compuestos puros como el apiin extraído de hojas de henna estas nanopartículas fueron estables en agua por tres meses, lo cual fue atribuido a adhesión del apiin a la superficie de la nanopartícula (Iravani *et al.*, 2014).

6.3.3 Caracterización fisicoquímica

6.3.3.1 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

La microscopia electrónica de transmisión (TEM) es otra técnica comúnmente empleada para determinar la morfología de las nanopartículas, además se utilizó el Software Imagej para determinar los tamaños de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café. Las distribuciones de tamaño encontradas se presentan en un histograma de frecuencias relativas.

La caracterización de las nanopartículas de plata se continuó sólo con aquellas sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café empleando un pH= 10 ya que no se encontraron diferencias importantes entre los tres pH evaluados como se muestra en los apartados anteriores.

En la 6 se presentan las imágenes de TEM de las nanopartículas de plata sintetizadas a pH 10 a partir de los extractos de piel plateada de café A, B, C y D, respectivamente. Estas imágenes fueron tomadas de las nanopartículas en la solución original y se observa que para todos los casos la nanopartículas obtenidas son de forma esférica.

En la Figura **245** se muestran los histogramas de distribución de tamaños de las nanopartículas de plata sintetizada a partir de los extractos de piel plateada a pH 10. Como se puede observar en el caso de las nanopartículas de plata en solución para el extracto PP-A (Piel plateada de café a partir del extracto A) la mayoría de las nanopartículas se encuentran en un rango de 6-12 nm. Para el extracto de PP-B más del 50% presentan un tamaño menor a 30 nm.; La mayoría de las nanopartículas sintetizadas a partir de extracto de PP-C presentan un tamaño de 10 nm, y para el extracto D se tienen tamaños menores a 16 nm. En el caso de la síntesis verde a partir de los extracto B se obtuvieron partículas mayores a 100 nm.

La mayoría de las nanopartículas sintetizadas se encuentran con un diámetro menor a los 20 nm, tamaño similar al reportado por Dhand y colaboradores (2016) quienes sintetizaron nanopartículas de plata a partir de un extracto de la semilla de café arábica con un tamaño de 20-30 nm.

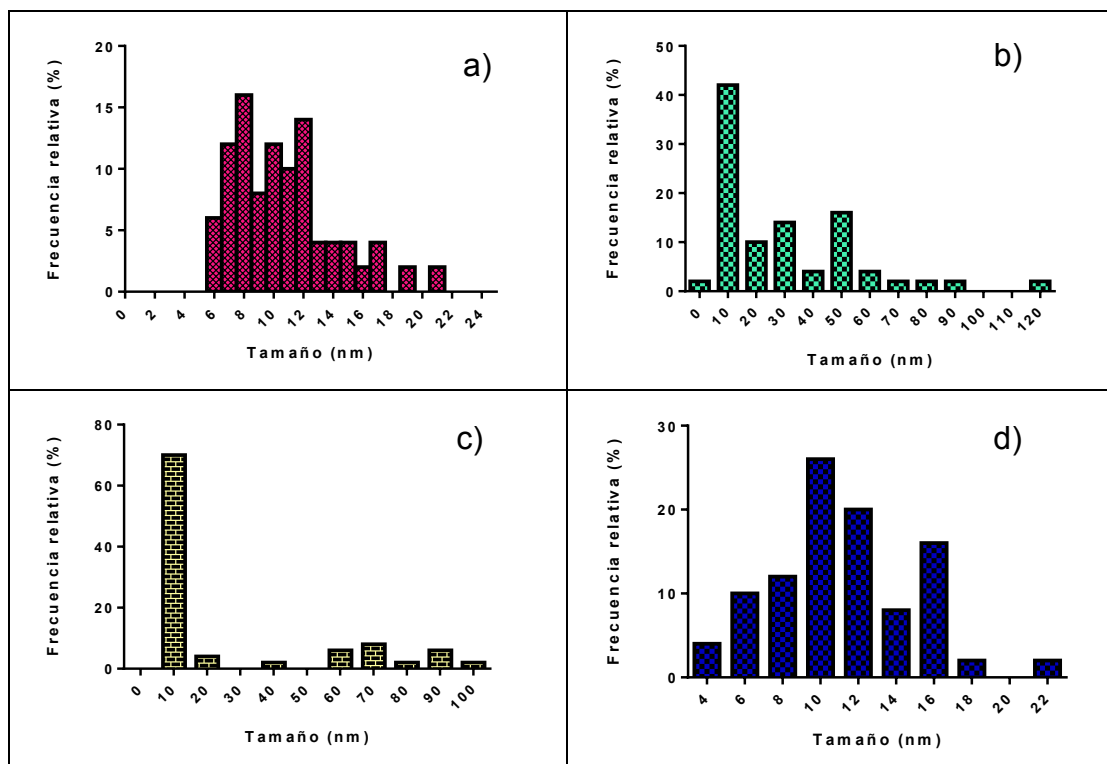


Figura 24. Histogramas de distribución de tamaños de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café a pH= 10: a) AgNPs extracto A; b) AgNPs extracto B; c) AgNPs extracto C; d) AgNPs extracto D.

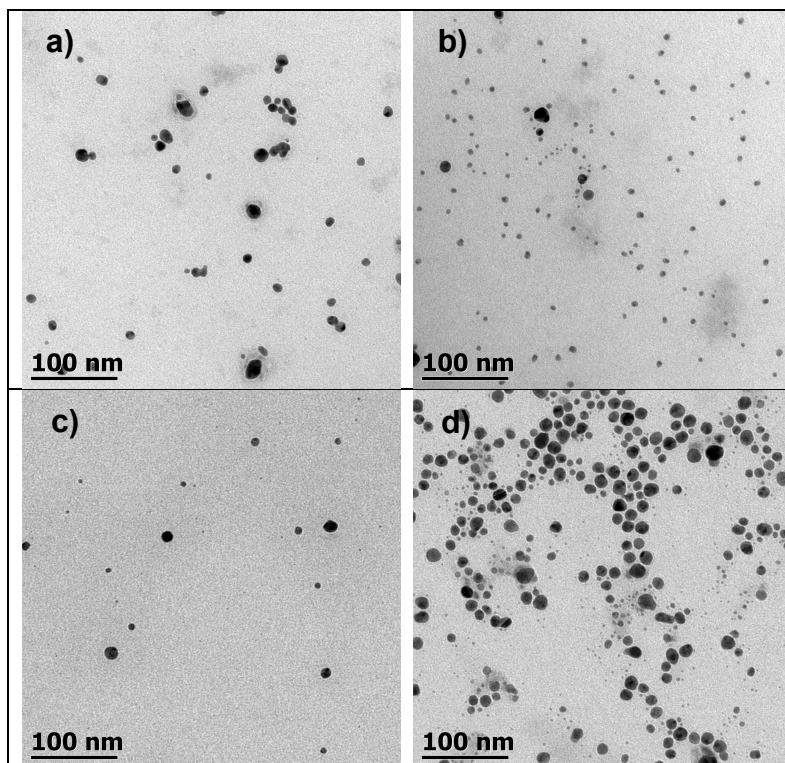


Figura 25. Imágenes TEM de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de una solución de 1mg/mL de extractos de piel plateada de café a pH=10. a) AgNPs extracto A; b) AgNPs extracto B; c) AgNPs extracto C, d) AgNPs extracto D.

En el caso de las imágenes de TEM de las nanopartículas de plata centrifugadas (Figura 267) se puede observar que se encuentran menos dispersas. En las imágenes de las AgNPs centrifugadas se observan aglomerados lo cual podría afectar el desempeño de éstas particularmente en la actividad antimicrobiana porque disminuiría su capacidad para penetrar dentro de la células (Durán *et al.*, 2016).

En las imágenes de TEM de las AgNPs centrifugadas sintetizadas a partir de los extractos A y B se observan nanopartículas triangulares; esto es importante ya que se ha reportado que las nanopartículas de forma triangular poseen una mayor actividad antimicrobiana que las esféricas contra microorganismos como *E. coli*. (Pal, Tak, & Song, 2007).

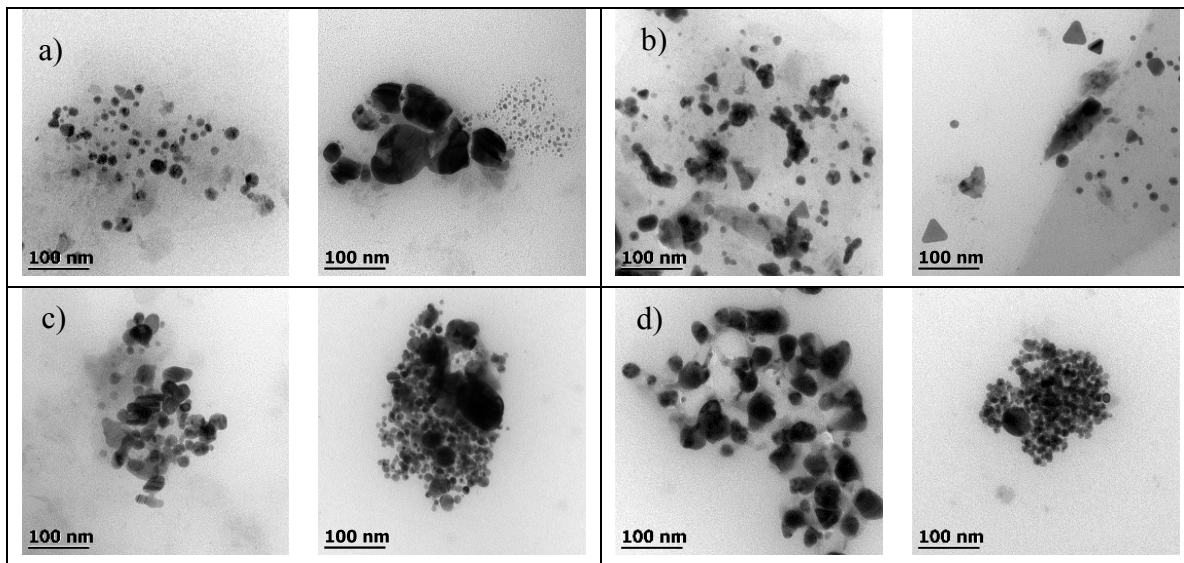


Figura 26. Imágenes de TEM de las nanopartículas de plata centrifugadas, sintetizadas a partir de extractos de piel plateada de café a pH=10: a) AgNPs extracto A; b) AgNPs extracto B; c) AgNPs extracto C, d) AgNPs extracto D.

Al analizar los histogramas de distribución de tamaños de las nanopartículas después del proceso de centrifugación (Figura 28) se puede observar que la mayoría se encuentra debajo de los 50 nm, aunque en las imágenes de TEM se presentan menos dispersas formando aglomerados que pueden alterar su utilidad.

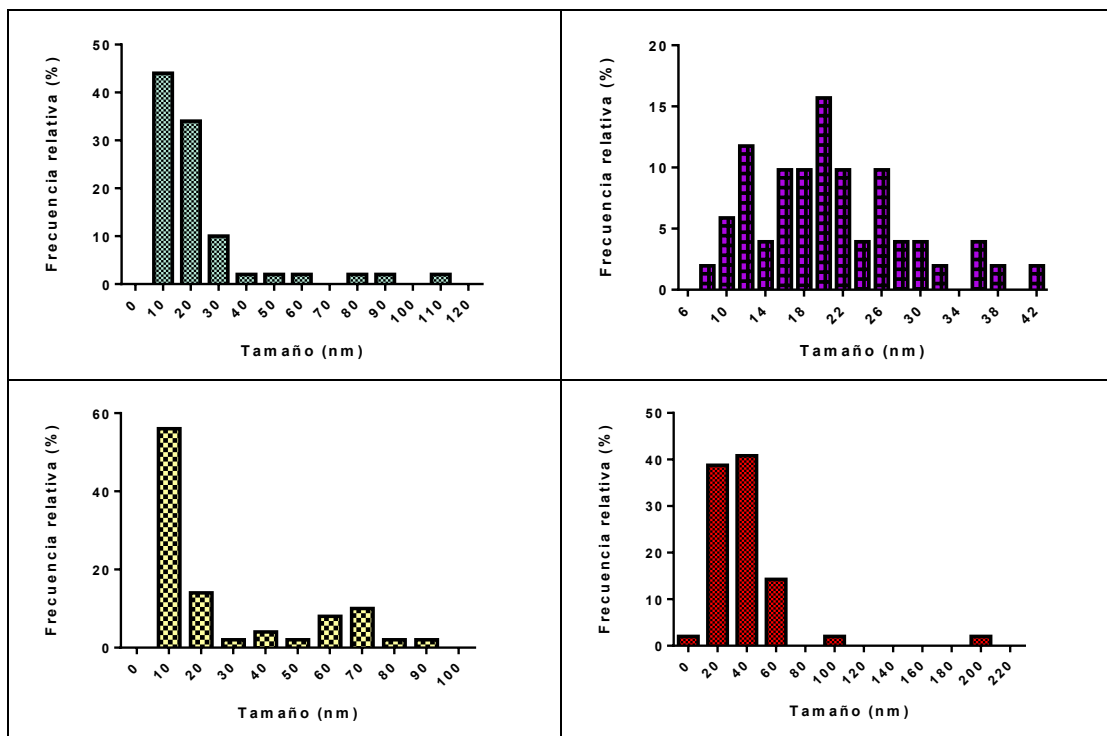


Figura 27-Histogramas de distribución de tamaños de las nanopartículas de plata centrifugadas, sintetizadas a partir de los extracto de piel plateada de café A, B, C y D a pH 10.

6.3.3.2 Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

El análisis por FTIR se realiza para identificar los posibles grupos funcionales responsables de la reducción y estabilización de las nanopartículas de plata. En el cuadro se observan los picos observados en los espectros de los extractos de PP y en las nanopartículas de plata centrifugadas.

El espectro FTIR de los extractos de piel plateada muestran 8 picos (Figura 29) . Estos pueden ser asignados a diferentes grupos funcionales como se observa en el Cuadro 15 algunos corresponde a los grupos C=C-H, C-O-H. De acuerdo a los grupos funcionales observados en la tabla se puede suponer que los compuestos que contienen grupos funcionales C=C-H o C-O-H son los responsables de la reducción de los iones Ag^+ . (Mo *et al.*, 2015). Esto coincide con lo esperado dada la composición de la piel plateada de café que contiene compuestos fenólicos y carbohidratos.

Cuadro 13. Picos observados en los espectros de los extractos de piel plateada de café y las nanopartículas de plata centrifugadas.

Posición pico (cm^{-1})	Modo de vibración	Notas
3300	Estiramiento	-OH
2920	Estiramiento asimétrico	=C-H
2850	Estiramiento	C-H
1700	Estiramiento	C-O
1639	Estiramiento simétrico	C=O/C-C/C-N/ Bandas en cafeína y ácidos aromáticos.
1609	Estiramiento	C=C
1246	Estiramiento	Cafeína
1050	Estiramiento	Tipo II Arabigalacnato

En la Figura 290 se muestran los espectros FTIR de las nanopartículas de plata obtenidas a partir de los extractos de piel plateada después del proceso de centrifugación, debe considerarse que el proceso de centrifugación y los lavados permitieron la remoción de aquellos compuestos que no se encontraban adheridos a la superficie de la nanopartícula.

Los espectros muestran los picos atribuidos a los compuestos que rodean las nanopartículas de plata (Zhan *et al.*, 2011). Además de cambios en la intensidad de las bandas correspondientes a los grupos OH y C=O que están involucrados en la reducción de los iones de plata.

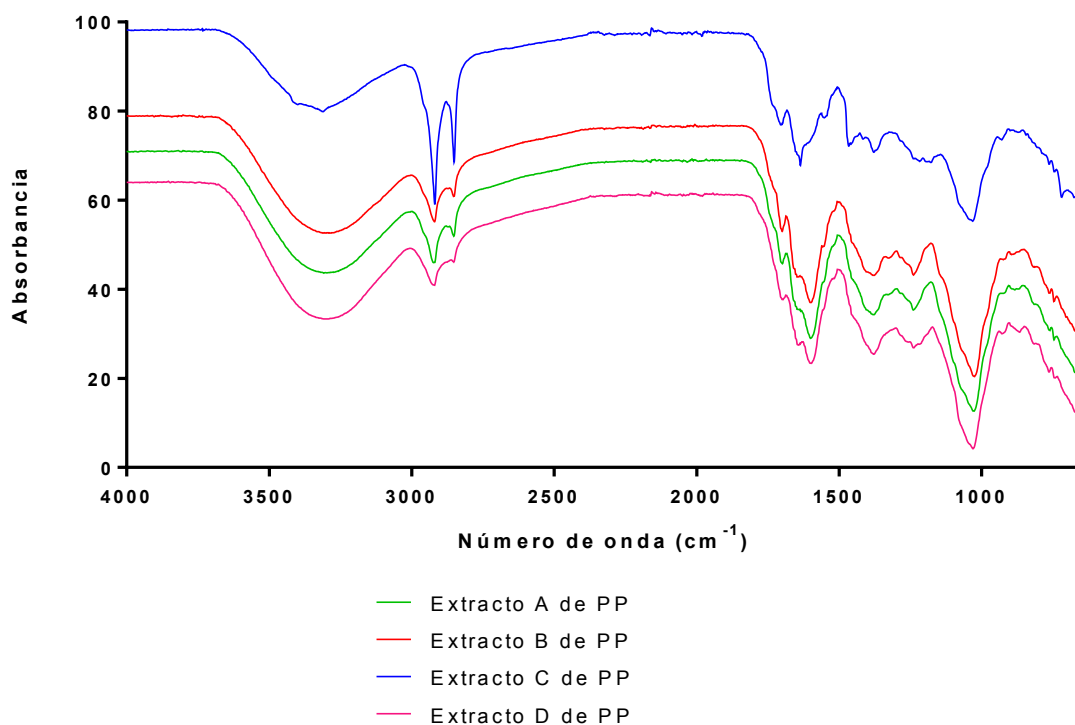


Figura 28. Espectros FTIR de los extractos de piel plateada.

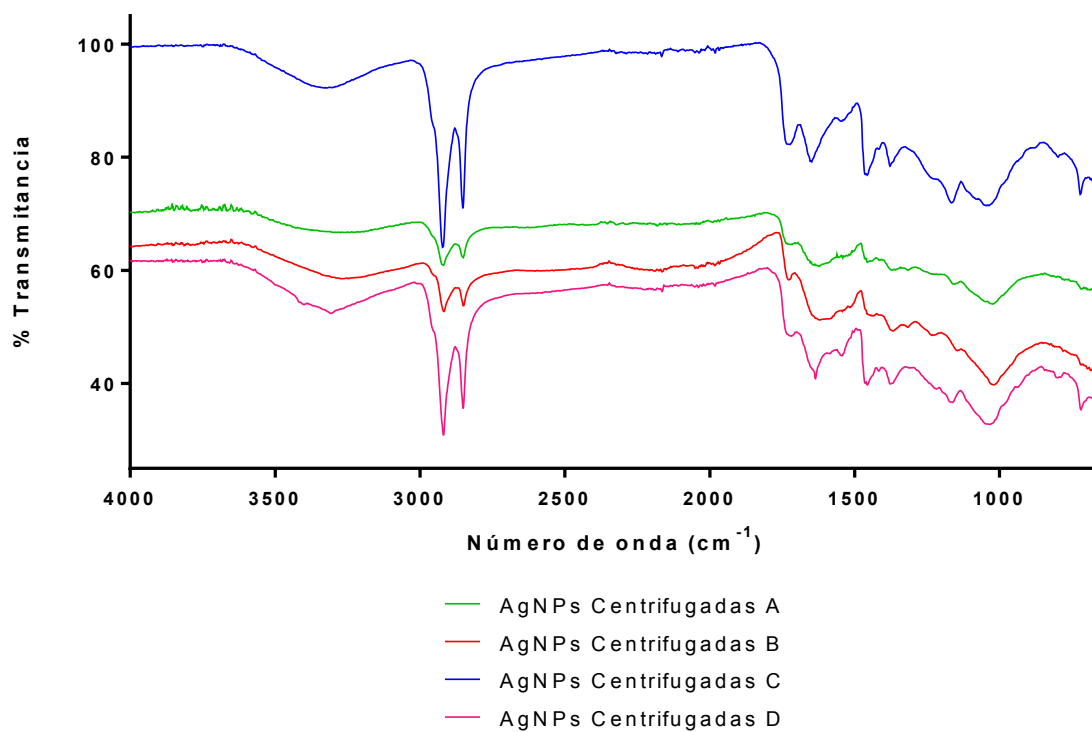


Figura 29. Espectros FTIR de las nanopartículas de plata centrifugadas sintetizadas a partir de los extractos de PP

6.3.4 Caracterización microbiológica

La resistencia de los microorganismos a antibióticos es un problema de salud emergente que ha ido incrementando y debido a los costos que esto conlleva se han enfocado diversas investigaciones al desarrollo de nuevos antimicrobianos. Las nanopartículas de plata representan una opción a esta situación ya que se ha comprobado que reducir el tamaño de partícula de los materiales es una forma eficiente de mejorar su biocompatibilidad, es por ello que se decidió evaluar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas obtenidas mediante síntesis verde a partir de los extractos de piel plateada de café (Ahmed et al., 2016).

6.3.4.1 Prueba de halo de inhibición

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata contra dos microorganismos de gran importancia debido al impacto que pueden tener en la salud pública *L. monocytogenes* y *E. coli*. En los Estados Unidos los Centros para el Control de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) estiman que 1600 personas padecen listeriosis cada año y de esas 260 mueren. Esta infección es más común en mujeres embarazadas y sus recién nacidos, adultos de 65 años o mayores y personas inmunocomprometidas. En el caso de *E. coli* puede provocar diarreas o afecciones fuera del tracto intestinal que pueden complicarse y mermar la salud del individuo (CDC, 2017).

Para el análisis se empleó como blanco agua desionizada y como control positivo cloranfenicol, el cual es un antibiótico de amplio espectro altamente efectivo contra la mayoría de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las concentraciones a evaluar fueron 200, 300, 400, 600, 800 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de las AgNPs centrifugadas por el método de difusión en agar como se describe en el punto 5.6.2. En las Figura 301 y 32 se presentan los diámetros de los halos de inhibición medidos con un Vernier y sus respectivos controles obtenidos al evaluar las diferentes

concentraciones de AgNPs contra los dos microorganismos. Todas las nanopartículas sintetizadas presentaron efecto antimicrobiano a alguna concentración contra los dos tipos de microorganismos, mientras que el blanco de agua desionizada no presentó halo de inhibición.

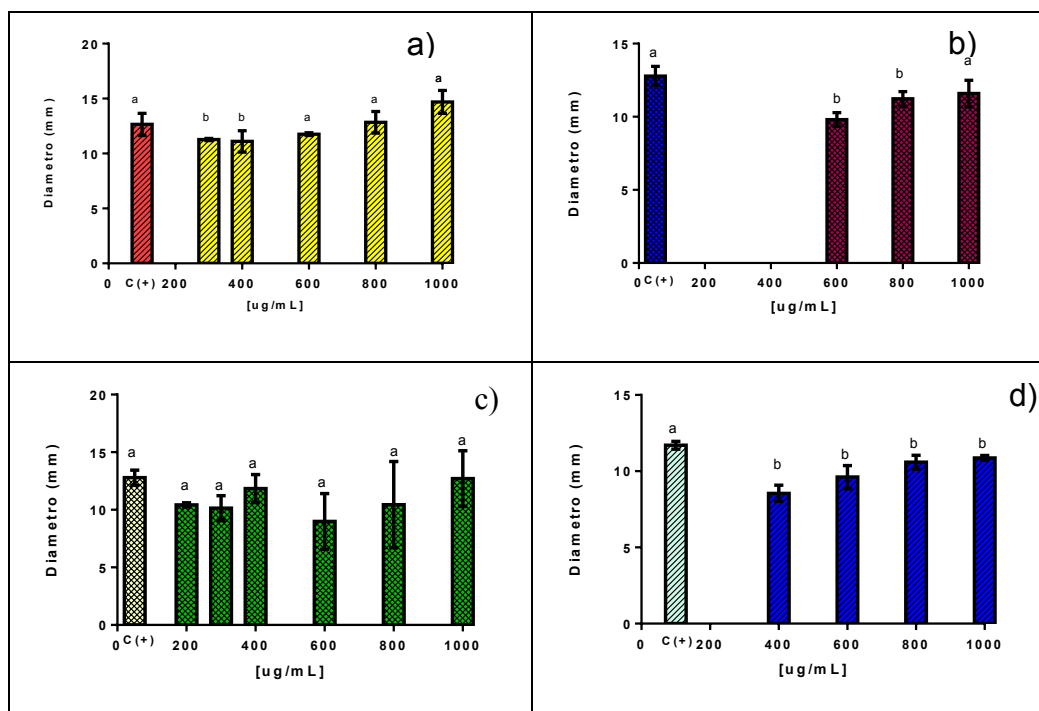


Figura 30. Diámetros de halo de inhibición de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café contra *E. coli*: a) AgNPs extracto A; b) AgNPs extracto B; c) AgNPs extracto C; d) AgNPs extracto D.

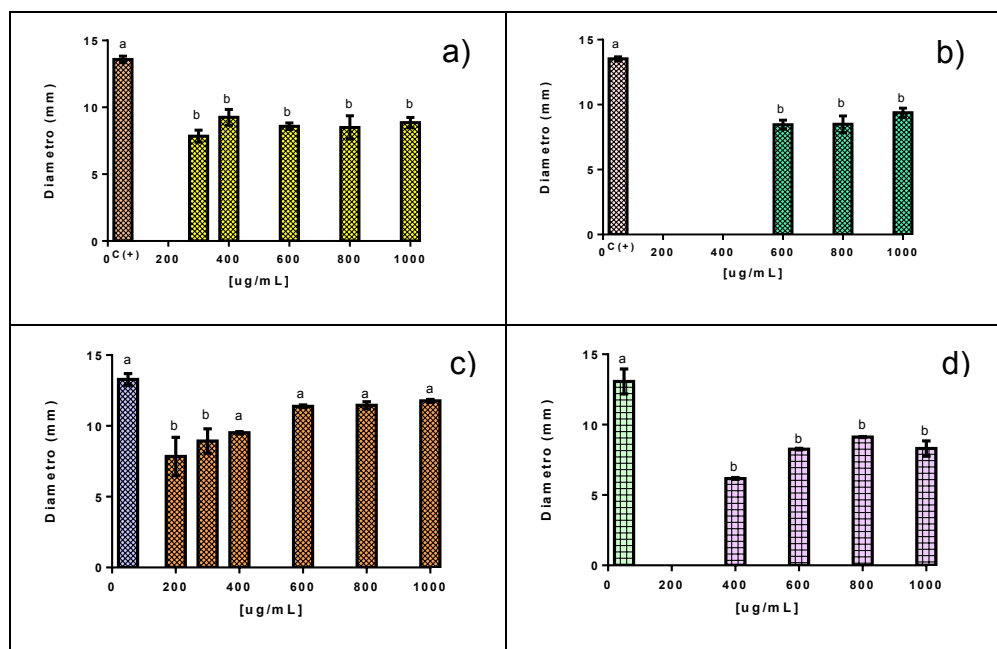


Figura 31 Diámetros de halo de inhibición de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de piel plateada de café contra *L. monocytogenes*: a) AgNPs extracto A; b) AgNPs extracto B; c) AgNPs extracto C; d) AgNPs extracto D.

Al realizar la prueba estadística de Dunnett para comparar los resultados de las nanopartículas de plata contra *E. coli* se observó que con excepción de las nanopartículas del extracto D, las demás presentaron un efecto similar al control en alguna concentración. Las nanopartículas de plata obtenidas a partir del extracto C de piel plateada fueron las que mostraron mayor eficacia, presentando un efecto similar al control en las seis concentraciones probadas. En contraste, las nanopartículas del extracto B fueron las de menor efecto antimicrobiano, ya que a las concentraciones de 200 y 400 µg/mL no se observó inhibición, y en las concentraciones restantes el efecto fue significativamente menor comparado con el control (cloramfenicol). En relación a *L. monocytogenes* sólo las nanopartículas de plata sintetizadas a partir del extracto C presentaron un efecto similar al obtenido con el control positivo. Por lo se concluye que el efecto antimicrobiano fue mayor contra la bacteria Gram negativa (*E. coli*). Se ha sugerido que la

actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata es mayor en las bacterias Gram negativas que en las bacterias Gram positivas debido a la diferencia en la composición de las membranas celulares. La pared celular de *E. coli* está compuesta de una capa delgada de peptidoglicano que consiste en cadenas de polisacáridos lineales reticuladas por péptidos cortos, por lo cual la penetración de las nanopartículas de plata es más fácil en comparación con *L. monocytogenes* que posee una capa más gruesa de peptidoglicano. Además un mayor número de iones de plata cargados positivamente quedan adheridos dentro de la pared de peptidoglicano cargada negativamente de las bacterias Gram positivas comparado con las Gram negativas (Ahmed *et al.*, 2016).

Se sugiere que la actividad antimicrobiana es debida a la liberación de cationes de plata a partir de las nanopartículas de plata que actúan como reservorios de los iones Ag (+). Se desconoce el mecanismo exacto de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata pero se asume que las nanopartículas se adhieren a la superficie de la bacteria e interactúan con los fósforos y sulfuros presentes en la membrana celular dando como resultado una interrupción del metabolismo conduciendo a la apoptosis/ lisis de la bacteria.

Analizando los resultados obtenidos podemos observar que las nanopartículas A y C presentaron actividad contra *E. coli* a concentraciones menores (300 y 200 ug/mL, respectivamente) comparadas con las otras AgNPs sintetizadas (B y D). En el caso de *L. monocytogenes* sólo se obtuvo un efecto similar al control empleando las nanopartículas de plata obtenidas mediante el extracto C. Debemos considerar que las propiedades antimicrobianas de las AgNPs dependen del tamaño, concentración, condiciones ambientales como el pH y la fuerza iónica y agente estabilizante. El tamaño, la concentración y estabilidad de las nanopartículas a su vez dependerán en el caso de los extractos de plantas de la concentración y tipo de compuestos fitoquímicos presentes en éstos (Ahmed *et al.*, 2016).

En el caso de los extractos A y C presentaron una mayor capacidad antioxidante por ABTS y DPPH respectivamente, además el extracto C presentó el mayor valor de fenoles totales analizados por Folin, y presentaron el mayor porcentaje de nanopartículas con un tamaño igual o menor a 20 nm por lo que podemos suponer que esto influyó en su actividad antimicrobiana. Existen numerosos reportes en la literatura que correlacionan los tamaños de partícula más pequeños (1-10 nm) con mayores actividades antimicrobianas debido a la facilidad de estas para penetrar dentro de la bacteria (Ahmed *et al.*, 2016; Durán *et al.*, 2016).

Existen reportes en la literatura sobre la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) para *E.coli* empleando nanopartículas de plata. Por ejemplo nanopartículas con un diámetro de 20-30 nm sintetizadas a partir de un extracto de las hojas de *Acalypha indica* tuvieron una concentración mínima inhibitoria MIC de 10 ug/mL (Krishnaraj *et al.*, 2010). En el caso de nanopartículas de plata casi esféricas con tamaños menores a los 100 nm sintetizadas a partir de un extracto de hoja de bamboo mostraron una MIC de 20 µg/mL (Yasin *et al.*, 2013). Existe un estudio en el que se evaluaron nanopartículas comerciales NanoCid® L2000 contra algunos patógenos presentes en los alimentos monitoreando el crecimiento de la bacteria a 600 nm y encontraron valores de MIC para *E. coli* de 3.12 ug/mL y para *L. monocytogenes* de 6.25 ug/mL (Zarei *et al.*, 2014). Los valores de concentraciones mínimas inhibitorias obtenidos para las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos de la piel plateada de café contra los dos microorganismos son mucho mayores (aproximadamente 10 veces) a las reportadas en la literatura esto puede atribuirse a diversos factores como lo fueron la concentración de las nanopartículas de plata, la solubilidad de éstas, la posible aglomeración de las partículas y la concentración de iones de plata (+) liberados a partir de estas.

En el caso de la solubilidad de las nanopartículas o posible aglomeración puede deberse a una falta de agente estabilizante, podría suponerse que la cantidad presente en el extracto no fue la suficiente para evitar el proceso de aglomeración. Las AgNPs puras son insolubles en agua debido a que se encuentran en su forma metálica (estado de oxidación 0), se sabe que se pueden disolver en ácido nítrico pero esto interferiría en la determinación de la actividad antimicrobiana por lo que las AgNPs se dispersaron en agua desionizada empleando un sonicador y previo a colocar la concentración correspondiente en la placa se empleó un vortex para su dispersión.

A continuación se presenta la imagen de las nanopartículas de plata dispersas en agua desionizada (Figura 32). Como se puede observar sólo en las nanopartículas sintetizadas a partir de los extracto A y C que fueron los que mostraron la mayor actividad antimicrobiana se observa el color característico de las nanopartículas de plata en solución (Joy Prabu & Johnson, 2015). Por lo tanto, se podría suponer que se tenía una concentración más baja de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los extractos B y D y debido a esto el efecto observado fue menor.



Figura 32. Nanopartículas de plata dispersas en agua desionizada [1000 ug/mL]

Si los coloides metálicos se aglomeran, sus actividades antimicrobianas son deficientes. Existen reportes de encapsulación de nanopartículas metálicas con materiales poliméricos para evitar este problema. El PVA (acetato de polivinilo) es conocido por permitir la síntesis de nanopartículas más pequeñas, más uniformes en forma y con una distribución de tamaños más estrecha (Kandasamy *et al.*, 2012).

Es por lo anteriormente discutido se puede sugerir que la estabilidad y solubilidad de las nanopartículas de plata pudo haber afectado directamente su efecto antimicrobiano, ya que los valores obtenidos para la inhibición del crecimiento antimicrobiano son mucho mayores a los reportados en la literatura. Sería necesario realizar la cuantificación de las nanopartículas de plata dispersas en el agua para poder establecer conclusiones más detalladas de los efectos antimicrobianos observados.

7. CONCLUSIONES

1. El extracto C (25 % agua/ 75% etanol a 30 °C x 60 min) presentó la mayor capacidad antioxidante por ABTS y el mayor contenido de fenoles totales analizado por Folin.
2. El extracto A (50 % agua/ 50% etanol a 40 °C x 60 min) presentó la mayor actividad antioxidante por DPPH.
3. Todos los extractos contienen ácido protocatecuico, cafeína y ácido clorogénico.
4. Se obtuvieron extractos de PP de café ricos en ácido clorogénico en un rango de 14.5-30.6 mg. Ácido clorogénico/g extracto de PP. El extracto D (25 % agua/ 75% etanol a 60 °C x 90 min) fue el que presentó la mayor concentración.
5. Todos los extractos de PP de café poseen la capacidad de sintetizar nanopartículas de plata.
6. El valor de la longitud de onda a la cual se observó el plasmon de superficie de las nanopartículas de plata sin sintetizadas corresponde al rango característico de este tipo de materiales (400-500 nm).
7. Los pH's básicos (10, 11 y 12) favorecen la rápida formación de las nanopartículas de plata
8. Las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los 4 extractos de piel plateada de café presentan formas esféricas, y en el caso de las nanopartículas sintetizadas a partir de los extractos A y B se observaron formas triangulares.
9. Más del 50 % de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los 4 extractos de PP de café y observadas mediante TEM presentan un diámetro $\leq 20\text{nm}$.
10. Las nanopartículas sintetizadas a partir del extracto C presentan el mayor porcentaje con un diámetro $\leq 10\text{nm}$.

11. El análisis FTIR muestra que los compuestos que contienen grupos funcionales C=C-H o C-OH pueden participar en la reducción de los iones Ag^+ .
12. Todas las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los 4 extractos de PP de café presentaron actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *L. monocytogenes*.
13. Las nanopartículas de plata sintetizadas a partir del extracto de PP C presentaron la mayor actividad antimicrobiana contra los dos microorganismos, ya que a una concentración de $200\mu\text{g/mL}$ se inhibió el crecimiento de ambas bacterias.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abou El-Nour, K. M. M., Eftaiha, A., Al-Warthan, A., & Ammar, R. A. A. (2010). Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(3), 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.04.008>
- Ahmad, N., & Sharma, S. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles using extracts of *Ananas comosus*. *Green and Sustainable Chemistry*, 2(04), 141.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>
- Ajitha, B., Reddy, Y. A. K., & Reddy, P. S. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Momordica charantia* leaf broth: Evaluation of their innate antimicrobial and catalytic activities. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 146(Supplement C), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.02.017>
- Amin, M., Anwar, F., Ashraf Janjua, M. R. S., Iqbal, M. A., & Rashid, U. (2012). Green Synthesis of Silver Nanoparticles through Reduction with *Solanum xanthocarpum* L. Berry Extract: Characterization, Antimicrobial and Urease Inhibitory Activities against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 9923–9941. <https://doi.org/10.3390/ijms13089923>
- Ashkarran, A. A., & Bayat, A. (2013). Surface plasmon resonance of metal nanostructures as a complementary technique for microscopic size

measurement. *International Nano Letters*, 3(1), 50.

<https://doi.org/10.1186/2228-5326-3-50>

Ávalos, a., Haza, A., & Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7(2), 1–23.

https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2013.v7.n2.43408

Baeza, G., Amigo-Benavent, M., Sarriá, B., Goya, L., Mateos, R., & Bravo, L. (2014). Green coffee hydroxycinnamic acids but not caffeine protect human HepG2 cells against oxidative stress. *Food Research International*, 62, 1038–1046. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.035>

Boeing, J. S., Barizão, É. O., e Silva, B. C., Montanher, P. F., de Cinque Almeida, V., & Visentainer, J. V. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8. <https://doi.org/10.1186/s13065-014-0048-1>

Borrelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., & Fogliano, V. (2004). Characterization of a New Potential Functional Ingredient: Coffee Silverskin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1338–1343. <https://doi.org/10.1021/jf034974x>

Bran-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol*, 28, 25–30.

Bravo, J., Monente, C., Juániz, I., De Peña, M. P., & Cid, C. (2013). Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*, 50(2), 610–616. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.026>

- Bresciani, L., Calani, L., Bruni, R., Brighenti, F., & Del Rio, D. (2014). Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. *Food Research International*, 61, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.047>
- Coman, C., Leopold, L., Rugină, O., Barbu-Tudoran, L., Leopold, N., Tofană, M., & Socaciu, C. (2014). Green synthesis of gold nanoparticles by *Allium sativum* extract and their assessment as SERS substrate. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-2158-4>
- Costa, A. S. G., Alves, R. C., Vinha, A. F., Barreira, S. V. P., Nunes, M. A., Cunha, L. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2014). Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*, 53, 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.006>
- Dhand, V., Soumya, L., Bharadwaj, S., Chakra, S., Bhatt, D., & Sreedhar, B. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.018>
- Durán, N., Durán, M., de Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J., & Nakazato, G. (2016). Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(3), 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>
- Durán, N., Marcato, P. D., Conti, R. D., Alves, O. L., Costa, F., & Brocchi, M. (2010). Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their

- toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(6), 949–959.
- Dwivedi, A. D., & Gopal, K. (2010). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 369(1–3), 27–33.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.07.020>
- Espenti, C. S., Rao, K. S. V. K., & Rao, K. M. (2016). Bio-synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* leaf extract and evaluation of its antimicrobial potential. *Materials Letters*, 174, 129–133.
<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.03.106>
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012a). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488–495.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012b). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488–495.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>
- Hečimović, I., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., & Komes, D. (2011). Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry*, 129(3), 991–1000.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.059>
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385–406.

- Iravani, Siavash. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638–2650. <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>
- Jena, S., Singh, R. K., Panigrahi, B., Suar, M., & Mandal, D. (2016). Photo-bioreduction of Ag⁺ ions towards the generation of multifunctional silver nanoparticles: Mechanistic perspective and therapeutic potential. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 164(Supplement C), 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.048>
- Jiménez-Zamora, A., Pastoriza, S., & Rufián-Henares, J. A. (2015). Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 61(1), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.031>
- Joy Prabu, H., & Johnson, I. (2015). Plant-mediated biosynthesis and characterization of silver nanoparticles by leaf extracts of *Tragia involucrata*, *Cymbopogon citronella*, *Solanum verbascifolium* and *Tylophora ovata*. *Karbala International Journal of Modern Science*, 1(4), 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2015.12.003>
- Kandasamy, K., Alikunhi, N., & Nabikhan, A. (2012). *In vitro synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by mangroves, saltmarshes and plants of coastal origin* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1504/IJBNN.2012.051222>
- Kharissova, O. V., Dias, H. V. R., Kharisov, B. I., Pérez, B. O., & Pérez, V. M. J. (2013). The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 31(4), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.003>
- Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T., & Mohan, N. (2010). Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica*

- leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.008>
- Li, H., Chen, B., & Yao, S. (2005). Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 12(4), 295–300. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.01.033>
- Machado, E. M. S., Rodriguez-Jasso, R. M., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2012). Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. *Biochemical Engineering Journal*, 60, 87–90. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.10.007>
- Mendez, M. A. A. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides*.
- Mesías, M., Navarro, M., Martínez-Saez, N., Ullate, M., del Castillo, M. D., & Morales, F. J. (2014). Antiglycative and carbonyl trapping properties of the water soluble fraction of coffee silverskin. *Food Research International*, 62, 1120–1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.058>
- Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013a). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2), 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
- Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013b). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2), 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>

- Mokrani, A., & Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, 162, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.043>
- Napolitano, A., Fogliano, V., Tafuri, A., & Ritieni, A. (2007). Natural Occurrence of Ochratoxin A and Antioxidant Activities of Green and Roasted Coffees and Corresponding Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10499–10504. <https://doi.org/10.1021/jf071959+>
- Narita, Y., & Inouye, K. (2012). High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. *Food Chemistry*, 135(3), 943–949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.078>
- Narita, Y., & Inouye, K. (2014). Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Research International*, 61, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.023>
- Noh, H. J., Kim, H.-S., Jun, S. H., Kang, Y.-H., Cho, S., & Park, Y. (2013). Biogenic Silver Nanoparticles with Chlorogenic Acid as a Bioreducing Agent. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(8), 5787–5793. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7492>
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>

- Patay, É. B., Sali, N., Kőszegi, T., Csepregi, R., Balázs, V. L., Németh, T. S., ... Papp, N. (2016). Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three *Coffea* species. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(4), 366–371. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.03.014>
- Pinela, J., Prieto, M. A., Carvalho, A. M., Barreiro, M. F., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: A nutraceutical-oriented optimization study. *Separation and Purification Technology*, 164, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.03.030>
- Pourfarzad, A., Mahdavian-Mehr, H., & Sedaghat, N. (2013). Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.001>
- Prabhu, S., & Poulouse, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(1), 1–10.
- Rajan, R., Chandran, K., Harper, S. L., Yun, S.-I., & Kalaichelvan, P. T. (2015). Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. *Industrial Crops and Products*, 70, 356–373. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.015>
- Rao, N. H., N., L., Pammi, S. V. N., Kollu, P., S., G., & P., L. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using methanolic root extracts of *Diospyros*

- paniculata and their antimicrobial activities. *Materials Science and Engineering: C*, 62, 553–557. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.072>
- Rodrigues, F., Pereira, C., Pimentel, F. B., Alves, R. C., Ferreira, M., Sarmento, B., ... Oliveira, M. B. P. P. (2015). Are coffee silverskin extracts safe for topical use? An in vitro and in vivo approach. *Industrial Crops and Products*, 63, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.014>
- Rodrigues, N. P., & Bragagnolo, N. (2013). Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MSn. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32(2), 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.09.002>
- Rotello, V. (2012). *Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology*. Springer Science & Business Media.
- Shameli, K., Ahmad, M. B., Zamanian, A., Sangpour, P., Shabanzadeh, P., Abdollahi, Y., & Zargar, M. (2012). Green biosynthesis of silver nanoparticles using Curcuma longa tuber powder. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5603–5610. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36786>
- Sharma, P., Babu, P. J., & Bora, U. (2012). Sapindus mukorossi aqueous fruit extract as reducing, capping and dispersing agents in synthesis of gold nanoparticles. *Micro & Nano Letters*, 7(12), 1296–1299. <https://doi.org/10.1049/mnl.2012.0684>
- Singh, P., Singh, H., Kim, Y. J., Mathiyalagan, R., Wang, C., & Yang, D. C. (2016). Extracellular synthesis of silver and gold nanoparticles by Sporosarcina koreensis DC4 and their biological applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 86, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.02.005>

- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144.
- Vigneshwaran, N., Nachane, R. P., Balasubramanya, R. H., & Varadarajan, P. V. (2006). A novel one-pot “green” synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydrate Research*, 341(12), 2012–2018. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.04.042>
- Wissam, Z., Ghada, B., Abdelwahed, W., & Warid, K. (2012). *Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from Pomegranate’s peel* (Vol. 4).
- Wong, K. K. Y., & Liu, X. (2010). Silver nanoparticles—the real “silver bullet” in clinical medicine? *MedChemComm*, 1(2), 125–131. <https://doi.org/10.1039/C0MD00069H>
- Yasin, S., Liu, L., & Yao, J. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles by bamboo leaves extract and their antimicrobial activity. *J Fiber Bioeng Inform*, 6(1), 77–84.
- Zarei, M., Jamnejad, A., & Khajehali, E. (2014). Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Against Four Foodborne Pathogens. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(1), e8720. <https://doi.org/10.5812/jjm.8720>
- Zhan, G., Huang, J., Lin, L., Lin, W., Emmanuel, K., & Li, Q. (2011). Synthesis of gold nanoparticles by *Cacumen Platycladi* leaf extract and its simulated solution: toward the plant-mediated biosynthetic mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(10), 4957. <https://doi.org/10.1007/s11051-011-0476-y>

International Coffee Organization (2016). The Current State of the Global Coffee Trade. Recuperado el 24 mayo de 2016 de http://www.ico.org/monthly_coffee_trade_stats.asp

International Coffee Organization (2016). Mexico Coffee Statistics Recuperado el 24 mayo de 2016 de https://infogr.am/_/3QAP9f8u9wJf92hF6jnz