



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Obtención y caracterización de
nanopartículas de oro a partir de mostos**

Autor:

De Lamo Santamaría, Beatriz

Tutor:

**María Luz Rodríguez Méndez
Cristina Medina Plaza
Departamento de Química Física y
Química Inorgánica**

Valladolid, Julio 2015.

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

Obtención y caracterización de nanopartículas de oro a partir de mostos



Valladolid, Julio del 2015.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a la Dra. María Luz Rodríguez Méndez, profesora titular de la Universidad de Valladolid, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación así como por su ayuda durante la realización del proyecto.

A Cristina Medina Plaza y a todos los compañeros de laboratorio por su ayuda y amistad durante la estancia.

Agradecer la financiación que ha hecho posible la realización de mi Trabajo Fin de Grado. A la CICYT (Grant AGL2012-33535) y a la Junta de Castilla y León (VA-032U13)

A mi madre y a Leo por todo su apoyo.



RESUMEN

En este Trabajo Fin de Grado se describe la síntesis de nanopartículas de oro empleando mostos de uvas tintas de diferentes variedades como agentes reductores.

Las nanopartículas obtenidas han sido caracterizadas utilizando diferentes técnicas. Mediante espectroscopia UV-Visible se ha estudiado tanto el comportamiento de las nanoestructuras en función del tiempo, como el efecto del volumen de agente reductor empleado para la síntesis. Por otro lado, se ha estudiado la forma, tamaño y estructura de las nanopartículas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los resultados han permitido confirmar la presencia de nanopartículas de oro de pequeño tamaño y la estabilidad de la solución coloidal en el tiempo.

Por último, se ha realizado una red de sensores capaz de discriminar y clasificar las distintas variedades y semanas de maduración de las uvas, y se han establecido correlaciones con diversos parámetros fisicoquímicos con la finalidad de emplear las nanopartículas en un sensor comercial.

Palabras clave: Nanopartículas, Oro, Mosto, Síntesis química, Sensor.

This research describes the synthesis of gold nanoparticles using musts from different varieties of red grapes as reductive agents.

The obtained nanoparticles have been characterized using different techniques. On the one hand, the behavior of nanoparticles based on the time and the effect of the reductive agent volume used for the synthesis have been studied by UV-visible spectroscopy. On the other hand, the shape, size and structure of the nanoparticles have been studied by transmission electron microscopy (TEM). The results have confirmed the presence of small gold nanoparticles and the stability of the colloidal solution through time.

Finally, a net of sensors has been created to distinguish and classify the different varieties and the number of maturation weeks of the grapes, and correlations with several physical-chemical parameters have been determined in order to use the nanoparticles for a commercial sensor.

Key words: Nanoparticles, Gold, Must, Chemical synthesis, Sensor.



ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	17
DESARROLLO	21
1. ESTADO DEL ARTE	23
1.1. INTRODUCCIÓN A LA NANOCIENCIA	23
1.2. NANOPARTICULAS METÁLICAS:	26
1.2.1. Propiedades de las nanopartículas metálicas.	27
1.2.2. Estabilidad y funcionalización de las nanopartículas.	29
1.2.3. Síntesis de nanopartículas metálicas	31
1.2.3.1. Métodos físicos	31
1.2.3.2. Métodos químicos	32
1.2.3.3. Métodos biológicos	33
1.2.4. Técnicas de caracterización de nanopartículas metálicas	34
1.2.4.1. Espectroscopía uv-vis	35
1.2.4.2. Espectroscopia raman	36
1.2.4.3. Técnica elisa	38
1.2.4.4. Microscopios electrónicos	38
1.3. SENSORES	40
1.3.1. Sensor químico	40
1.4. MOSTO	42
1.4.1. Composición del mosto	43
1.4.2. Compuestos reductores en el mosto	46
1.4.2.1. Polifenoles	46
1.4.2.2. Azúcares	48
2. MATERIALES Y EQUIPOS	49
2.1. INTRODUCCIÓN	49

2.2. MATERIAL UTILIZADO	49
2.3. EQUIPOS	49
2.4. MUESTRAS.....	50
2.5. REACTIVOS	50
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	52
3.1. SÍNTESIS DE NANOESTRUCTURAS.....	52
3.1.1. Disoluciones patrón.....	52
3.1.2. Mostos	54
3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	55
3.2.1. Espectrofotómetro UV-Visible	55
3.2.2. Espectrofotómetro Elisa	55
3.2.3. Microscopio electrónico de transmisión	57
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	58
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.1. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS PATRONES	59
4.2. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS DISTINTAS VARIEDADES DE MOSTO	63
4.2.1. Caracterización óptica.....	63
4.2.2. Cinética de reacción y estabilidad.....	71
4.2.3. Resultados microscopio electrónico de transmisión.	82
4.2.4. Análisis estadístico	86
4.3. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS SECUENCIALES.....	91
4.3.1. Caracterización óptica	91
4.3.2. Análisis estadístico	93
4.4. DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE DISPOSITIVO DE ANÁLISIS PRE- COMPETITIVO	97
4.5. POSIBLE APLICACIÓN FUTURA.....	100

CONCLUSIONES	101
BIBLIOGRAFÍA	105
ANEXOS	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volúmenes empleados para la síntesis de nanopartículas de oro (patrones)	53
Tabla 2. Volúmenes empleados para la síntesis de nanopartículas de oro (mostos)	54
Tabla 3. Procedimiento para la placa Elisa.	56
Tabla 4. Resultado de los patrones elegidos	60
Tabla 5. Nanopartículas de oro obtenidas con las distintas variedades de mosto.....	70
Tabla 6. Datos del análisis químico (variedades de uva)	90
Tabla 7. Parámetros de la regresión PLS (variedades de uva)	90
Tabla 8. Datos del análisis químico (secuencial Tempranillo)	96
Tabla 9. Parámetros de la regresión PLS(secuencial Tempranillo)	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escala de tamaños.....	23
Figura 2. Aplicaciones de la nanotecnología.....	24
Figura 3. Copa romana de Lycurgo, con nanopartículas de oro y plata muestra un color diferente dependiendo de si la luz pasa o no a través de ella.....	26
Figura 4. Evolución de los estados electrónicos, desde el átomo aislado hasta el bulk	28
Figura 5. Efecto de Resonancia del Plasmón Superficial.	29
Figura 6. Formación de nanopartículas.....	30
Figura 7. Representación de un nanocluster de oro funcionalizado	30
Figura 8. Técnicas de síntesis de nanomateriales	31
Figura 9. Proceso de formación de nanopartículas metálicas	34
Figura 10. Modelo de átomos unidos por un muelle (Raman).....	36
Figura 11. Diagrama de nivel de energía mostrando los estados implicados en la señal de Raman	37
Figura12. Esquema del funcionamiento de un sensor.	40
Figura13. Sensor Químico	41
Figura 14. Estructura de la uva.....	43
Figura 15. Polifenoles del vino.....	47
Figura 16. Espectroscopio ultravioleta-visible	55
Figura 17. Espectrofotómetro Elisa.	56

Figura 18. Microscopio TEM Jeol Jem-2200 (izquierda) y JeolJem- 1011 (derecha).....	57
Figura 19. Espectro UV-Visibles del ácido cítrico.	60
Figura 20. Espectro UV-Visibles del ácido tánico	61
Figura 21. Espectro UV-Visibles del ácido gálico.....	61
Figura 22.Nanopartículas de oro obtenidas con la variedad Garnacha en distintas proporciones.....	63
Figura 23.Nanopartículas de oro obtenidas con la variedad Tempranillo en distintas proporciones.....	63
Figura 24.Nanopartículas de oro obtenidas con la variedad Ruffete en distintas proporciones.....	64
Figura 25. Nanopartículas de oro obtenidas con la variedad Prieto Picudo en distintas proporciones.....	64
Figura 26. Espectro electromagnético ultravioleta-visible.	65
Figura 27.Espectro UV-Visible de a) Mezclas de Au ³⁺ y mosto de la variedad Prieto Picudo mezclado en proporciones 10-100% b) Mosto de la variedad Tempranillo diluido en las mismas proporciones.....	66
Figura 28 Espectro UV-Visible resultante de la resta de los espectros anteriores.....	66
Figura 29. Longitud de onda frente al tiempo de las nanopartículas obtenidas con la variedad Tempranillo en distintas proporciones.....	67
Figura 30. Absorbancia frente al tiempo de las nanopartículas obtenidas con la variedad Tempranillo en distintas proporciones.....	67

Figura 31. Espectro UV-Visible de a) Mezclas de Au ³⁺ y mosto de la variedad Prieto Picudo mezclado en proporciones 10-100% b) Mosto de la variedad Prieto Picudo diluido en las mismas proporciones.....	68
Figura 32. Espectro UV-Visible resultante de la resta de los espectros anteriores.....	68
Figura 33. Longitud de onda frente al tiempo de las nanopartículas obtenidas con la variedad Prieto Picudo en distintas proporciones.....	69
Figura 34. Absorbancia frente al tiempo de las nanopartículas obtenidas con la variedad Prieto Picudo en distintas proporciones.....	69
Figura 35. Plasmones de las distintas variedades con el 50% de mosto en la solución.....	70
Figura 36. Relación entre la longitud de onda de las distintas variedades con el 50% de mosto en la solución.....	71
Figura 37. Espectro UV-visible de las cinéticas de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Prieto Picudo.....	72
Figura 38. Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Prieto Picudo.....	73
Figura 39. Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Prieto Picudo.....	74
Figura 40. Espectro UV-visible de las cinéticas de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 10% de mosto de la variedad Tempranillo.	75

Figura 41. Espectro UV-visible de las cinéticas de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Tempranillo 76

Figura 42. Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 10% de mosto de la variedad Tempranillo..... 77

Figura 43. Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto de la variedad Tempranillo..... 77

Figura 44. Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 90% de mosto de la variedad Tempranillo..... 78

Figura 45. Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 10% de mosto de la variedad Tempranillo..... 79

Figura 46. Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto de la variedad Tempranillo..... 79

Figura 47. Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 90% de mosto de la variedad Tempranillo..... 80

Figura 48. Pendiente de estabilización de la absorbancia de las nanopartículas sintetizadas con distintas variedades de mosto..... 81

Figura 49. Micrografía de las AuNP's con un 50% de mosto tempranillo (derecha) y un 90% de mosto tempranillo (izquierda) tomadas con el microscopio Jeol Jem- 1011HR a 80Kv a 500000X..... 82

Figura 50. Micrografía de las AuNP's con un 50% de mosto tempranillo (derecha) y un 90% de mosto tempranillo (izquierda) tomadas con el microscopio Jeol Jem- 1011HR a 80Kv a 200000X..... 83

Figura 51. Micrografía de las AuNP's con un 50% de mosto tempranillo tomadas con el microscopio Jeol Jem-FS2200 HRP a 200Kv a 200000X.	83
Figura 52. a) micrografía de la rejilla de carbono. b) micrografía de la rejilla de carbono con Las AuNP's con un 50% de mosto tempranillo tomadas con el microscopio Jeol Jem-FS2200 HRP a 200Kv a 300000X	84
Figura 53. Método kernel	87
Figura 54. PCA (score) en 3D obtenido a partir de los datos obtenidos de los volúmenes 500µl y 100 µl	87
Figura 55. PCA (score) en 2D obtenido a partir de los datos obtenidos de los volúmenes 500µl y 100 µl	88
Figura 56. PCA (loading) obtenido a partir de los datos obtenidos de los volúmenes 500µl y 100 µl	89
Figura 57: NPs sintetizadas con mosto tempranillo de la segunda semana de cosecha.....	91
Figura 58. NPs sintetizadas con mosto tempranillo de la tercera semana de cosecha.....	91
Figura 59. Espectro UV-visible de AuNp's con un 10% de mosto en la reacción (Tempranillo).....	92
Figura 60. Espectro UV-visible de AuNp's con un 50% de mosto en la reacción (Tempranillo).....	92
Figura 61. Espectro UV-visible de AuNp's con un 90% de mosto en la reacción (Tempranillo).....	93
Figura 62. PCA (score) en 3D obtenido a partir de los datos obtenidos de los volúmenes 500µl y 100 µl	94

Figura 63. PCA (score) en 2D obtenido a partir de los datos obtenidos de los volúmenes 500µl y 100 µl.....	94
Figura 64. PCA (loading) obtenido a partir de los datos obtenidos de los volúmenes 500µl y 100 µl.....	95
Figura 65. Nanopartículas sintetizadas (en el momento) sobre la placa Elisa con sus respectivos mostos.....	97
Figura 66. Comparación de las nanopartículas sintetizadas en el momento (superior) y pasados dos días (inferior).	98
Figura 67. Absorbancia frente al tiempo de las nanopartículas al 50% obtenidas mediante el espectrofotómetro Elisa	99
Figura 68. Absorbancia frente al tiempo de las nanopartículas sintetizadas al 90% obtenidas mediante el espectrofotómetro Elisa.....	99



OBJETIVOS

La presente memoria, presentada como Proyecto Fin de Grado, se encuadra en la línea de investigación del grupo de sensores UvaSens perteneciente al departamento de Química Física y Química inorgánica de la Universidad de Valladolid. Este departamento, formado por un equipo multidisciplinar en el que trabajan científicos de diferentes ramas de la ciencia, mantiene abiertas varias líneas de investigación dirigidas al desarrollo y diseño de sistemas de análisis sensorial.

Objetivo general

Los compuestos químicos reductores en forma de polifenoles son abundantes en los mostos y juegan un papel importante por su contribución en los atributos sensoriales de éste. Por lo tanto, definir el momento en el cual la uva ha llegado a su madurez fenólica es uno de los objetivos principales perseguidos por muchos científicos. Es por ello, que en este proyecto la investigación ha sido orientada a la aplicación de las nanopartículas de oro, obtenidas mediante reducción química, a un sensor capaz de analizar el contenido de agentes reductores de los mostos.

Este objetivo principal se perseguirá a través de los siguientes objetivos específicos.

Objetivos específicos

1. Sintetizar nanopartículas de oro utilizando mostos preparados a partir de diferentes variedades de uva.
2. Evaluar las propiedades ópticas y la estabilidad en el tiempo de las soluciones coloidales de nanopartículas de oro obtenidas mediante espectroscopia Ultravioleta-Visible.
3. Realizar una caracterización morfológica y estructural de las nanopartículas mediante microscopía electrónica de transmisión.
4. Estudiar la posible incorporación de las nanopartículas de oro en sensores que sean capaces de determinar el grado polifenólico de las distintas variedades de mosto y/o hacer el seguimiento de la maduración de la uva.



DESARROLLO

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. INTRODUCCIÓN A LA NANOCIENCIA

La nanociencia es la disciplina dedicada a obtener, manipular y estudiar las propiedades de los materiales con dimensiones del orden de una millonésima parte de metro (10^{-9}m) (Figura 1).

El desarrollo e interés en este campo comenzó en 1959 cuando Richard Feynman pronunció su famoso discurso titulado “There is Plenty of Room at the bottom” (1). En esta mítica conferencia, Feynman trató sobre cómo manipular, controlar y fabricar objetos de muy pequeñas dimensiones, tan pequeñas como los propios átomos: *“En el mundo de lo muy, muy pequeño, muchas cosas nuevas podrán suceder, porque los átomos se comportan de manera distinta a como lo hacen los objetos a mayor escala, pues deben satisfacer las leyes de la mecánica cuántica. Si nos reducimos y comenzamos a jugar con los átomos allá abajo, estaremos sometidos a unas leyes diferentes, y podremos hacer cosas diferentes. A nivel atómico, aparecen nuevos tipos de fuerzas, nuevas posibilidades, nuevos efectos”* (2).

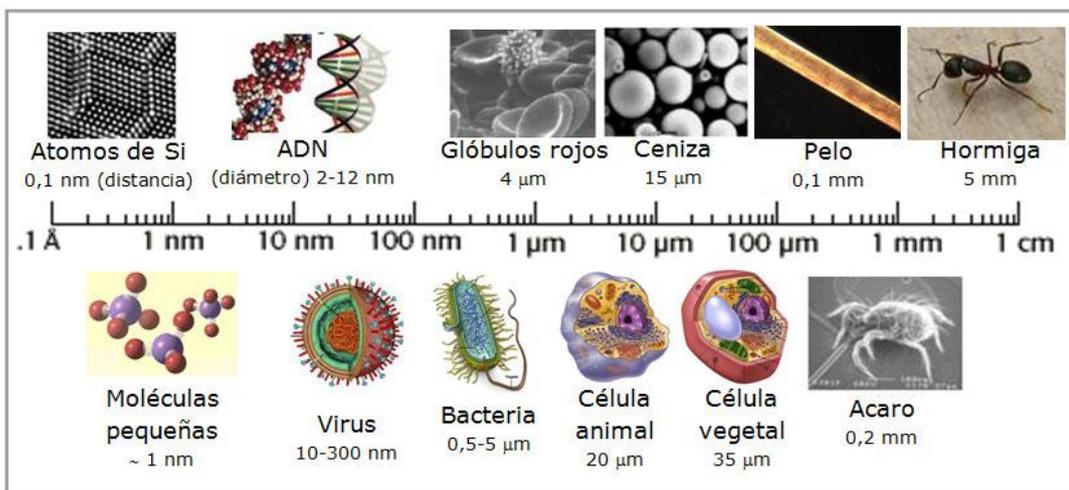


Figura 1. Escala de tamaños.

Los nanomateriales se definen como materiales con propiedades morfológicas menores de 100nm en alguna de sus dimensiones. Esta característica les confiere propiedades y comportamientos diferentes a los exhibidos por el grueso de la materia de la misma composición.

Los nanomateriales se pueden clasificar en función de sus dimensiones. Siguiendo esta clasificación se pueden diferenciar nanomateriales de 0D (cero dimensiones), 1D (una dimensión), 2D (dos dimensiones) y 3D (tres dimensiones).

- 0D o cero dimensiones: A este grupo corresponden los nanomateriales que tienen todas sus dimensiones por debajo de los 100nm (nanopartículas).
- 1D o unidimensionales: son nanomateriales que presentan una sola dimensión en la escala nanométrica (nanoalambres y nanotubos).
- 2D o bidimensionales: materiales con dos de sus dimensiones en la escala nanométrica. Algunos ejemplos de este grupo son las películas delgadas o filtros nanoporosos.
- 3D o tridimensionales: a este grupo corresponden los materiales constituidos por diferentes unidades nanométricas.

El presente proyecto se centra en las nanoestructuras de dimensión cero, las cuales exhiben importantes propiedades tamaño-dependientes, que tienen aplicaciones en numerosos campos (Figura 2)

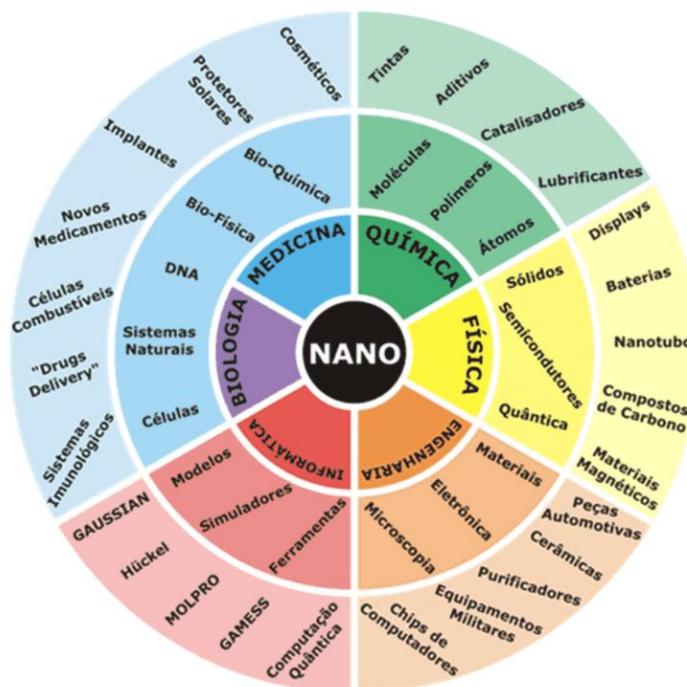


Figura 2. Aplicaciones de la nanotecnología

En las últimas décadas la nanociencia ha ido alcanzando un alto grado de desarrollo en el mundo científico y de investigación, así como presentando un impacto cada vez más apreciable en la sociedad actual. Muchos productos y aplicaciones basados en el empleo de los materiales aparecidos como resultado de los desarrollos en el ámbito de la nanociencia ya se han empezado a comercializar. De manera particular, las aplicaciones actuales más exitosas de la Nanotecnología se centran principalmente en los siguientes sectores: la microelectrónica, la informática, las comunicaciones, la automoción, la aeronáutica, la logística militar, la salud humana y animal, la cosmética y el medio ambiente.

1.2. NANOPARTICULAS METÁLICAS

Las nanopartículas se definen como agregados aislados de átomos de tamaño comprendido entre 1 y 100 nm, rodeados de una cápsula protectora o estabilizadora que evita su aglomeración. Presentan interesantes propiedades físicas y químicas que difieren considerablemente del metal sólido (*bulk*) del cual se forman (3). Estas nuevas propiedades dan lugar a nuevas aplicaciones en diversas áreas tecnológicas.

Las nanopartículas más estudiadas son aquellas formadas por materiales metálicos (como el oro), semiconductores (como los calcogenuros de cadmio, arseniuro de galio o fosfuro de indio) o aislantes (como el óxido de hierro o de titanio) (4).

Los nanoclusters son un tipo de nanopartículas metálicas formados por unos pocos átomos (5) cuya propiedad fundamental es la fotoluminiscencia. Actualmente no se ha descrito un mecanismo general para explicar esta característica de los nanoclusters (6) pero están teniendo un gran interés en la actualidad sobre todo en el desarrollo de nuevos sensores (7).

Las nanopartículas de metales nobles han atraído la atención de los científicos desde la antigüedad debido a sus propiedades ópticas únicas dependientes de la forma y del tamaño de las mismas (8). Los colores brillantes de las nanopartículas de Ag, Au y Cu fueron utilizados por los romanos en obras de arte decorativas tan antiguas como la copa de Lycurgo (9) (Figura 3). Pero no fue hasta hace 100 años cuando se comenzó con la experimentación de estas nanoestructuras, después de que Faraday realizara el primer experimento en el que sintetizó coloides de oro puro por reducción química de una solución de cloruro de oro (10).



Figura 3. Copa romana de Lycurgo, con nanopartículas de oro y plata muestra un color diferente dependiendo de si la luz pasa o no a través de ella.

De entre todos los metales nobles, el oro ha sobresalido por sus interesantes propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas, catalíticas, biocidas y antimicrobianas pudiéndose aplicar en distintas áreas tales como en farmacología, medicina, industria alimentaria, tecnología, biología, etc. (11)

1.2.1. Propiedades de las nanopartículas metálicas.

Cuando las dimensiones de los materiales se reducen hasta la escala nanométrica, aparecen dos fenómenos importantes (12):

- Alta relación superficie/volumen

El número de átomos que contiene la nanopartícula sobre su superficie es mayor al localizado en el interior del núcleo. Esta propiedad hace que sean mucho más reactivas lo que hace que tiendan a agregarse unas con otras para disminuir su energía superficial.

A la hora de trabajar con nanopartículas es importante contar con estrategias que disminuyan este efecto como puede ser la funcionalización y bioconjugación.

Esta característica de las nanopartículas se aprovecha en muchas aplicaciones tales como la catálisis (13).

- Confinamiento cuántico.

Se produce un incremento en el espaciado entre los niveles de energía electrónicos al disminuir el tamaño de la partícula. Al reducirse el espacio para el movimiento de los electrones, sus propiedades electrónicas cambian drásticamente dando lugar a nuevas aplicaciones de gran interés (14).

El cambio en las propiedades físicas de los materiales al reducir su tamaño se puede explicar mediante el estudio de los niveles electrónicos de una partícula. Como es sabido, la distancia entre los estados de energía contiguos aumenta de manera inversa a como lo hace el volumen de las partículas. Por lo tanto, el espectro continuo de bandas que refleja la situación del material masivo, cambia hacia un conjunto de estados discretos al disminuir el tamaño hasta llegar al régimen nanométrico, como se ilustra en la Figura 4. El hecho de que el espectro se vuelva discreto lleva a profundas modificaciones en

aquellas propiedades físicas que dependen de los electrones, como son las propiedades ópticas, magnéticas o de conducción (15).

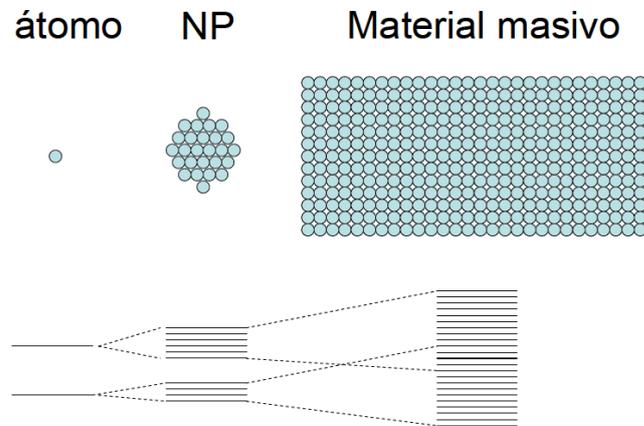


Figura 4. Evolución de los estados electrónicos, desde el átomo aislado hasta el bulk.

1.2.2.1. *Propiedades ópticas.*

Las nanopartículas de metales nobles, conocidas también como nanopartículas plasmónicas, se caracterizan por la resonancia del Plasmón Superficial (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) causante de las propiedades ópticas y fototérmicas de las nanopartículas de oro (AuNP's) (1). El SPR consiste en una oscilación colectiva de los electrones de conducción dentro de las nanopartículas cuando éstas son excitadas con luz (radiación electromagnética) (16). La naturaleza de la banda SPR se puede explicar con base en la teoría de Mie.

Cuando una partícula metálica es expuesta a la luz, el campo electromagnético alternante de la luz incidente interacciona con la partícula e induce una oscilación colectiva de los electrones libres del metal (electrones de la banda de conducción) con una cierta frecuencia lo que se traduce en la absorción de radiación electromagnética por parte de las nanopartículas en una determinada zona del espectro (17). Esta oscilación es debida a la diferencia neta de carga que se genera sobre los bordes de las partículas que actúa como una fuerza restauradora (Figura 4).

La oscilación dipolar, por lo tanto, está en resonancia con la radiación incidente a una frecuencia específica que depende tanto del tamaño como de la forma de las nanopartículas (Figura 5). La longitud de onda o color a la que

se obtiene dicha resonancia se la conoce como banda de absorción o resonancia plasmónica (12).

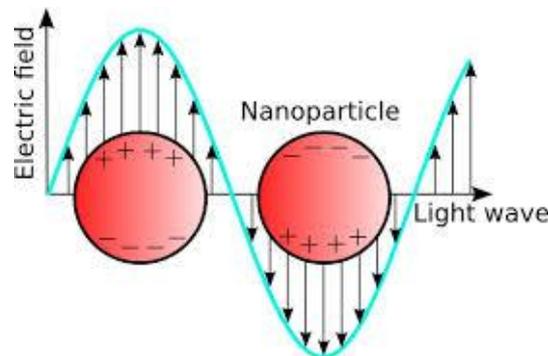


Figura 5. Efecto de Resonancia del Plasmón Superficial.

Para algunos metales como el cobre, oro o plata, la frecuencia de resonancia del plasmón aparece en el rango visible y ésta es la razón por la que las disoluciones coloidales de estos metales muestran espectaculares e intensos colores. En el caso de las AuNPs estudiadas en este proyecto, éstos muestran una SPR en torno a 540 nm en la región visible.

1.2.2. Estabilidad y funcionalización de las nanopartículas.

Las nanopartículas metálicas presentan un área superficial muy grande con respecto a su masa, por lo que tienen un exceso de energía libre superficial en comparación a su energía de formación, haciéndolas termodinámicamente inestables (3). Por ello, las partículas coloidales deben ser estabilizadas tanto cinética como termodinámicamente por agentes protectores, que son capaces de superar las fuerzas atractivas de Van der Waals que existen entre las partículas a través de fuerzas repulsivas electrostáticas y estéricas. Las partículas coloidales que se encuentran dispersas en un disolvente polar, como el agua, adquieren a menudo una carga superficial debido a la pérdida de iones de su superficie o a la ganancia de iones procedentes de la disolución. Las partículas cargadas atraen a iones de carga opuesta denominados contra-iones y repelen iones con carga del mismo signo, denominados co-iones (18). Como resultado, los contra-iones y las moléculas del disolvente polar adquieren una disposición ordenada alrededor de las partículas cargadas.

En los procesos de síntesis de nanopartículas, las sustancias que actúan como estabilizadores controlan tanto la velocidad de reducción de los iones

metálicos como el proceso de agregación de los átomos metálicos al neutralizar las fuerzas electrostáticas (Figura 6).

La elección de un buen agente estabilizante es de gran importancia no solo para evitar procesos de agregación sino también porque permiten determinar la forma, tamaño y composición de las nanopartículas sintetizadas.

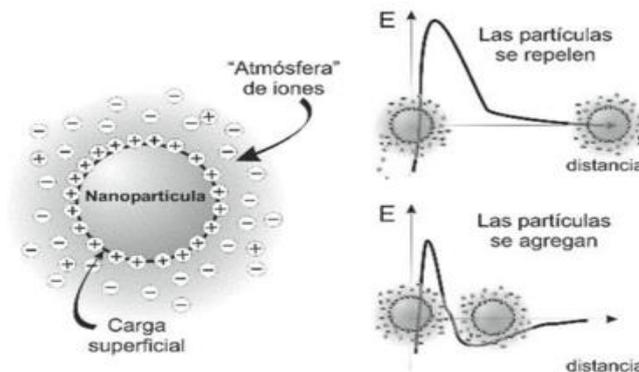


Figura 6. Formación de nanopartículas.

Como consecuencia de lo anterior, las nanopartículas pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc.) (13) confiriéndolas propiedades químicas y físicas diferentes (ópticas, solubilidad, reactividad...). Además, juegan un papel muy importante en la síntesis de las nanopartículas ya que la cantidad de ligando utilizado actúa como estabilizador evitando la formación de agregados, influyendo en el tamaño, forma y estabilidad de éstas. Por ello, según la aplicación deseada se puede elegir un tipo u otro de ligando.

Como se puede ver en la Figura 7, las nanopartículas y nanoclusters se componen de núcleos metálicos, cada uno compuesto por un número finito de átomos, cuya superficie está cubierta por una capa de ligandos (5).

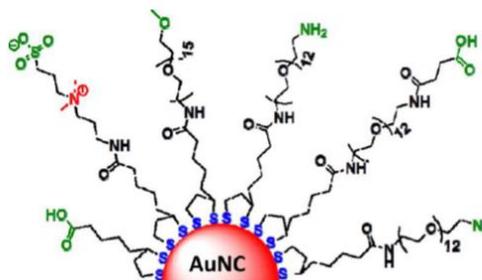


Figura 7. Representación de un nanocluster de oro funcionalizado (19)

1.2.3. Síntesis de nanopartículas metálicas

En la fabricación de nanomateriales se pueden distinguir dos estrategias (Figura 8):

- Las técnicas top-down (de arriba abajo), consisten en la descomposición de grandes piezas de material para generar a partir de ellas las nanoestructuras requeridas.
- Las técnicas bottom-up (de abajo a arriba) que consisten en el ensamblaje de átomos y moléculas individuales para dar nanoestructuras de mayor tamaño.

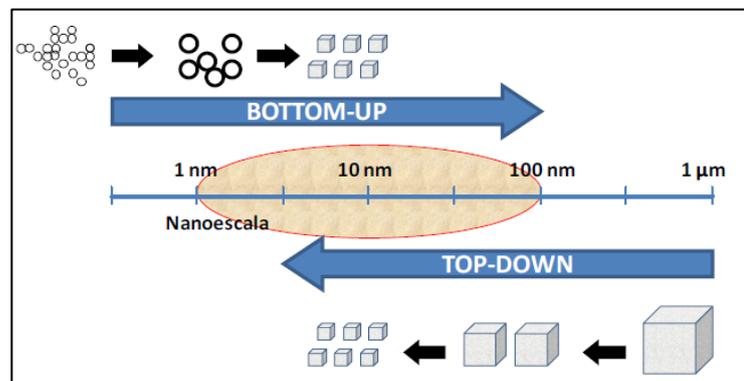


Figura 8. Técnicas de síntesis de nanomateriales.

Se han desarrollado una gran variedad de métodos para sintetizar nanopartículas metálicas de distintas morfologías, de los cuales los más habituales son los métodos bottom-up. Estos métodos, de manera general, se puede clasificar en tres grupos: métodos físicos, métodos químicos y métodos biológicos.

1.2.2.2. Métodos físicos

La formación de nanopartículas mediante métodos físicos consta de varias etapas: la vaporización por diversas técnicas de un sustrato, la condensación de los átomos para formar el núcleo inicial, el crecimiento del núcleo por la adición de más átomos y la coalescencia (20).

Entre los métodos físicos se encuentran la ablación láser, termólisis, irradiación con microondas y la síntesis sonoquímica.

1.2.2.3. Métodos químicos

Los métodos químicos son los más utilizados para sintetizar nanopartículas.

Estos comienzan con la reducción de los compuestos metálicos mediante diferentes técnicas (radiación, agentes reductores, termólisis o electro-reducción) y su posterior crecimiento. Dentro de ellos el más destacado y empleado se basa en la reducción química de sales metálicas en solución, aunque existen otros métodos químicos que han aparecido recientemente como es la reducción radiolítica y fotoquímica, el método sol-gel, etc. (21)

La reducción química de sales de metales de transición en presencia de moléculas estabilizadoras es el método químico más popular para la preparación de nanopartículas metálicas. Para llevarlo a cabo es necesario el empleo de un precursor metálico, un agente reductor y un agente estabilizante (22). El método de reducción química más extendido es la síntesis coloidal, ésta técnica consiste en la reducción de iones metálicos a átomos cerovalente que inmediatamente actúan como centros de nucleación para dar lugar a la formación de clusters (aglomeración de átomos metálicos) que continúan creciendo a medida que se siguen agregando más átomos.

Las principales ventajas de este método son (3):

- Es muy simple y reproducible.
- Permite obtener nanopartículas homogéneas.
- Permite preparar nanopartículas a gran escala y con una distribución de tamaño estrecha.
- La estructura, el tamaño y la forma de las partículas pueden ser controladas variando simplemente las condiciones de preparación como el tipo de reductor, el contenido de los iones metálicos, la temperatura, la velocidad de agitación, etc.

- Las soluciones de las nanopartículas son estables por meses y presentan extraordinarias propiedades para diversas aplicaciones.
- Se pueden preparar nanopartículas monometálicas y multimetálicas.

1.2.2.4. Métodos biológicos

Se pueden obtener materiales a escala nanométrica mediante síntesis biológica. Estos nuevos métodos de síntesis han aparecido como respuesta a la creciente necesidad de ser más amigables con el medio ambiente.

La biosíntesis involucra el empleo de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) (23) o extractos de plantas (24), que tienden a oxidarse cediendo sus electrones con objeto de reducir el metal a valencia cero.

A pesar de ser una técnica totalmente ecológica, la síntesis biológica presenta todavía desventajas importantes frente a los otros métodos ya que necesitan largos tiempos de reacción y tienen baja productividad (25).

Durante la síntesis de nanopartículas, por cualquiera de los métodos anteriores, se busca conseguir un mejor control del tamaño y forma para así obtener un conjunto de partículas monodispersas, con forma o morfologías idénticas, igual composición química, igual estructura cristalina y ausencia de fenómenos de agregación de manera que presenten una propiedad determinada (26).

En este proyecto se abordará la síntesis de nanopartículas de oro (20) cuyo proceso consta de las etapas (26) (Figura 9):

- Obtención de átomos metálicos en estado de oxidación cero, Au(0), mediante reacciones de oxidación-reducción.
- Nucleación: En esta etapa dos o más átomos chocan y se unen para formar un cúmulo. El núcleo crítico es el tamaño más pequeño del cúmulo que es estable para las condiciones experimentales en que se realiza la síntesis de nanopartículas. A partir de este tamaño se considera que se inicia el crecimiento de la nanopartícula.

- Crecimiento: Se adicionan los núcleos de Au(0) unos a otros para dar lugar a la formación de la nanopartícula. Se produce por agregación de átomos provenientes de la etapa de reducción y cúmulos ya existentes, o bien por colisión entre cúmulos.
- Adsorción de un agente estabilizante: Las partículas metálicas en solución tienden a aglomerarse debido a las interacciones de Van der Waals, por lo que es primordial estabilizarlas adicionando diferentes agentes estabilizantes (27) que controlen tanto la velocidad de reducción de los iones metálicos como el proceso de agregación de los átomos metálicos al neutralizar las fuerzas electrostáticas.

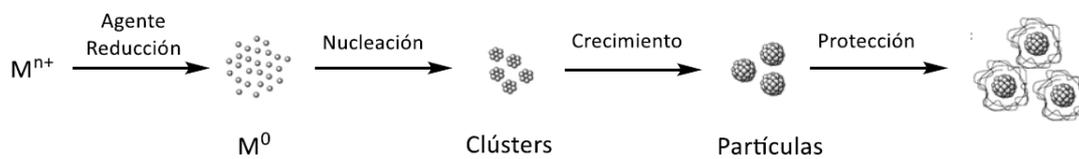


Figura 9. Proceso de formación de nanopartículas metálicas.

El tamaño y la forma de las nanopartículas obtenidas depende de las velocidades relativas de cada una de estas etapas, que pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción (concentración, temperatura, pH, poder reductor, etc.).

1.2.4. Técnicas de caracterización de nanopartículas metálicas

Como ya se ha mencionado anteriormente, las propiedades ópticas son las de mayor importancia para la caracterización de las nanopartículas metálicas, de allí que las técnicas espectroscópicas sean las que se utilizan con mayor frecuencia para su caracterización. Estas técnicas se basan en el acoplamiento de la oscilación colectiva de los electrones de conducción libres y de la frecuencia de la radiación electromagnética incidente. Este acoplamiento da lugar a las bandas de resonancia, conocidas como plasmones de superficie, donde se produce la absorción (26).

Algunas de las técnicas más habituales de caracterización de nanopartículas metálicas son las siguientes:

1.2.4.1. Espectroscopía UV-Visible

Una de las técnicas más utilizadas para caracterizar nanopartículas es la espectrofotometría UV-Visible que nos permite conocer la concentración, forma, tamaño y homogeneidad de tamaño de las partículas.

La espectroscopia describe la interacción entre la radiación, principalmente la electromagnética, y la materia. Toda radiación electromagnética viene caracterizada por una longitud de onda (λ), una frecuencia (ν) o una energía (E), relacionadas mediante la ecuación de Planck:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

Siendo h la constante de plank ($6,6256 \cdot 10^{-34}$ Js·fotón⁻¹)

La luz visible o ultravioleta (I_0) incide sobre la muestra, una parte del haz la atraviesa (I) y la otra es absorbida por los electrones de valencia, siendo éstos promovidos a estados excitados. La fracción de radiación que logra traspasar la muestra se denomina transmitancia ($T=I/I_0$) y se puede relacionar con la absorbancia mediante la siguiente expresión: $A= -\log T$. La absorción de luz por las moléculas puede relacionarse con la concentración de la especie absorbente de la muestra mediante la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon Cl = -\log T = -\log \frac{I}{I_0}$$

Dónde:

A = absorbancia

ϵ = coeficiente de absortividad molar

l =camino óptico

C = concentración de la especie absorbente

I_0 = intensidad de la luz monocromática incidente

I = intensidad de la luz transmitida a través del material

Espectro UV-Visible:

El espectro de absorción obtenido en el espectrofotómetro UV-Visible representa la absorbancia en función de la longitud de onda.

Los espectros de absorción que se obtienen se centran en la banda de resonancia del plasmón superficial. La posición y la forma de esta banda están influenciadas por diferentes factores tales como el metal, el medio

circundante, el tamaño, la forma, la polidispersidad de las partículas y las sustancias adsorbidas en la superficie.

La concentración se relaciona con la absorbancia en el pico máximo de absorción, la homogeneidad de tamaño con el ancho del pico y el tamaño con la posición del pico, desplazándose hacia longitudes de onda menores cuando el tamaño de la partícula decrece (28).

1.2.4.2. Espectroscopia raman

Técnica espectroscópica vibracional que utiliza la interacción entre la radiación electromagnética y la materia para estudiar la composición de la misma. Se basa en los fenómenos de dispersión inelástica de los fotones a una determinada frecuencia, diferente para cada molécula del material. Es por este hecho, por las diferentes frecuencias a las que están asociadas cada molécula en particular, que podemos identificar materiales y distinguirlos.

El efecto Raman se produce cuando un haz de luz monocromática (láser) incide sobre una molécula e interacciona con la nube electrónica de sus enlaces, excitando la molécula a un estado virtual no permitido. Debido a que este nuevo estado no es estable, la molécula se relaja hasta uno de sus estados permitidos mediante el desprendimiento de un fotón. La mayor parte de este haz de luz se dispersa y presenta la misma frecuencia que la onda incidente, se conoce como radiación elástica y no aporta ningún tipo de información molecular. Otra pequeña parte de la luz es dispersada de forma inelástica y devuelve frecuencias propias de cada molécula que compone el material, lo que se conoce como efecto Raman.

Se puede entender el proceso suponiendo que los enlaces son muelles que unen dos masas (Figura 10). Al excitar estos enlaces con luz monocromática se produce un movimiento (vibracional y rotacional) a una frecuencia propia de cada enlace. (29)



Figura 10. Modelo de átomos unidos por un muelle.

La relajación de las moléculas puede ocurrir de tres maneras diferentes (Figura 11):

- La molécula puede retornar al mismo estado vibracional en el que se encontraba antes de la excitación. Los fotones emitidos (flecha roja) tendrán la misma energía que los del láser excitador. En la relajación se ha producido lo que se llama una dispersión Rayleigh, que se dice que es elástica en el sentido de que no hay variación de energía.
- La molécula puede volver a un estado superior al de partida. En ese caso los fotones emitidos (flecha verde) tendrán menos energía que los del láser. Son los fotones "tipo Stokes". Esa diferencia de energía es lo que se llama desplazamiento Raman.
- Finalmente, la molécula puede volver a un estado de energía menor que la del estado de partida. En ese caso los fotones emitidos (flecha morada) tienen más energía que los del láser, diciéndose que son de tipo anti-Stokes.

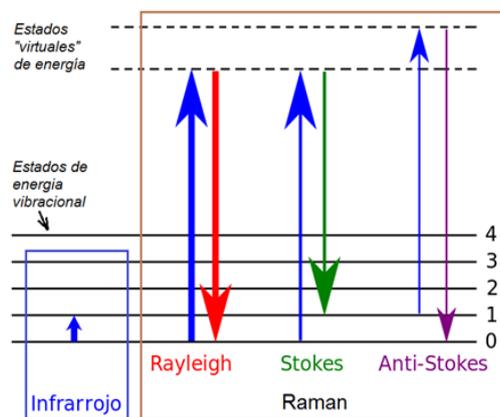


Figura 11. Diagrama de nivel de energía mostrando los estados implicados en la señal de Raman.

Espectro Raman:

La manera de representar el efecto Raman es mediante el espectro Raman. En el eje de las abscisas se representa el número de onda en cm^{-1} , relativo a la frecuencia de la luz incidente, y en el eje de ordenadas la intensidad en unidades arbitrarias [u. a].

Cada uno de los picos de este espectro se puede asociar a un modo de vibración (30).

1.2.4.3. Técnica elisa:

La técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color. La aparición de la coloración permite medir, indirectamente mediante espectrofotometría, el antígeno en la muestra.

Los lectores Elisa son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de una placa Elisa (Figura 14). A diferencia de una espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continuada, los lectores de Elisa disponen de sistemas de filtros que solo permiten la lectura de unas o varias longitudes de onda específicas, pero en muchas muestras a la vez.

En este proyecto esta técnica se realizará desde otro enfoque (se comentará más adelante).

1.2.4.4. Microscopios electrónicos:

Los microscopios electrónicos son otra de las técnicas de caracterización de nanopartículas metálicas más utilizadas, que nos permiten observar su forma, tamaño, rugosidad y cristalinidad. Estos microscopios cuentan con un cañón de electrones, una serie de lentes magnéticas que crean campos que dirigen y enfocan el haz de electrones hacia la muestra, y un sistema que registra las imágenes que producen los electrones al interaccionar con la muestra. Una parte importante de un microscopio electrónico la constituye el sistema de vacío necesario para que los electrones no puedan ser desviados por las moléculas de aire.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La Microscopía Electrónica de Transmisión permite determinar el tamaño, forma, estructura interna y, a través de difracción de electrones, la composición química de las nanopartículas (31). El haz de electrones se dirige hacia la superficie de la muestra, una parte de los electrones incidentes penetran a través de la muestra delgada dispersándose a medida que la atraviesan, se enfocan con la lente objetivo y se amplifican mediante la lente magnificadora para finalmente producir la imagen deseada. La imagen

aumentada sobre una pantalla se forma debido a electrones que se han transmitido a través del material analizado. Los patrones de difracción de los electrones permiten determinar las constantes de redes de las partículas lo que ayuda a la identificación de la especie (32).

Se pueden obtener dos tipos de imágenes: las imágenes en campo oscuro y las imágenes en campo claro. Las imágenes en campo claro son producidas por los electrones que se propagan a través de la muestra. En las imágenes en campo oscuro la imagen es producto de los electrones difractados (31).

En la preparación de las muestras para su observación en TEM, es necesario realizar una dispersión de las nanopartículas en un solvente y dejarlas secar sobre una rejilla.

Microscopía Electrónica de barrido (SEM)

En este tipo de microscopios se emplea una sonda que recorre la superficie de la muestra con un haz muy concentrado de electrones proporcionando una imagen tridimensional de la misma. A medida que los electrones chocan y penetran en la superficie se produce la dispersión de los electrones incidentes o la emisión de electrones secundarios que son recogidos en un tubo de rayos catódicos (CTR). Cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel en un monitor de televisión.

1.3. SENSORES

Hoy en día la tecnología de los sensores está experimentando un crecimiento continuo como consecuencia del creciente interés en realizar controles de productos de forma rápida, fiable y económica. Los sensores están experimentando un importante desarrollo debido a la intensa investigación que se está llevando a cabo sobre ellos, permitiendo realizar medidas “in situ” y reduciendo notablemente su tamaño en contraposición con las técnicas convencionales.

Un sensor es un dispositivo capaz de transformar la información física o química de una muestra en una señal eléctrica que nos proporciona dicha información de manera rápida y directa. Se pueden clasificar según el tipo de información que son capaces de transformar en: sensores físicos y sensores químicos (Figura 12).

- Los Sensores físicos detectan cambios en parámetros físicos como la temperatura, masa, presión, etc.
- Los sensores químicos detectan cambios en algún parámetro químico como el pH, la concentración, composición, etc.

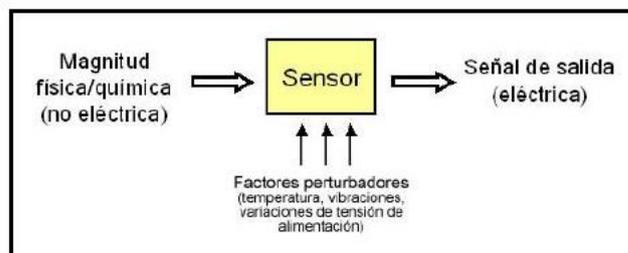


Figura12. Esquema del funcionamiento de un sensor.

En el presente proyecto, las nanopartículas sintetizadas se intentarán aplicar a sensores químicos ópticos, que con el software adecuado, permitan medir parámetros asociados a la industria vinícola.

1.3.1. Sensor químico

Un sensor químico es un dispositivo que transforma información química en una señal medible y útil. Consta principalmente de dos partes (Figura 13): un

receptor o elemento de reconocimiento molecular o iónico que interacciona con un determinado componente de la muestra (analito), y un elemento instrumental (transductor) que convierte la señal química producida por la interacción, en una señal procesable. Además, los sensores químicos suelen incorporar también un amplificador de señal que se encarga de amplificar, acondicionar, procesar y presentar la señal en formato de dato. Cuando el elemento de reconocimiento es un reactivo biológico el sensor toma el nombre de biosensor.

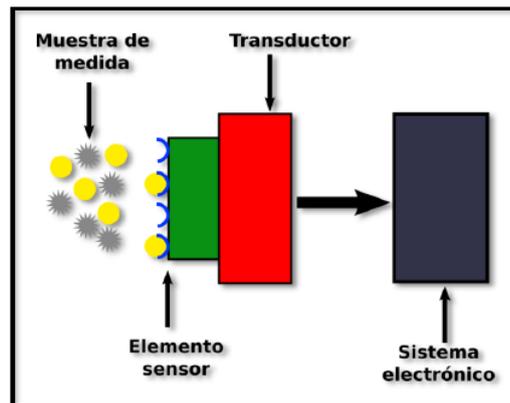


Figura13. Sensor Químico

Los sensores químicos se pueden clasificar en función del tipo de transducción en:

- Electroquímicos: son aquellos sensores que transforman la señal electroquímica producida debido a la interacción entre el analito y el receptor en una señal eléctrica de salida.
- Ópticos: son aquellos sensores que transforman la señal óptica resultante de la interacción entre el analito y el receptor en una señal eléctrica.
- Resistivos: son aquellos sensores en los que la interacción entre el analito y el receptor da lugar a un cambio en la conductividad que se transforma en una señal eléctrica.
- Másicos: son aquellos sensores que transforman las variaciones de masa producidas sobre la superficie del receptor, al darse la interacción, en señales eléctricas de salida.
- Térmicos: son aquellos sensores que transforman el efecto calorífico producido por la interacción analito-receptor en una señal eléctrica.
- Otros: magnéticos, etc.

1.4. MOSTO

La vid es una planta leñosa con una vida bastante larga. Está constituida por raíces, tronco, sarmientos, hojas, flores y fruto, cada una de las partes con una función propia dentro de la planta. Las raíces sustentan el cuerpo de la planta y se encargan de la absorción de la humedad y sales minerales que necesitan para vivir; el tronco y los sarmientos son meros vehículos de transmisión y las hojas son las encargadas de transformar la savia bruta en savia elaborada y ejecutar las funciones vitales de la planta: transpiración, respiración y fotosíntesis. En ellas es donde a partir del oxígeno y el agua se forman las moléculas de los ácidos, azúcares, etc. que se van a acumular en el grano de la uva condicionando su sabor. Finalmente, la clorofila es la encargada de captar, de los rayos solares, la energía suficiente para llevar a cabo todos los procesos.

Cuando llega el mes de marzo y comienza el calor, empiezan a formarse los frutos de la vid (uvas), inicialmente verdes pues están saturados de clorofila. El momento en el que la uva cambia de color, pasa de verde a amarillo si la variedad es blanca o al rojo claro si la variedad es tinta, recibe el nombre de envero. Durante esta etapa ocurren otros fenómenos en el interior de la uva como es el crecimiento y ablandamiento del grano, la modificación de la consistencia de los tejidos, la acumulación de azúcares, disminución de ácidos, modificación en los elementos minerales, variaciones en la composición y contenido de sustancias nitrogenadas, desaparición de clorofila y acumulación de pigmentos colorantes en el hollejo, incremento de los polifenoles y síntesis de sustancias aromáticas.

Es importante destacar que durante el proceso de maduración de la uva, los ácidos van cediendo terreno a los azúcares, procedentes de la actividad ejercida por las hojas como consecuencia del proceso de la fotosíntesis que tiene lugar en las mismas. En función de la variedad de que se trate, así como de la zona donde haya sido cultivada, la uva madura desde mediados del verano hasta principios del invierno, llevándose a cabo su recolección entre mediados del mes de septiembre y finales del mes de noviembre.

Una vez que la uva ha madurado, es recogida en el proceso de vendimia y prensada con el fin de obtener el mosto (33).

Se pueden diferenciar dos partes en el racimo de uva: el raspón, o parte leñosa, y las bayas o granos. Éstos se unen al racimo mediante el pedicelo, a través del cual se nutren. Las bayas, a su vez, están formadas por una película exterior denominada hollejo o piel, una masa que rellena su interior de la que se extrae el mosto conocida como pulpa y, en el centro de la misma, una número variable de semillas o pepitas (Figura 14), cada una de ellas con un aporte específico de características y componentes (34). El hollejo contiene la mayor parte de los componentes colorantes y aromáticos de los mostos; la pulpa los azúcares, el agua y los ácidos orgánicos; y las pepitas proporcionan los taninos al mosto.

El hollejo y la pulpa contribuyen al aroma del vino que viene determinado por cientos de metabolitos secundarios presentes en la baya en concentraciones variables, pero también por metabolitos y compuestos derivados de los procesos de extracción y tratamiento del mosto, de los procesos de fermentación o de los procesos de crianza en bodega.

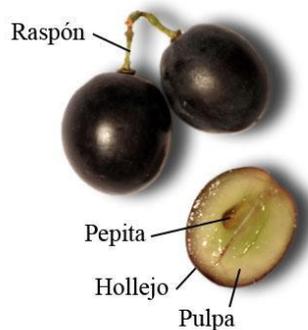


Figura 14. Estructura de la uva.

Por lo tanto, en función del grado de maduración de la uva varía el contenido en azúcares y fenoles del mosto, y de la misma manera, en función del tipo de variedad de uva seleccionada también cambia la composición final de dicho mosto (35).

1.4.1. Composición del mosto

El mosto antes de la fermentación se compone principalmente de agua y azúcares, así como de ácidos (málicos y tartáricos) y de otros componentes químicos en menor cantidad. Tras la fermentación alcohólica gran parte de los azúcares del mosto se transforman en alcohol etílico.

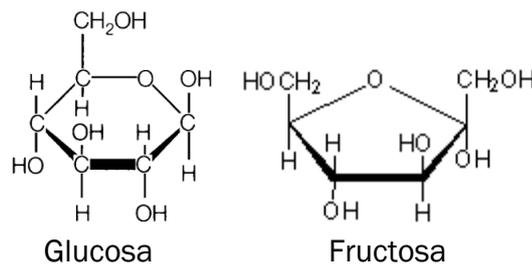
Los componentes principales presentes en el mosto son (36):

- Agua:

Es el componente principal del mosto y según su grado de madurez puede encontrarse entre un 70 y 85%.

- Azúcares:

Son el segundo componente más importante en la uva, existiendo mayor cantidad en la uva blanca que en la tinta. Están esencialmente representados por los monosacáridos glucosa y fructosa que se encuentran en el mosto en concentraciones comprendidas entre 150 y 250 g/L.



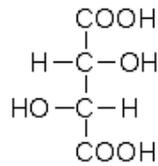
- Ácidos orgánicos:

Los ácidos orgánicos presentes en el mosto están representados principalmente por el ácido tartárico, cítrico y málico, también existen pequeñísimas cantidades de muchos otros ácidos orgánicos tales como glioxílico, oxálico, salicílico y glicólico. Los ácidos tartárico y málico representan el 90% de la acidez total del mosto.

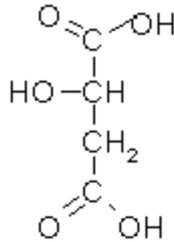
Se originan a partir de la oxidación de los azúcares y se acumulan principalmente en la pulpa, en formas libres y combinadas. Son responsables del carácter ácido del vino y tienen la capacidad de actuar como conservantes.

En el envero, la acidez de las bayas es máxima, alrededor de 30 g/l, expresada como ácido tartárico. En el periodo que transcurre entre el envero y la madurez, la acidez disminuye, llegando a concentraciones de 3 a 8 g/L. Esta disminución en la acidez total se debe tres fenómenos diferentes: la dilución de los ácidos (debido a que el grano crece en volumen); la neutralización de los ácidos por salificación y la degradación de los ácidos por respiración. En las uvas maduras, el

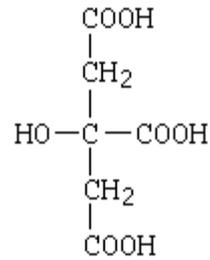
ácido que predomina es el tartárico, luego el málico y en menor cantidad, se encuentra presente el ácido cítrico.



Ácido tartárico



Ácido málico



Ácido cítrico

– Sustancias nitrogenadas:

Los compuestos nitrogenados son fundamentales en el mosto para que sea posible la correcta fermentación. Entre los aminoácidos predominantes en las uvas está la prolina y la arginina (37).

– Enzimas:

Las enzimas son sustancias muy complejas producidas por las células de los microorganismos. Aunque estén en pequeñas cantidades, son capaces de activar reacciones importantes como la fermentación alcohólica.

– Sustancias minerales:

En los mostos existen siempre pequeñas cantidades de sulfatos, fosfatos y cloruros de potasio, calcio, magnesio y sodio procedentes del suelo. Se localizan principalmente en las partes sólidas de la uva: hollejos, semillas y paredes celulares de la pulpa.

– Sustancias pépticas:

Están presentes en las paredes celulares del hollejo y de la pulpa, y se solubilizan en el mosto tras la degradación enzimática de dichas paredes. Originan la turbidez típica de los mostos.

- Compuestos aromáticos:

Los compuestos aromáticos caracterizan el sabor y olor de los mostos, algunos grupos principales son: los terpenos, lactonas, ésteres, compuestos azufrados, etc.

- Compuestos fenólicos:

Cuantitativamente representan solo el 0,3% de los componentes del mosto, pero son fundamentales en las características organolépticas y en la calidad del producto. Están localizados mayoritariamente en las pepitas y el hollejo

Los compuestos fenólicos se clasifican en flavonoides y no flavonoides.

Cada una de las partes que integran la baya contribuye de manera diferente a la composición del mosto, debido a su diferente naturaleza y composición química. Como se ha dicho anteriormente, según el grado de maduración de la uva va a variar el contenido en azúcares y fenoles, y como consecuencia las características del mosto.

1.4.2. Compuestos reductores en el mosto

1.4.2.1. Polifenoles

Los polifenoles son constituyentes fundamentales del mundo vegetal, se encuentran comúnmente en los alimentos retardando o previniendo su oxidación. Están representados por centenares de compuestos de diversa estructura química, pero que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos que llevan asociados uno o varios grupos hidroxilo.

En los últimos años, los polifenoles de los vinos han sido sujeto de un creciente interés debido a sus magníficas propiedades antioxidantes, es decir, a su capacidad de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, lo que tiene potenciales efectos sobre la salud humana (38).

Los compuestos químicos en forma de polifenoles son abundantes en el vino y en el mosto, juegan un papel importante por su contribución en los atributos

sensoriales como el color, las propiedades gustativas (cuerpo, astringencia, y amargor), y su capacidad de envejecimiento (39). Es por ello que definir el momento en el cual la uva ha llegado a su madurez fenólica es uno de los objetivos perseguidos por muchos científicos.

Los compuestos fenólicos se clasifican en dos tipos: compuestos no flavonoides y flavonoides (Figura 15):

- En los compuestos no flavonoides se incluyen los ácidos fenoles, divididos en benzoicos (C6-C1) y cinámicos (C6-C3), y otros derivados fenólicos como los estilbenos.
- Dentro de los flavonoides encontramos las antocianinas (malvidol, peonidol,...) que dan el color a los vinos tintos, los taninos catequinos (flavanoles o flavan3-oles) principales responsables de la astringencia y de la estructura de los vinos, y los flavonoles (quercetol, miricetol, etc) que parecen contribuir al gusto amargo (40).

La concentración de polifenoles en el mosto, tal y como se dijo anteriormente, depende en gran medida de la variedad vitis vinífera, del clima en el que se haya cultivado y de la forma en que se haya procesado la uva.

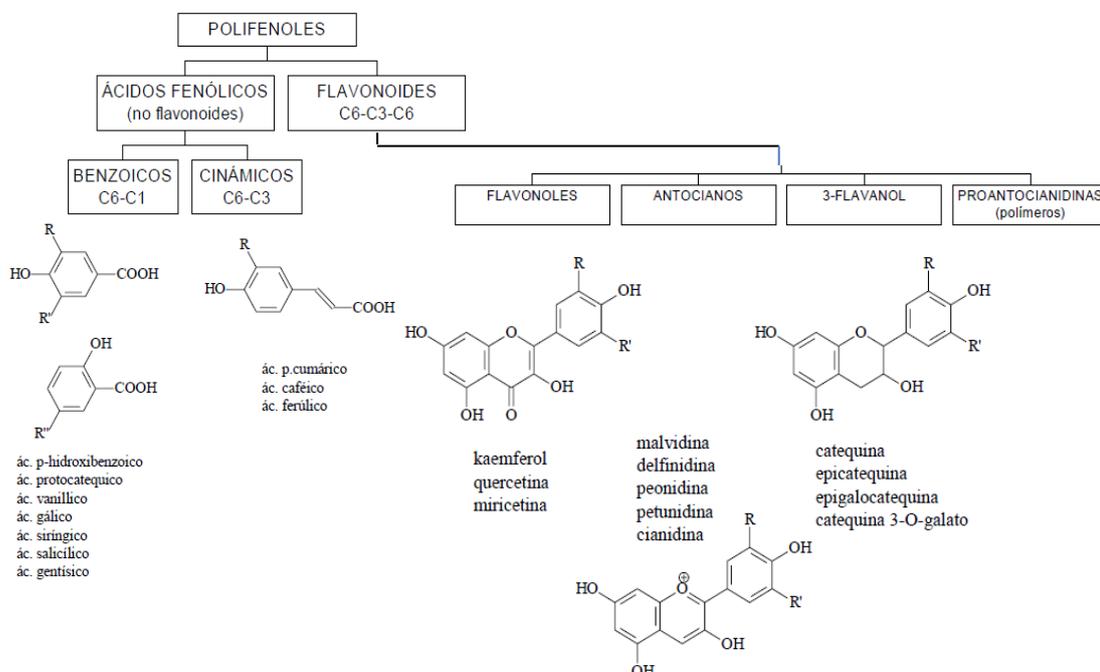


Figura 15. Polifenoles del vino

1.4.2.2. AZÚCARES

Los azúcares son compuestos orgánicos polihidroxilados que presentan un grupo aldehído o cetona (aldosa o cetosa respectivamente) en su molécula. Son incoloros e inodoros, presentan sabor dulce y son solubles en agua e insolubles en algunos compuestos orgánicos. Sus propiedades químicas se deben a las funciones aldehído y cetona libres, de allí su capacidad reductora, la facilidad con que se oxidan en ácidos y la aptitud para polimerizar.

Ofrecen múltiples ventajas, se utilizan para endulzar los alimentos y como conservantes, aunque su principal característica nutricional es su importancia como fuente de energía. Por otra parte, los azúcares aumentan la viscosidad de los mostos, factor que también interviene en la lágrima que se forma en las paredes de la copa, pues se trata de compuestos que son untuosos en la boca (41).

Por regla general la presencia de una concentración de azúcares de menos de 1.5 g/litro hace que el paladar no detecte el sabor dulce, por encima de un 0.2% del volumen los sentidos empiezan a detectar el sabor dulce del vino.

Se clasifican en función del número de unidades de monosacáridos de los que están formados en: monosacáridos (un monosacárido), disacáridos (dos monosacáridos unidos mediante un enlace glicosídico) y oligosacáridos (de dos a diez monosacáridos unidos mediante enlaces glicosídicos).

Los principales azúcares en el mosto son dos monosacáridos: la glucosa y fructosa, existen otros como la galactosa, la xilosa, la arabinosa o la ribosa pero en concentraciones insignificantes. La concentración de estos azúcares en la uva depende del momento de maduración en la que esta se encuentra, de forma que antes de madurar predomina la glucosa y en las uvas bien maduras la fructosa.

2. MATERIALES Y EQUIPOS

2.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se enunciarán y describirán los materiales y la instrumentación necesaria para la obtención de las nanopartículas de oro.

2.2. MATERIAL UTILIZADO

- Cubetas de cuarzo de la marca Hellma con paso óptico de 1cm y 1mm.
- Tubos de vidrio de 1cm de diámetro.
- Vasos de precipitados.
- Micropipetas dede 20 a 200µl Pluripet.
- Micropipeta de 100 a 1000 µlEcopipetteby CAP.
- Tubos eppendorf con volúmenes de 2ml.
- Gradillas.
- Cronómetro.
- Parafilm.
- Guantes.
- Tijeras.

2.3. EQUIPOS

- Espectrofotómetro shimadzu UV-1603 (UV- Visible).
- Microscopio electrónico de transmisión:
 - Jeol Jem-FS2200HRP field transmission electron microscope.
 - Jeol Jem- 1011HR field transmission electron microscope.

- Espectrofotómetro Elisa OpsysMr.
- Baño de ultrasonidos (Ultrasons selecta).
- Centrífuga Alresa.

2.4. MUESTRAS

Se ha experimentado con mostos preparados a partir de ocho variedades de uva diferentes:

- Juan García
- Mencía regadío
- Mencía secano
- Rufete
- Prieto picudo
- Garnacha
- Tempranillo
- Cabernet

Las muestras a analizar han sido:

- Mostos elaborados a partir de todas las variedades de uva cosechadas en la vendimia del 2014.
- Mostos elaborados a partir la variedad de uva Tempranillo cosechada semanalmente desde el enero hasta la post-vendimia en el año 2014.

Todas las muestras de mosto utilizadas en esta investigación han sido previamente evaluadas mediante análisis químico en la Estación Enológica de Castilla y León. Las valoraciones realizadas incluyen acidez total, grado alcohólico, azúcares, densidad, sulfuroso libre y total, pH, IPT, etc.

2.5. REACTIVOS

- Antioxidantes patrones:
 - Catecol. (Pyrocatecol 98%, Panreac).
 - Ácido gálico. (Sigma-Aldrich)
 - Ácido tánico. (Sigma-Aldrich)
 - Ácido cítrico. (Sigma-Aldrich)
 - Ácido cafeico. (Sigma-Aldrich)
 - Ácido málico. (Sigma-Aldrich)
 - Ácido tartárico. (Sigma-Aldrich)
 - Ácido vanílico. (Sigma-Aldrich)

- Azúcares:
 - Glucosa. (α -D glucosa. Sigma-Aldrich)
 - Fructosa. (Alfa Aesar)
 - Galactosa

- Otros:
 - Ácido tetracloroaúrico. (Sigma-Aldrich)

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. SÍNTESIS DE NANOESTRUCTURAS

3.1.1. Disoluciones patrón

Teniendo en cuenta que los mostos contienen compuestos antioxidantes capaces de reducir los iones de oro (Au^{3+}) a oro metálico (Au^0), se han diseñado una serie de experimentos (Tabla 1) utilizando compuestos presentes en los mostos con el fin de comprobar la respuesta de cada uno de ellos ante la síntesis de nanoestructuras.

Los compuestos reductores utilizados han sido los siguientes:

- Azúcares:
 - Glucosa
 - Fructosa
 - Galactosa

- Ácidos:
 - Ácido málico
 - Ácido tartárico

- Antioxidantes:
 - Ácido cítrico
 - Ácido cafeico
 - Ácido vanílico
 - Ácido gálico
 - Ácido tánico
 - Catecol

La síntesis de nanopartículas de oro se ha realizado a temperatura ambiente mediante reacciones de oxidación-reducción partiendo de soluciones acuosas de ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) de concentración 1mM como agente precursor. Esta solución de oro se ha mezclado, en tubos de vidrio de 1cm de diámetro, con diferentes volúmenes de agente reductor, obteniéndose un volumen final de 2ml.

La reacción redox da como resultado soluciones de diferentes coloraciones que indican la formación de nanoestructuras.

	Sal de oro μL	Patrón (agente reductor) μL	Volumen final	Porcentaje de agente reductor en la muestra
Muestra 1	1800	200	2ml	10 %
Muestra 2	1600	400	2ml	20 %
Muestra 3	1400	600	2ml	30 %
Muestra 4	1200	800	2ml	40 %
Muestra 5	1000	1000	2ml	50 %
Muestra 6	800	1200	2ml	60 %
Muestra 7	600	1400	2ml	70 %
Muestra 8	400	1600	2ml	80 %
Muestra 9	200	1800	2ml	90 %
Muestra 10	0	2000	2ml	100 %

Tabla 1. Volúmenes empleados para la síntesis de nanopartículas de oro

3.1.2. Mostos

Se han sintetizado nanopartículas de oro utilizando mostos como agentes reductores, siguiendo el mismo procedimiento del punto 4.1.1. Las soluciones acuosas de ácido tetracloroáurico 1mM ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) se han mezclado, a temperatura ambiente y en tubos de vidrio de 1cm de diámetro, con diferentes volúmenes de mosto previamente centrifugados a 4000rpm durante 10 minutos para eliminar los sólidos en suspensión, obteniéndose un volumen final de 2ml.

La serie de experimentos diseñados en los que se ha estudiado las distintas variedades de mosto como agentes reductores y los volúmenes de éstos utilizados en la reacción (proporción entre la solución de oro y el mosto) es la siguiente:

	Sal de oro µL	Mosto (agente reductor) µL	Volumen final	Porcentaje de agente reductor en la muestra
Muestra 1	1800	200	2ml	10 % de mosto
Muestra 2	1600	400	2ml	20 % de mosto
Muestra 3	1400	600	2ml	30 % de mosto
Muestra 4	1200	800	2ml	40 % de mosto
Muestra 5	1000	1000	2ml	50 % de mosto
Muestra 6	800	1200	2ml	60 % de mosto
Muestra 7	600	1400	2ml	70 % de mosto
Muestra 8	400	1600	2ml	80 % de mosto
Muestra 9	200	1800	2ml	90 % de mosto
Muestra 10	0	2000	2ml	100 % de mosto

Tabla 2. Volúmenes empleados para la síntesis de nanopartículas de oro

Este procedimiento se ha realizado para todos los mostos elaborados con las distintas variedades de uva de la vendimia del 2014 y para la serie secuencial (desde el envero hasta la post-vendimia) del mosto elaborado a partir de la variedad de uva tempranillo de la vendimia del año 2014.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

3.2.1. Espectrofotómetro UV-Visible

Las nanopartículas de oro sintetizadas han sido caracterizadas empleando el espectrofotómetro Shimadzu UV1603 (UV-visible) (Figura 16), utilizando cubetas de cuarzo de 1cm de paso óptico.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

Una vez encendido el equipo y el programa UVProbe, se debe realizar la línea base utilizando aire tanto en el compartimento de referencia como en el compartimento de muestra. A continuación, se registra un espectro en el rango de medida deseado introduciendo agua en ambos compartimentos para comprobar el adecuado funcionamiento del equipo. Finalmente, se realizan las medidas de todas las muestras utilizando agua destilada (solvente) como referencia.

Las medidas se realizan siempre en las mismas condiciones. Los datos obtenidos en el espectrofotómetro son tratados mediante el programa Origin 6.0



Figura 16. Espectroscopio ultravioleta-visible

3.2.2. Espectrofotómetro Elisa

Para caracterizar la síntesis coloidal de nanopartículas también se ha empleado el espectrofotómetro Elisa Opsys (Figura 17) a longitudes de onda de 492 y 620nm.

Se ha utilizado una placa Elisa formada por ocho columnas y doce filas (96 pocillos) para realizar el análisis de la muestras.



Figura 17. Espectrofotómetro Elisa.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

La reacción se lleva a cabo directamente en los pocillos de la placa Elisa mediante la adicción de los volúmenes necesarios de cada reactivo. En cada fila de la placa se introduce una variedad distinta de mosto (previamente centrifugado) y un patrón. En las columnas se introducen cantidades crecientes de agente reductor (mosto) tal y como representa la Tabla 3. A continuación se efectúan las lecturas de absorbancia de la placa en el espectrofotómetro Elisa a las longitudes de onda de 492 y 620nm durante dos horas aproximadamente.

\ μl mosto- μl Au Variedad	30 - 270	60 - 240	90 - 210	120 - 18	150 - 150	180 - 120	210 - 90	240 - 60	270 - 30	300- 0
A (C)										
B (G)										
C (JG)										
D (MR)										
E (PP)										
F (R)										
G (T)										
H €										

Tabla 3. Procedimiento para la placa Elisa. Siendo: C: Cabernet; G: Garnacha; JG: Juan García; MR: Mencía Regadío; PP: Prieto Picudo; R: Rufete; T: Tempranillo, E:Estándar).

3.2.3. Microscopio electrónico de transmisión

Para el estudio del tamaño, morfología, distribución, estructura y cristalinidad de las nanopartículas obtenidas se han empleado dos microscopios electrónicos de transmisión (Figura 18):

- Jeol Jem-FS2200HRP Field transmission electron microscope con un voltaje de 200 KV
- JeolJem- 1011HR Field transmission electron microscope con un voltaje de 80 KV.

Para caracterizar las nanopartículas de oro obtenidas se deposita una gota de la suspensión coloidal de nanopartículas sobre una rejilla de carbono tipo B (referencia 01811) de la marca TedPella y se deja evaporar al aire.

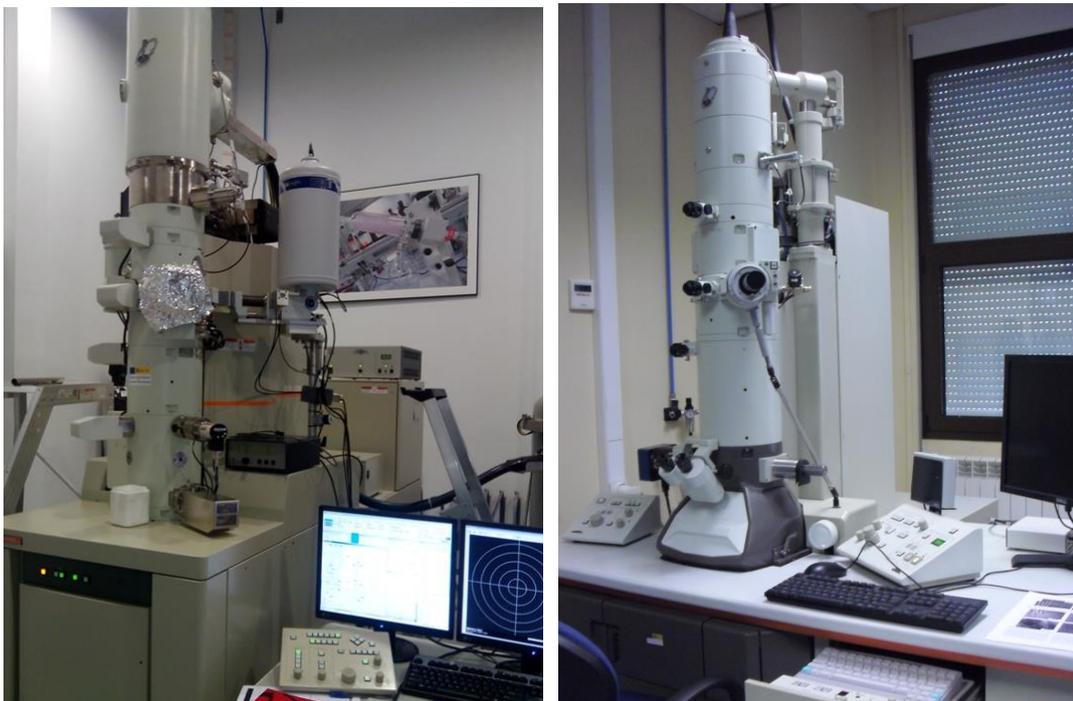


Figura 18. Microscopio TEM Jeol Jem-2200 (izquierda) y JeolJem- 1011 (derecha)

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de todas las medidas de las distintas muestras de mosto deben ser convenientemente tratados mediante el método de componentes principales (PCA), haciendo uso del programa Matlab V 5.0, para obtener información sobre ellas. También se ha aplicado la técnica multivariante PLS (regresión por mínimos cuadrados) para establecer correlaciones entre los datos proporcionados por la PCA y algunos datos químicos de interés en los mostos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las nanopartículas de oro se han sintetizado siguiendo la metodología explicada en la sección 3.1, reduciendo el precursor metálico (solución de oro 1mM) con el mosto o con los patrones reductores en diferentes volúmenes.

A continuación se discutirán los resultados obtenidos de la caracterización de estas nanopartículas mediante las técnicas previamente explicadas.

4.1. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS PATRONES

En un primer lugar se ha realizado la reducción de la sal de oro con disoluciones patrón de diferentes azúcares, ácidos orgánicos y antioxidantes, compuestos que forman parte de los mostos a analizar. Este bloque de experimentos se ha llevado a cabo con la finalidad de poner a punto el método de análisis, tanto la preparación de la reacción como la caracterización del producto final, y para comprobar la sensibilidad del mismo.

Los patrones elegidos y el resultado de cada uno de ellos ha sido el siguiente:

	Patrones	Resultado
Azúcares	Glucosa	No reacciona en ninguna proporción
	Fructosa	No reacciona en ninguna proporción
	Galactosa	No reacciona en ninguna proporción
Antioxidantes	Ácido cafeico	Reacciona
	Ácido vanílico	Reacciona
	Ácido cítrico	Reacciona
	Ácido gálico	Reacciona
	Ácido tánico	Reacciona
	Catecol	Reacciona

Ácidos	Ácido málico	No reacciona en ninguna proporción
	Acido tartárico	No reacciona en ninguna proporción

Tabla 4. Resultado de los patrones elegidos

En primera instancia, la obtención de nanopartículas de oro es corroborada a simple vista mediante el cambio de coloración de la solución para todos los antioxidantes utilizados. Del mismo modo, se ha comprobado que la glucosa, fructosa y galactosa, a pesar de ser azúcares reductores, no forman nanopartículas. Tampoco lo hacen el ácido tartárico y málico, debido a que no son compuestos reductores (Tabla 4).

Las nanopartículas de oro sintetizadas con distintos volúmenes de ácido tánico, cítrico y gálico se han caracterizado con espectroscopia UV-Visible, tal y como muestran las siguientes figuras (Figuras 19-21)

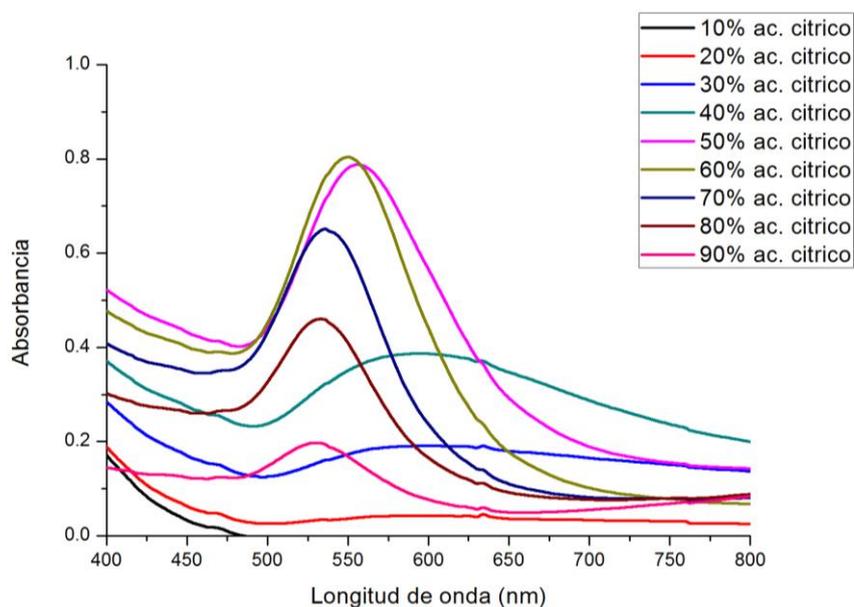


Figura 19. Espectro UV-Visibles del ácido cítrico.

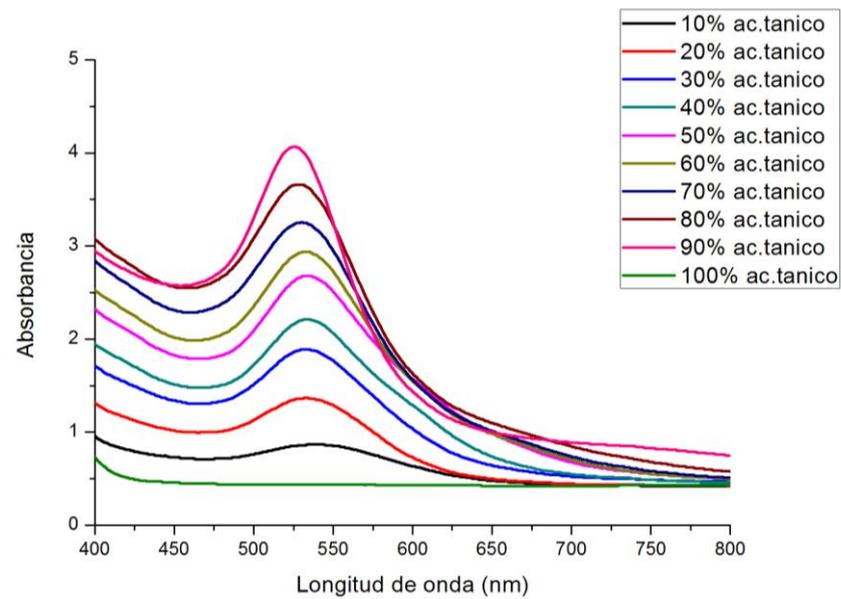


Figura 20. Espectro UV-Visibles del ácido tánico.

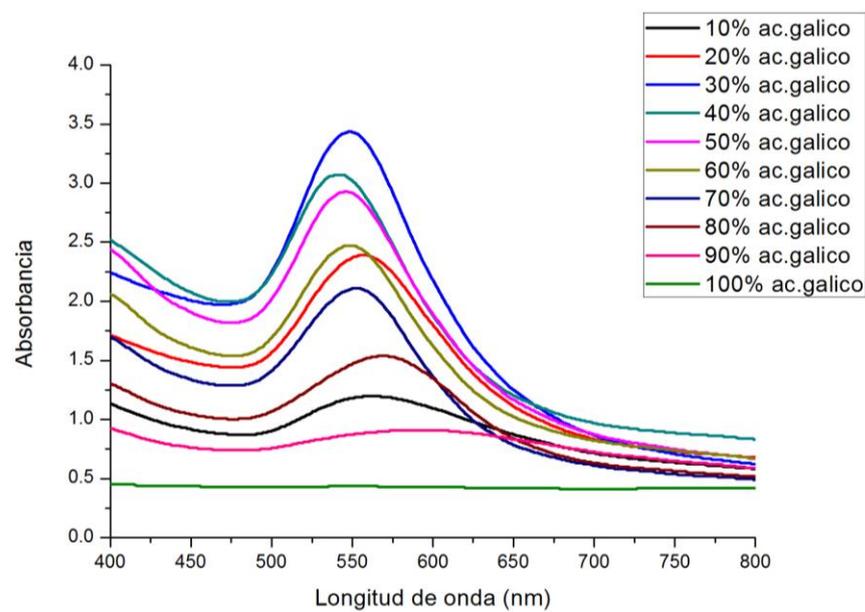


Figura 21. Espectro UV-Visibles del ácido gálico.

Los espectros UV-Visible muestran la banda del plasmón de resonancia característica de las nanopartículas de oro en torno a 550nm. Para el ácido tánico y el ácido cítrico se observa que, al aumentar el volumen de agente

reductor en la mezcla (de 10 a 90%), se produce un desplazamiento del plasmón hacia longitudes de onda más pequeñas, con lo cual se puede inferir una reducción en el tamaño de partícula obtenido. En el caso del ácido gálico, cuando se utiliza una proporción de antioxidante en la mezcla mayor de un 40% (de 40 a 90%) ocurre lo contrario, el pico sufre un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda al aumentar la proporción de reductor en la mezcla, y por tanto se produce un aumento en el tamaño de las nanopartículas.

Además se observa que los plasmones de las nanopartículas utilizando el ácido tánico sufren un incremento en la absorbancia a medida que aumenta la proporción de agente reductor en la muestra, por lo que podemos deducir que se produce un aumento en la concentración de nanopartículas de la solución coloidal. Esto no ocurre así con los otros dos antioxidantes estudiados. Para el ácido cítrico y el ácido gálico, la absorbancia del plasmón aumenta en el caso de que exista una proporción de antioxidante en la mezcla mayor de un 60% (de 60 a 90%) o de un 30% (de 30 a 90%), respectivamente, y disminuye para proporciones menores.

También se aprecia claramente que conforme aumenta el volumen de ácido tánico en la muestra, el ancho medio de banda disminuye sugiriendo una disminución de la polidispersidad del sistema. Asimismo, la banda de menor definición corresponde a la mezcla con un 10% de antioxidante. Esta imprecisión del plasmón se debe a la relación que existe entre la baja concentración de nanopartículas obtenidas y la elevada polidispersidad morfológica de éstas. Este hecho no se cumple para el ácido gálico y cítrico.

4.2. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS DISTINTAS VARIETADES DE MOSTO

Se han realizado diversos experimentos con mostos, siguiendo la metodología explicada en la sección 3.1.2., con el fin de evaluar si éstos son capaces de formar nanopartículas.

4.2.1. Caracterización óptica.

La formación de nanopartículas por reducción química del HAuCl_4 está directamente relacionada con el volumen y la variedad del mosto empleado, obteniéndose diferentes tonalidades de coloración (Figuras 22-25). Estas imágenes fueron tomadas en el momento de la mezcla de reactivos (imágenes superiores) y cuando la reacción había finalizado en todos los ensayos (imágenes inferiores).

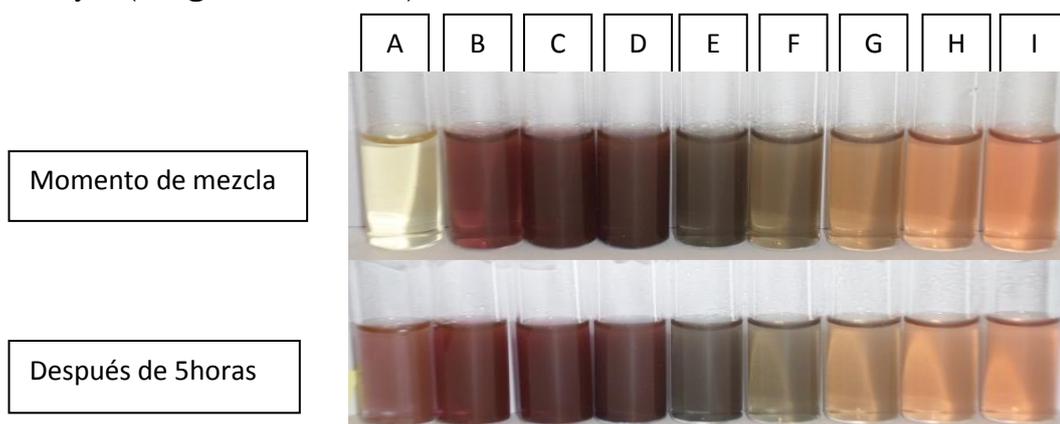


Figura 22. Nanopartículas de oro obtenidas con la variedad Garnacha en distintas proporciones*

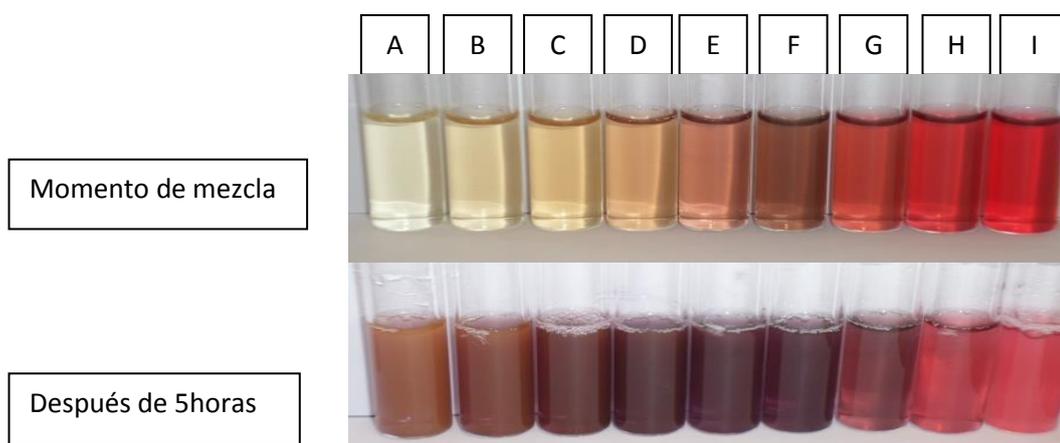


Figura 23. Nanopartículas de oro obtenidas con la variedad Tempranillo en distintas proporciones

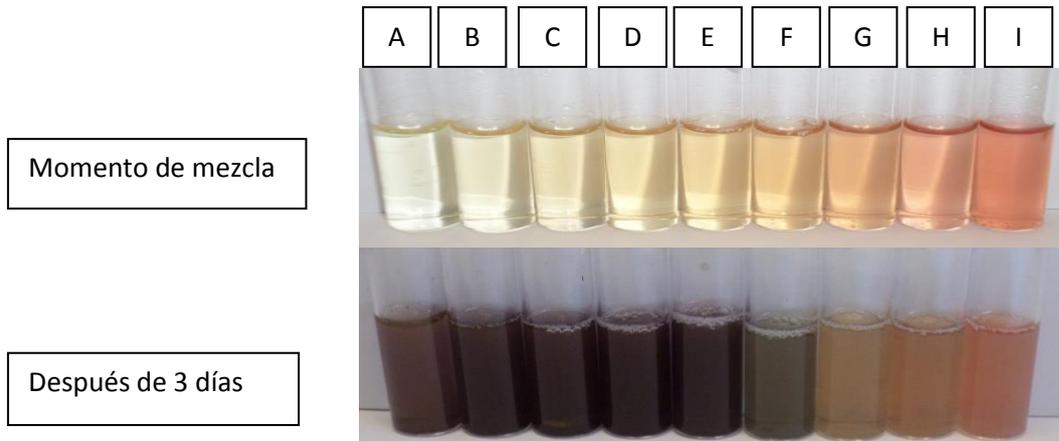


Figura 24. Nanopartículas de oro obtenidas con la variedad Ruffete en distintas proporciones*

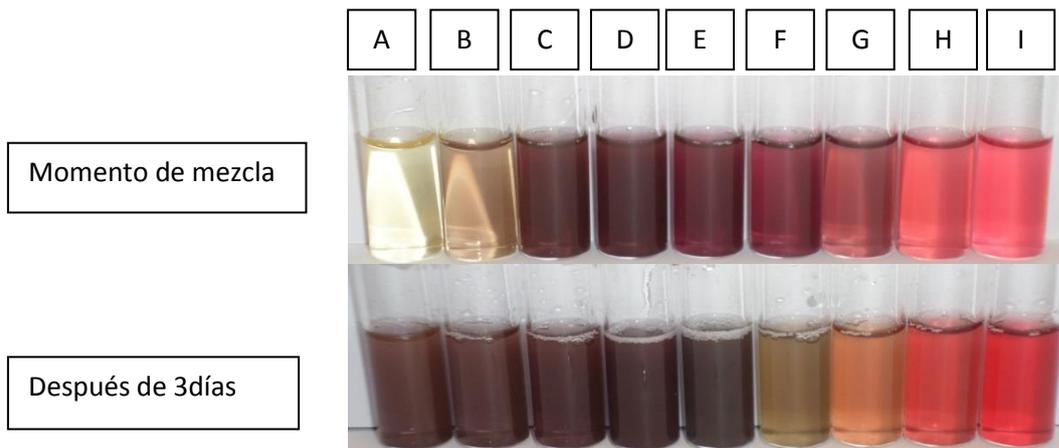


Figura 25. Nanopartículas de oro obtenidas con la variedad Prieto Picudo en distintas proporciones*

(*Leyenda: **A:** 10 % de mosto; **B:** 20 % de mosto; **C:** 30 % de mosto; **D:** 40 % de mosto; **E:** 50 % de mosto; **F:** 60 % de mosto; **G:** 70 % de mosto; **H:** 80 % de mosto; **I:** 90 % de mosto)

El resultado obtenido con el resto de las variedades se puede encontrar en el anexo del presente proyecto

Al añadir el mosto sobre la disolución de Au^{3+} se produce un cambio de color que indica la formación de nanopartículas de oro. El tono del color depende de la variedad mosto (del rojizo o anaranjado para altos porcentajes de mosto, a marrón oscuro para bajos porcentajes), y su intensidad depende de la proporción de mosto añadido (Figuras 22-25).

Se ha observado que la reacción se da instantáneamente cuando la proporción de agente reductor (mosto) es elevada. En el caso de un bajo porcentaje de mosto en la solución (caso A, B, C...), la reacción puede tardar horas o incluso días (Figuras 22-25) dependiendo de la variedad de mosto utilizado.

El color rojizo de las soluciones coloidales de las nanopartículas de oro que se observa en las anteriores figuras se debe a la banda de resonancia del plasmón superficial en la región visible entre 520 y 600nm. La posición de esta banda depende de la naturaleza del metal, ligandos, tamaño, forma y distancia entre las partículas, constante dieléctrica e índice de refracción del medio. A medida que aumenta el tamaño de la nanopartícula se produce un desplazamiento del máximo de absorbancia hacia mayores longitudes de onda, presentando un color más azulado al ojo humano. En caso contrario, al disminuir el tamaño de la nanopartícula se produce un desplazamiento del máximo de absorbancia hacia longitudes de onda menores, mostrando un color más rojizo (Figura 26). En nuestro caso, las distintas coloraciones obtenidas parecen indicar que, según el tipo de mosto y, por tanto, según el tipo y concentración de antioxidantes presentes en él, se obtienen nanopartículas de oro de distintas formas y tamaños.

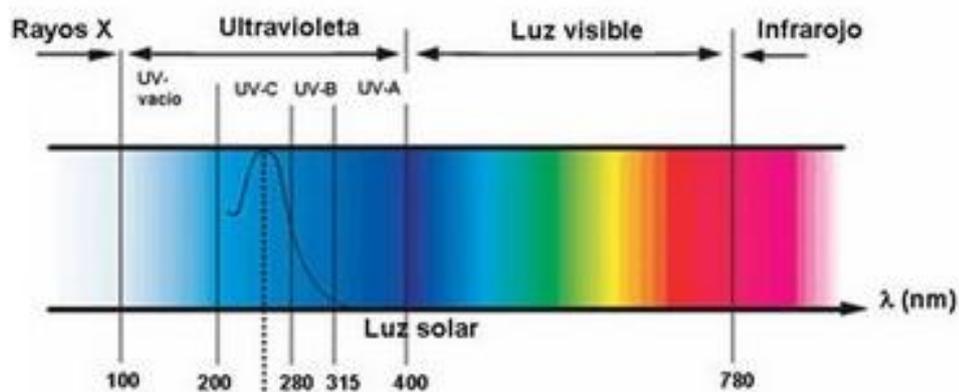


Figura 26. Espectro electromagnético ultravioleta-visible.

Con el fin de analizar con mayor profundidad las nanopartículas de oro formadas, se han registrado sus espectros UV-Visible.

A continuación se muestran los espectros de las nanopartículas obtenidas a partir de las variedades de uva **Tempranillo y Prieto Picudo** tomados a los 90 minutos desde el momento de inicio de la reacción. Debido a la coloración rojiza del mosto, existe un solapamiento entre la banda de absorción del mosto y el plasmón de las nanopartículas; por esta razón, se han registrado unos espectros de control de los mostos llevando a cabo la dilución de los mismos con agua hasta obtener la misma dilución final a la que se ha llegado al mezclar mosto con la disolución de Au^{3+} . Con la finalidad de observar la banda del plasmón de las nanopartículas sintetizadas se han restado los espectros del mosto a los de la disolución de nanopartículas de oro.

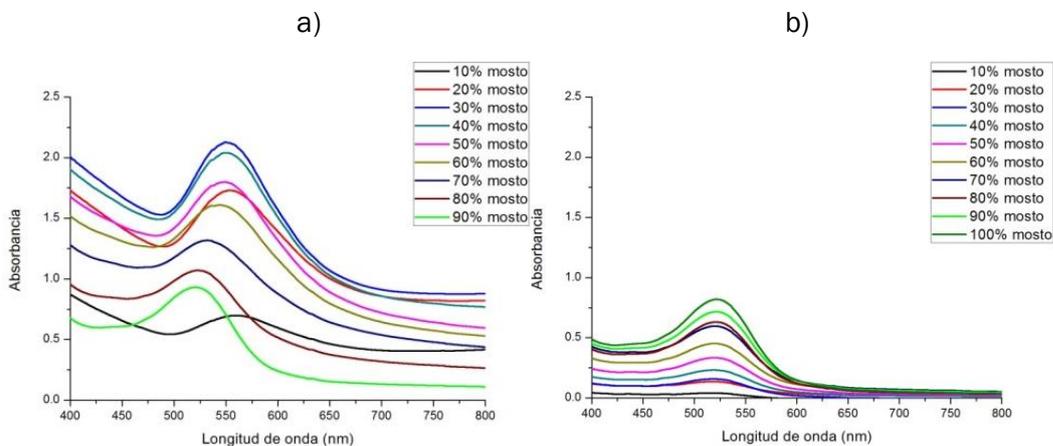


Figura 27. Espectro UV-Visible de a) Mezclas de Au^{3+} y mosto de la variedad Tempranillo mezclado en proporciones 10-100% b) Mosto de la variedad Tempranillo diluido en las mismas proporciones.

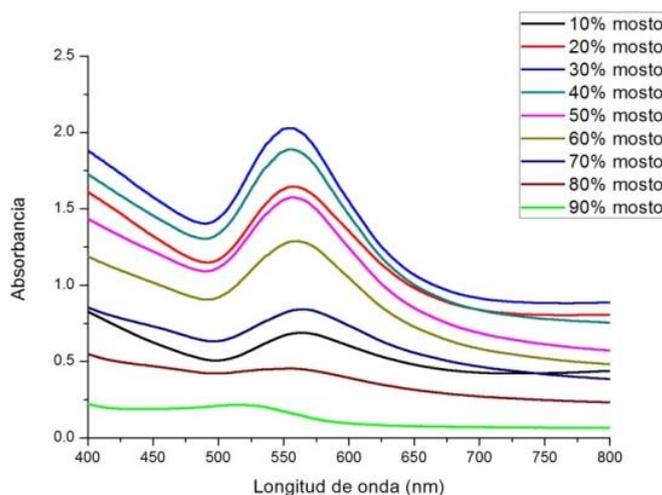


Figura 28 Espectro UV-Visible resultante de la resta de los espectros anteriores.

Analizando con mayor detenimiento el espectro UV-Visible de la Figura 28, se observa la presencia de la banda plasmónica de resonancia en torno a una longitud de onda de 560nm, por lo cual se puede confirmar la obtención de nanopartículas de oro mediante reducción de HAuCl_4 empleando el mosto de la variedad Tempranillo como agente reductor.

Observando la Figura 28 se demuestra que con esta variedad de uva se obtienen nanopartículas cuando se utilizan porcentajes entre el 10% y el 70% de mosto en la solución. Con un 80 y un 90% de mosto se observa que no se sintetizan nanopartículas y que el plasmón que aparecía en la Figura 27 a), en torno a 525nm, se debe a la absorbancia del propio mosto.

Como se ha comentado en la introducción teórica, la absorbancia del pico está relacionada con la concentración o cantidad de nanopartículas sintetizadas, y la longitud de onda en la que éste se encuentra con su tamaño. El desplazamiento del pico máximo de absorción depende de varios factores tales como el pH, la temperatura, el volumen de agente reductor utilizado, etc.; Por regla general, al emplear un mayor volumen de agente reductor el desplazamiento del plasmón se produce hacia menores longitudes de onda resultando nanopartículas de menor tamaño. Con esta variedad se verifica esta teoría para porcentajes menores de un 30% de mosto en la mezcla (Figura 29). Sin embargo, la diferencia entre las bandas se debe fundamentalmente a su intensidad, la cual se incrementa cuando se utiliza una proporción de mosto en la mezcla menor de un 30% (de 10 a 30%) y disminuye con proporciones mayores (de 30 a 90%) (Figura 30).

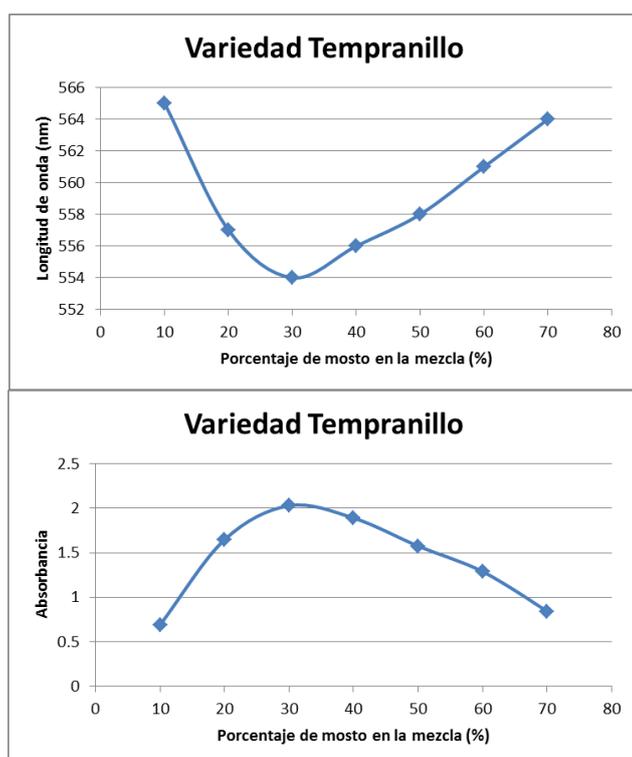


Figura 29. Longitud de onda frente al tiempo de las nanopartículas obtenidas con la variedad Tempranillo en distintas proporciones.

Figura 30. Absorbancia frente al tiempo de las nanopartículas obtenidas con la variedad Tempranillo en distintas proporciones.

Los espectros UV-Visible de las nanopartículas de oro obtenidas mediante la variedad de uva **Prieto Picudo** son los siguientes:

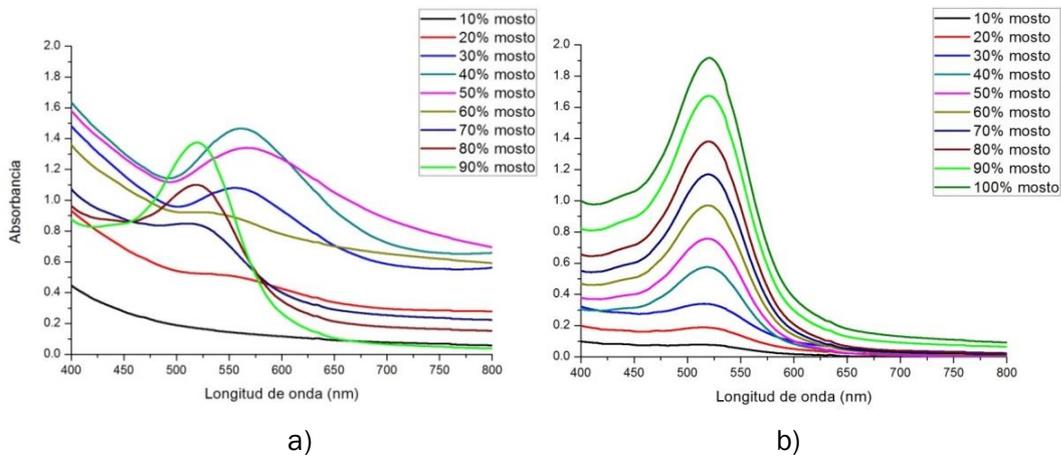


Figura 31. Espectro UV-Visible de a) Mezclas de Au³⁺ y mosto de la variedad Prieto Picudo mezclado en proporciones 10-100% b) Mosto de la variedad Prieto Picudo diluido en las mismas proporciones.

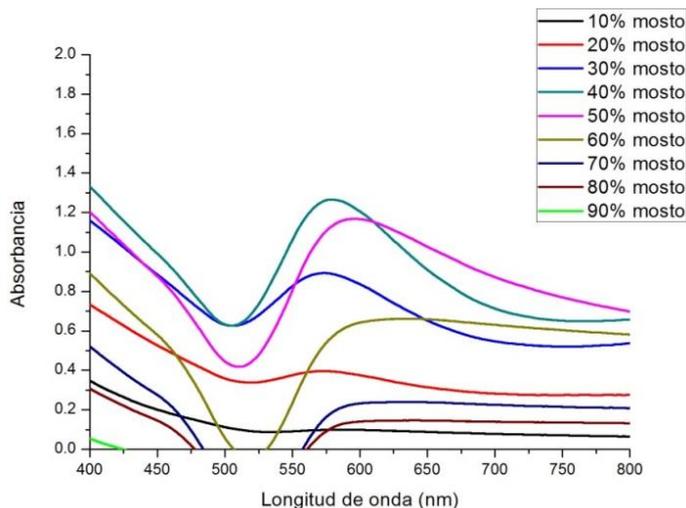


Figura 32. Espectro UV-Visible resultante de la resta de los espectros anteriores.

El análisis mediante espectroscopia UV-Visible muestra las bandas de resonancia del plasmón de superficie características de las nanopartículas de oro (Figura 32). En algunos casos estos espectros toman valores negativos de absorbancia debido a la resta del espectro del mosto.

Con esta variedad se obtienen nanopartículas solamente con las proporciones del 30%, 40% y 50% de agente reductor en la mezcla, curvas azul, verde y rosa respectivamente (Figura 32). Con un 70, 80 y 90% de

mosto en la solución se demuestra que no se sintetizan nanopartículas ya que la absorción que aparecía en la Figura 31 a), en torno a 520nm, se debe al mosto que no ha reaccionado.

Las Figuras 33 y 34 representan el desplazamiento que sufre el plasmón de resonancia en función de la proporción de agente reductor utilizado. Para la cantidad más baja de volumen de mosto en la mezcla (30%), el máximo de la banda del plasmón aparece centrado alrededor de 573 nm. A mayores porcentajes, al contrario de lo que apunta la teoría, se presentó un desplazamiento hacia longitudes de onda más grandes, por ende se puede deducir un aumento en el tamaño de partícula. En nuestro caso, debido a la complejidad molecular de los mostos, se pueden producir agregados que incumplan la teoría.

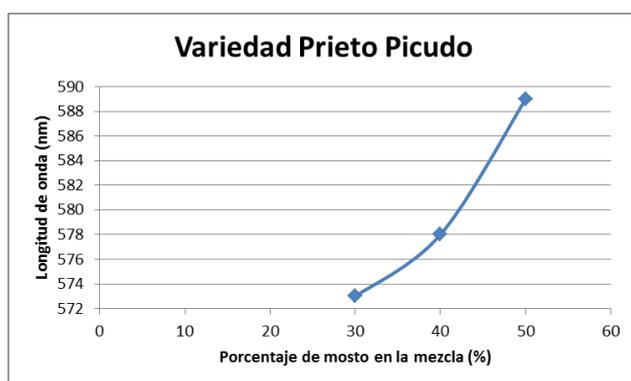


Figura 33. Longitud de onda frente al tiempo de las nanopartículas obtenidas con la variedad Prieto Picudo en distintas proporciones

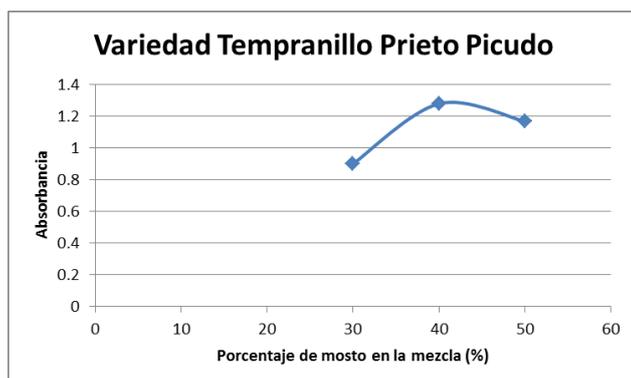


Figura 34. Absorbancia frente al tiempo de las nanopartículas obtenidas con la variedad Prieto Picudo en distintas proporciones

Los espectros correspondientes a las nanopartículas obtenidas con el resto de variedades de uva se encuentran en el anexo del presente proyecto. El comportamiento es similar en todos ellos.

Como resumen, se ha realizado una tabla donde se comparan las proporciones de cada variedad de uva que nos permiten sintetizar nanopartículas:

	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%
Prieto Picudo	x	x	✓	✓	✓	x	x	x	x
Tempranillo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x
Mencía Secano	x	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x
Mencía Regadío	x	x	x	✓	✓	✓	x	x	x
Rufete	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x
Cabernet	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x
Garnacha	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x
Juan García	x	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x

Tabla 5. Nanopartículas de oro obtenidas con las distintas variedades de mosto.

Estudiando los espectros de todas las variedades de mosto, se concluye que una proporción del 50% de agente reductor en la mezcla es la mejor opción para diseñar un sensor óptico que mida la cantidad de agente reductor que contiene el mosto, puesto que con esta proporción se obtienen nanopartículas de oro en todas las variedades.

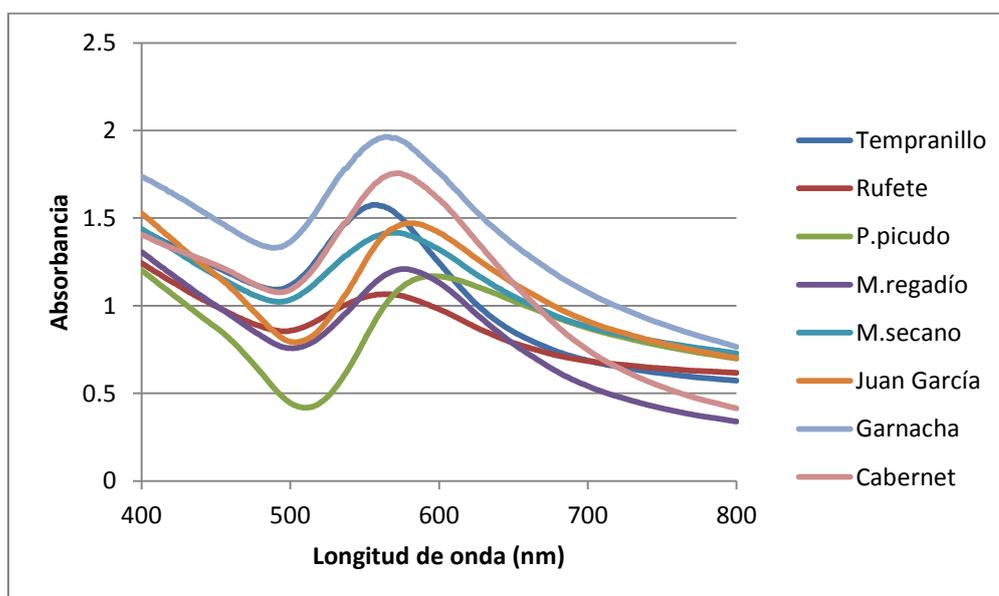


Figura 35. Plasmones de las distintas variedades con el 50% de mosto en la solución.

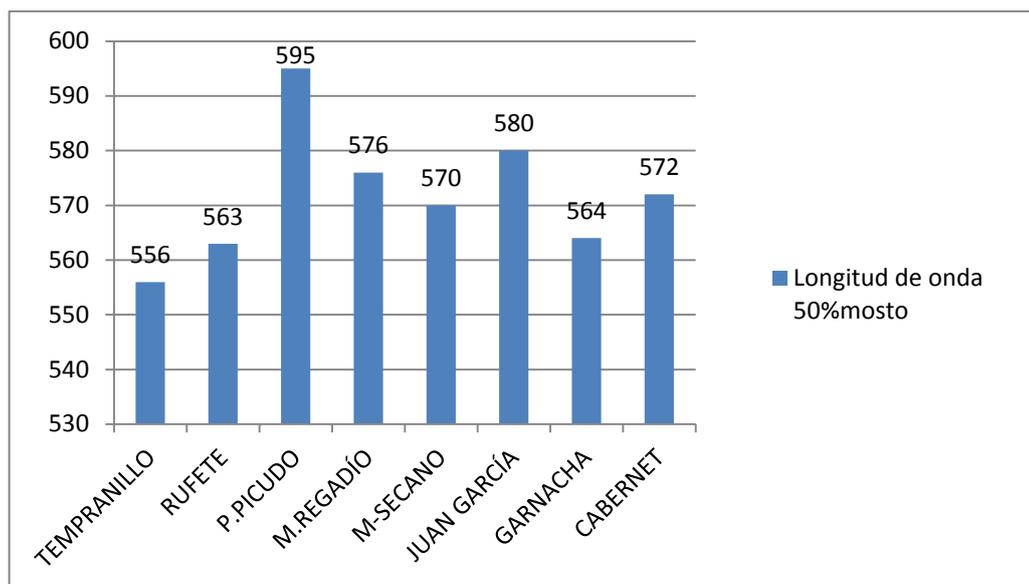


Figura 36. Relación entre la longitud de onda de las distintas variedades con el 50% de mosto en la solución.

En la figura 36 se comparan los tamaños de las nanopartículas obtenidas con cada variedad de mosto utilizado. Se observa que las nanoestructuras de mayor tamaño son las que se obtienen a partir de la variedad Prieto Picudo ya que son las que se encuentran a mayor longitud de onda (595nm). Las de menor tamaño se obtienen con la variedad Tempranillo como agente reductor (556nm).

Tal y como dice la teoría, las nanopartículas de menor tamaño se forman al emplear mayor volumen de agente reductor en la reacción.

4.2.2. Cinética de reacción y estabilidad

Con el fin de obtener una mayor información sobre el mecanismo de formación de las nanopartículas de oro, se ha llevado a cabo un estudio de la evolución de la reacción con el tiempo, mediante espectroscopia UV-visible, durante 4 horas a partir del momento en que se agregó el agente reductor.

Inicialmente nos centraremos en la variedad **Prieto Picudo**. Los resultados obtenidos de la evolución del plasmón durante el tiempo de reacción se muestran en la Figura 37. A la vista de los resultados, se observa que aumenta la absorbancia a medida que transcurre el tiempo de reacción y por tanto el número de nanopartículas de oro en la solución coloidal. Además, se ha comprobado que la absorbancia y la velocidad de la misma dependen de la variedad de mosto y de la concentración del mismo utilizado.

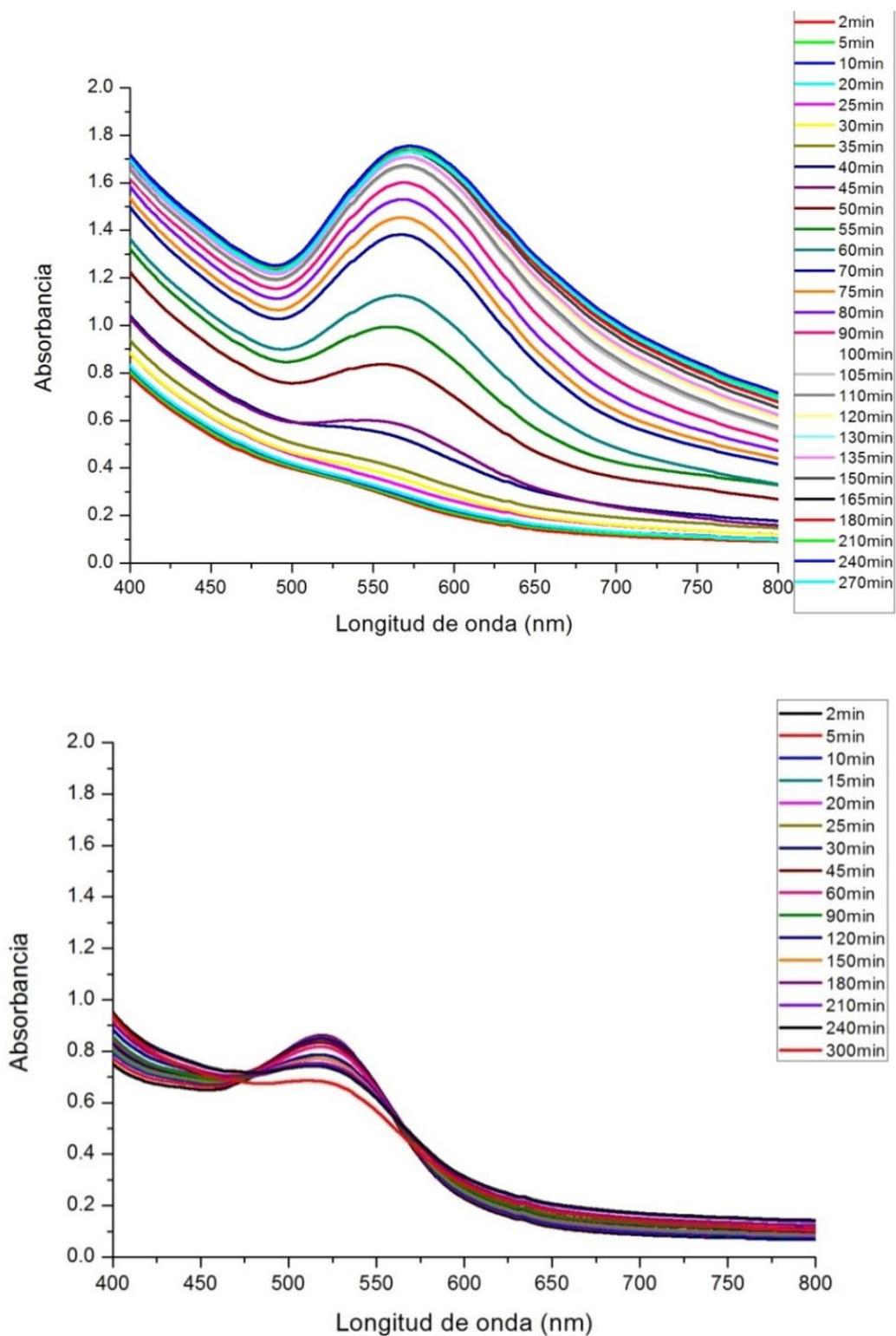


Figura 37. Espectro UV-visible de las cinéticas de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Prieto Picudo.

Con el objetivo de evaluar mejor la cinética de la reacción, se ha procedido a representar la absorbancia frente al tiempo (Figura 38) y la variación de la longitud de onda frente al tiempo (Figura 39).

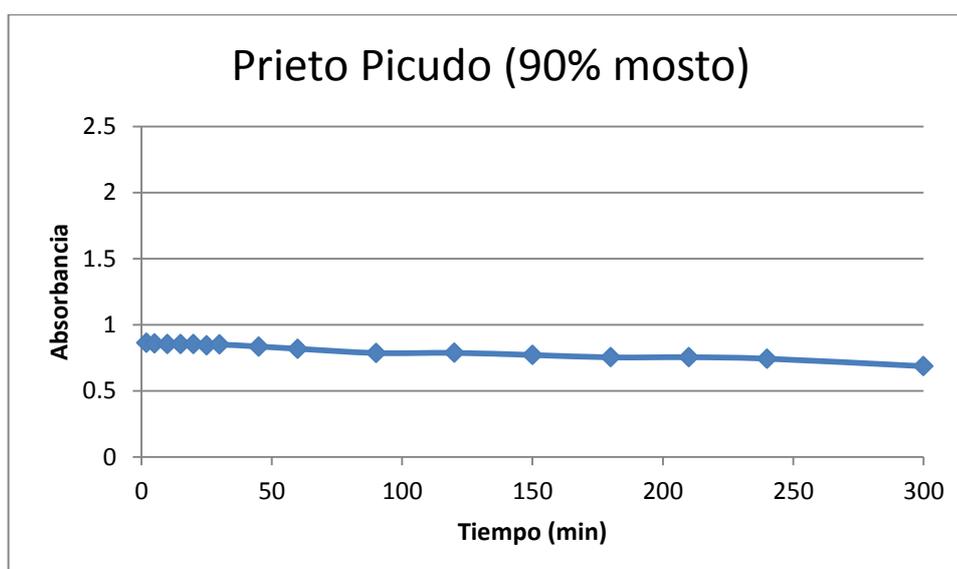
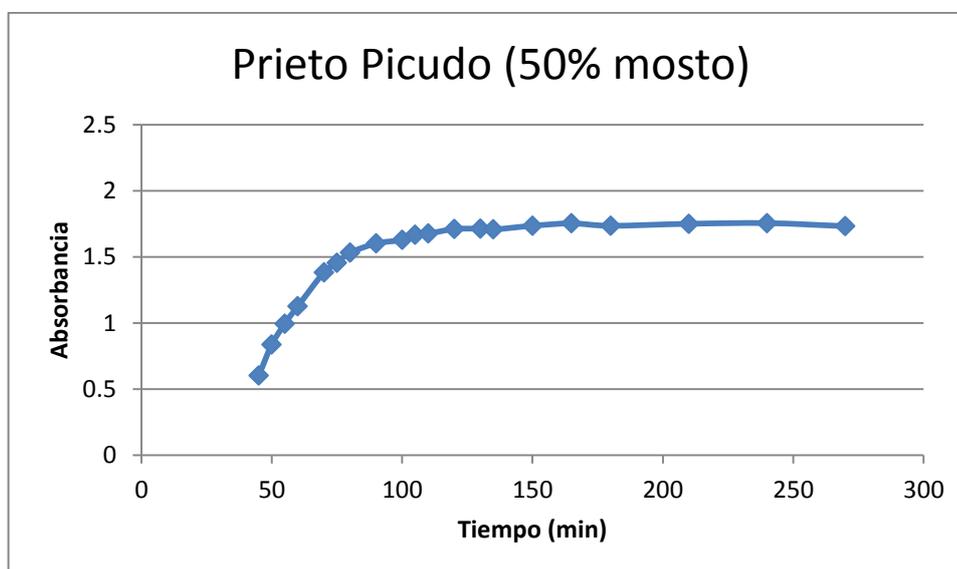


Figura 38. Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Prieto Picudo.

Con la proporción de 50% de mosto en la solución se ha observado un incremento de la intensidad de la banda del plasmón en el tiempo hasta llegar a la estabilización a unos 100min aproximadamente. Esta estabilidad se debe a que el mosto no solo actúa como agente reductor, sino que ejerce

un efecto protector de las nanopartículas sintetizadas frente a su agregación (Figura 38, imagen superior).

Con una proporción del 90% de agente reductor en la solución (Figura 38, imagen inferior), la intensidad de la banda se mantiene estable debido a que el plasmón de resonancia que aparece en el espectro es el correspondiente al mosto y no a la formación de nanopartículas. Como la cantidad de precursor en la muestra es muy pequeña no se consiguen sintetizar nanopartículas, tal y como se observó en la Figura 31 y 32.

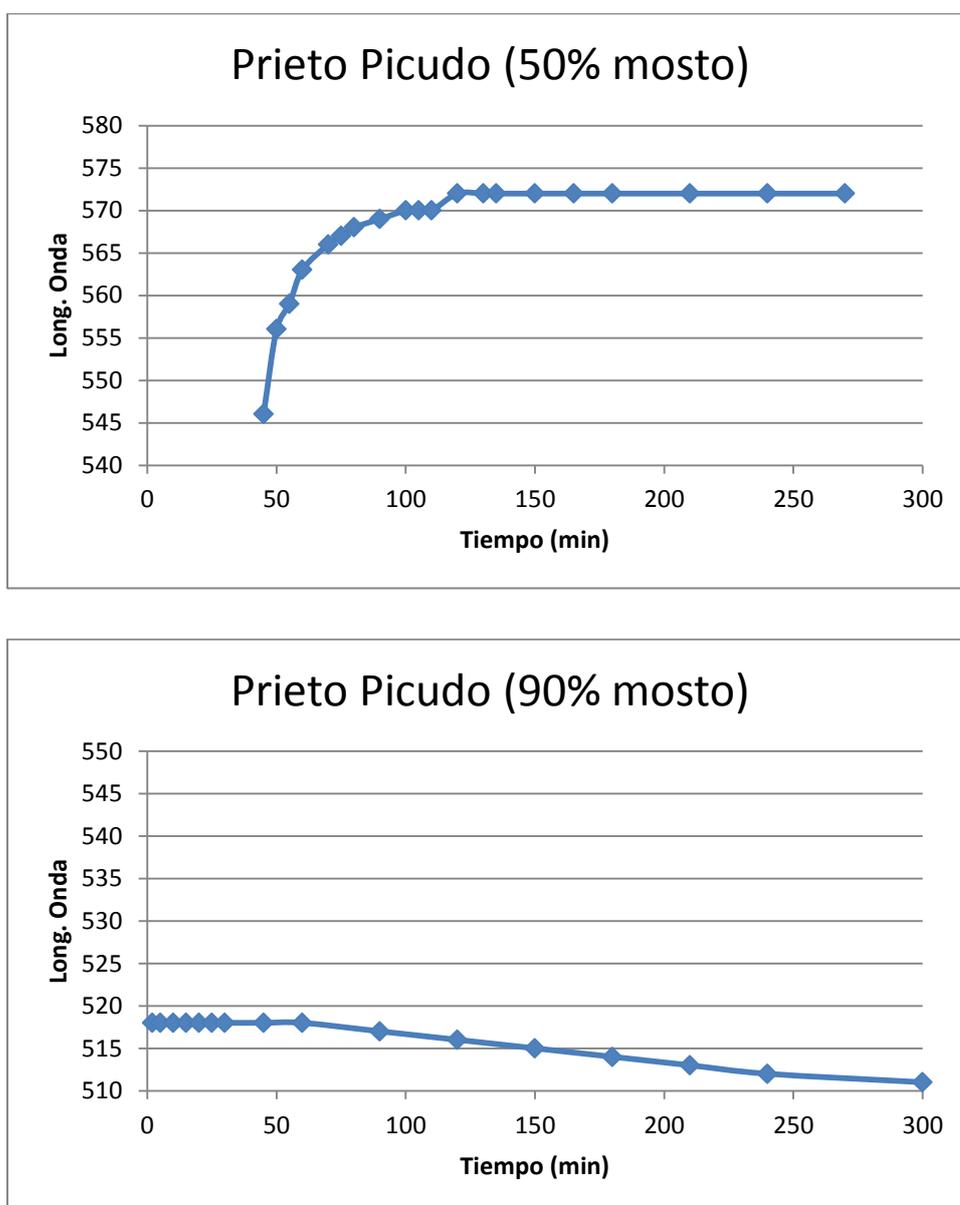


Figura 39. Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Prieto Picudo.

En la imagen superior de la Figura 39 se observa que, con una concentración de 50% de mosto, la posición del plasmón se desplaza a mayores longitudes de onda conforme transcurre el tiempo de reacción, hasta finalmente estabilizarse a unos 120 minutos. Este desplazamiento de la longitud de onda hacia mayores valores supone un aumento del tamaño de las nanopartículas.

Con un 90% de mosto en la solución (Figura 39 imagen inferior), la longitud de onda se mantiene más o menos estable ya que, como se dijo anteriormente, el plasmón que se obtiene es el correspondiente al mosto. Por tanto, con un 90% de agente reductor no se consiguen sintetizar nanopartículas, o bien, se sintetiza una pequeña cantidad de éstas.

Se ha intentado hacer la cinética de esta variedad con el 10% de mosto pero, como se observó en la Figura 25, el cambio de color se percibe después de tres días por lo que es muy difícil seguir la reacción.

En el caso de la variedad **Tempranillo** se ha conseguido seguir la cinética de la mezcla con un 10% de mosto en la reacción debido a que ésta ocurre lentamente y se estabiliza a las pocas horas. A continuación nos centraremos en esta variedad:

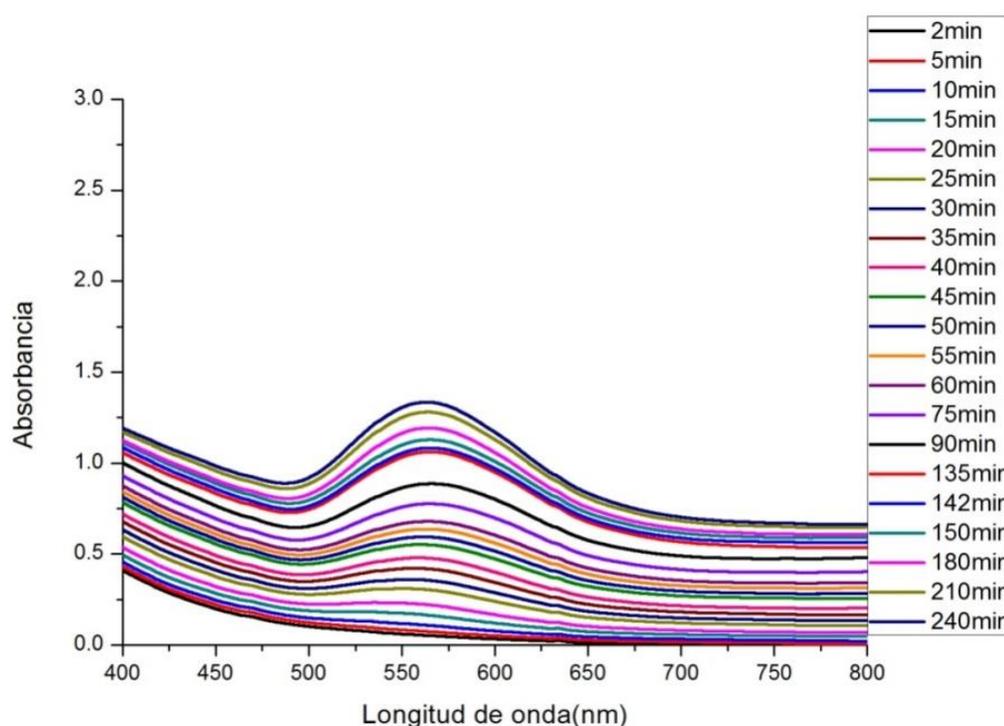


Figura 40. Espectro UV-visible de las cinéticas de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 10% de mosto de la variedad Tempranillo.

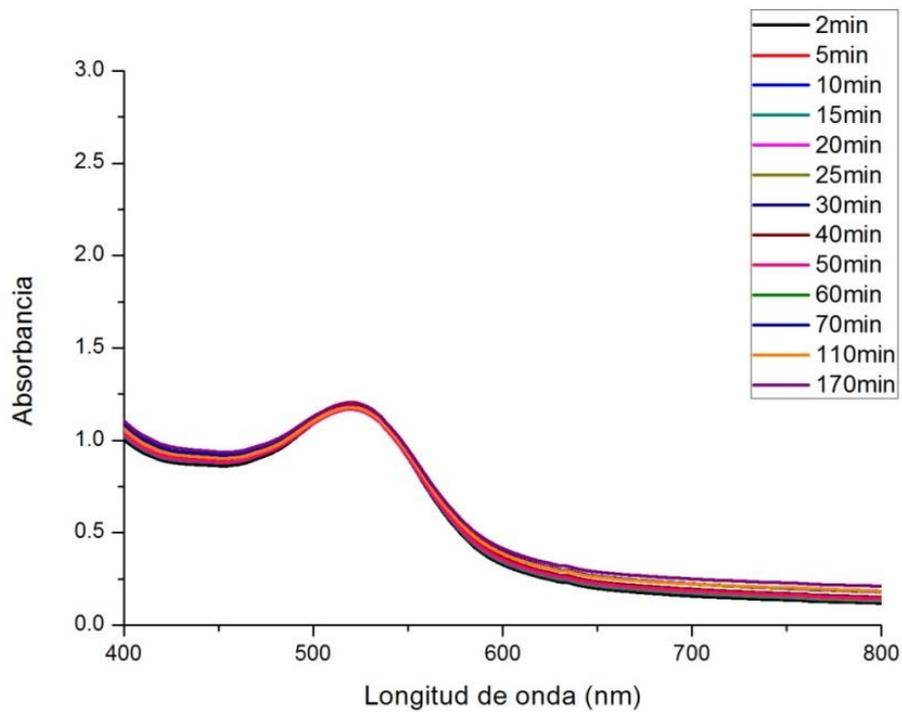
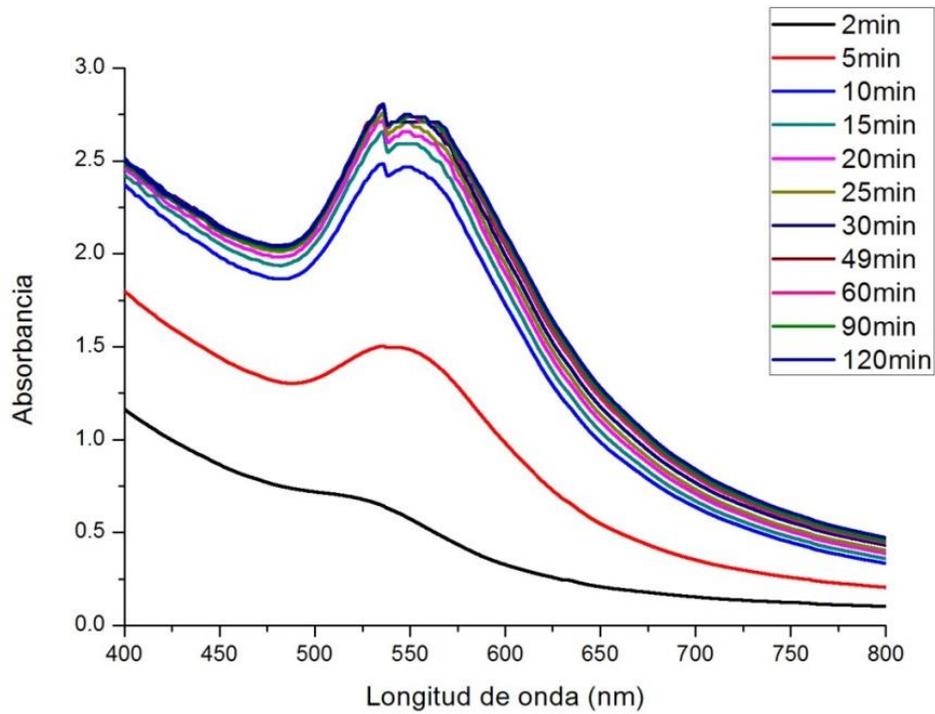


Figura 41 - Espectro UV-visible de las cinéticas de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Tempranillo

Con el fin de valorar mejor la cinetica de la reacción se ha procedido a representar la absorbancia y la longitud de onda frente al tiempo (Figura 42-47):

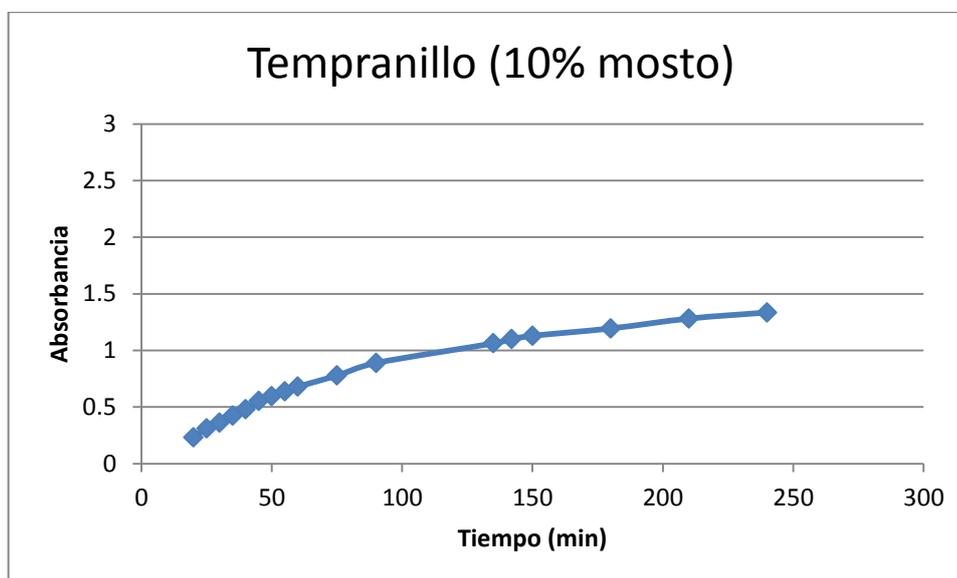


Figura 42. Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 10% de mosto de la variedad Tempranillo.

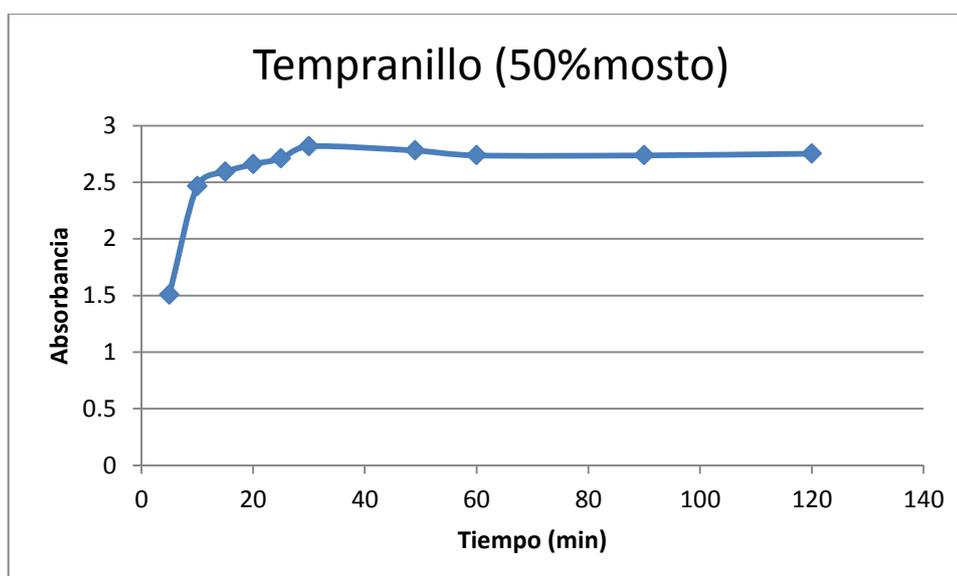


Figura 43. Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto de la variedad Tempranillo.

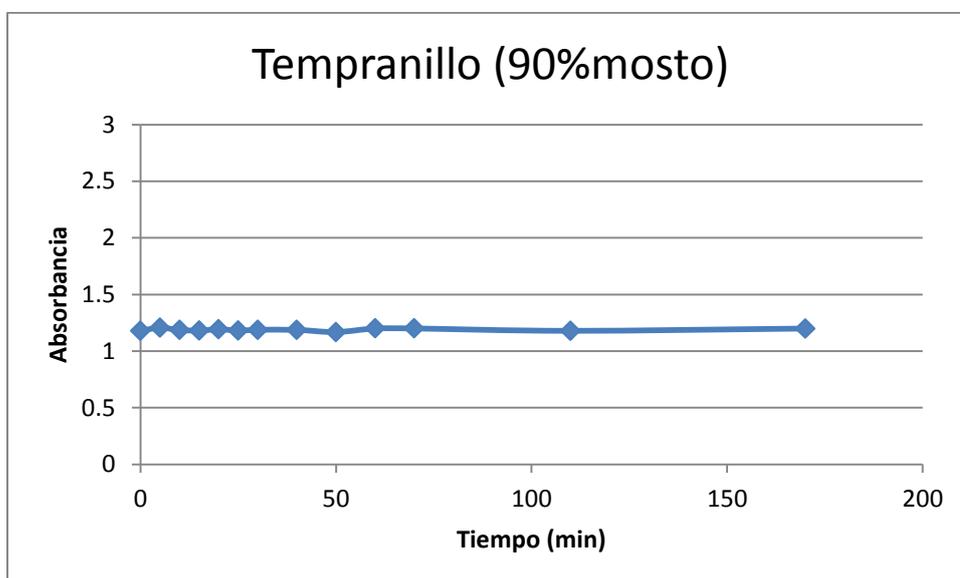


Figura 44. Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 90% de mosto de la variedad Tempranillo.

Con un 50% de mosto en la disolución, el comportamiento de la reacción de formación de las nanopartículas de oro sintetizadas es el mismo que en la variedad Prieto Picudo. Igualmente, se produce un incremento de la absorbancia en función del tiempo hasta estabilizarse a los 30 minutos (Figura 43).

Con una proporción del 90% de agente reductor no se consiguen sintetizar nanopartículas. La banda del plasmón de resonancia que aparece en el espectro es la correspondiente al mosto, por ello su intensidad se mantiene más o menos estable (Figura 44). La reacción se da casi instantáneamente por la poca cantidad de precursor que existe en la mezcla reaccionante, dando lugar a la ausencia de nanopartículas, o bien, a la formación de una muy pequeña cantidad de éstas.

En el caso de un 10% de mosto en la disolución (Figura 42) la absorbancia aumenta en el tiempo de manera continua sin poderse llegar a apreciar la estabilización en el tiempo, puesto que la reacción necesitaría más tiempo de experimentación del que se representa en la gráfica.

A continuación se representan las longitudes de onda frente al tiempo:

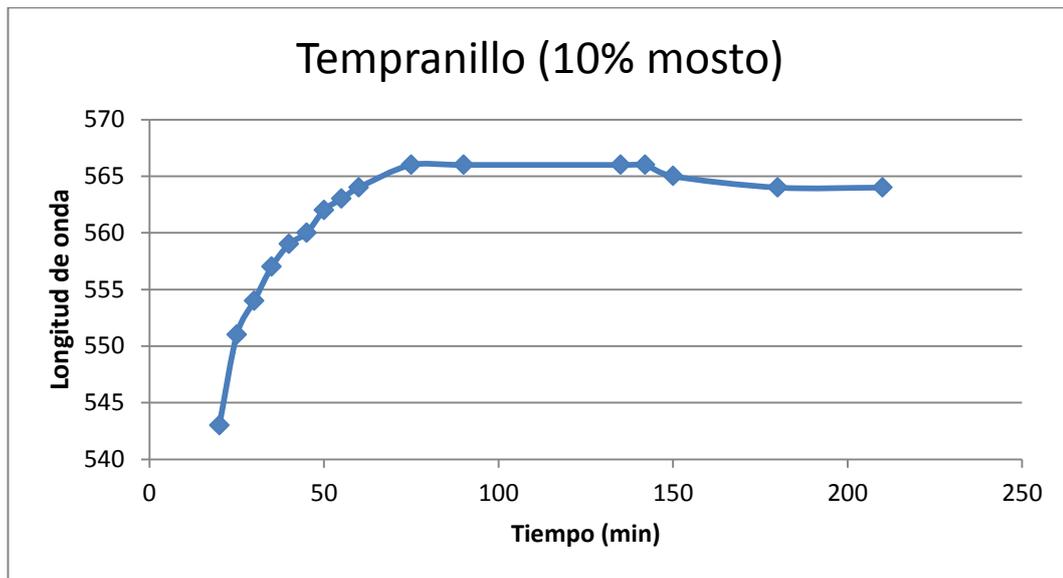


Figura 45. Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 10% de mosto de la variedad Tempranillo.

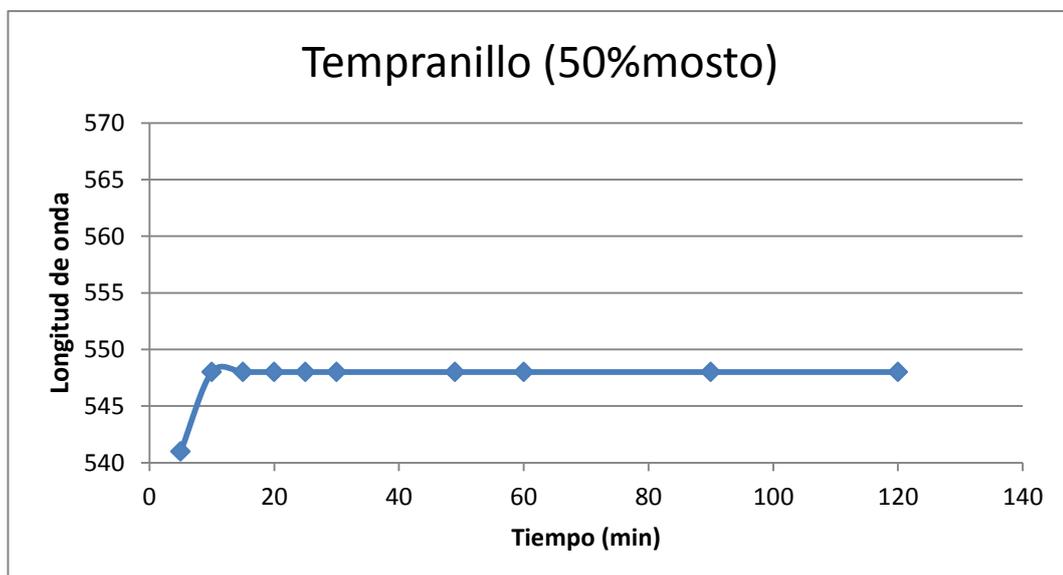


Figura 46 -Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto de la variedad Tempranillo.

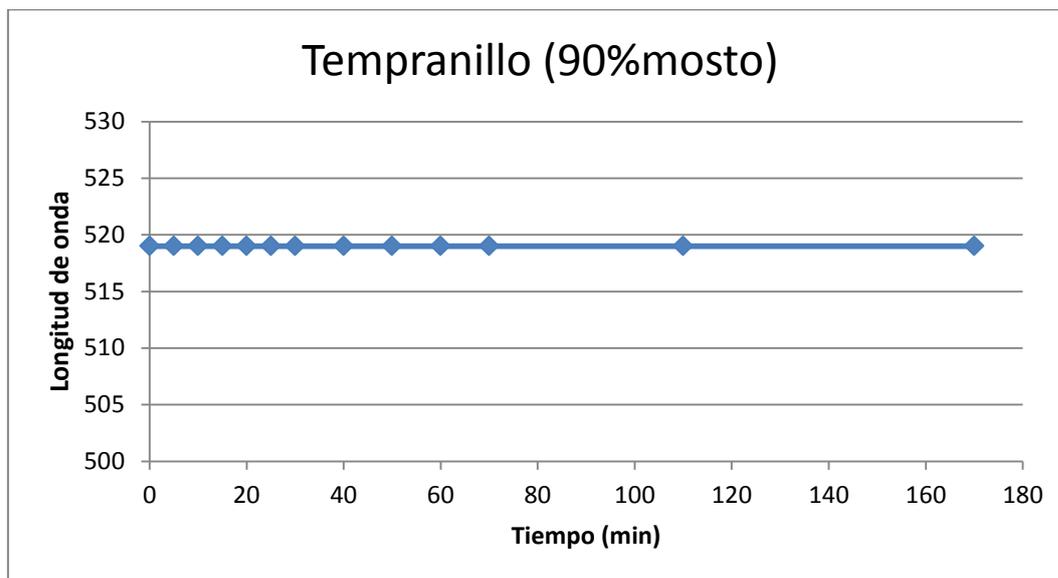


Figura 47 –Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 90% de mosto de la variedad Tempranillo.

Cuando hay un 10% de mosto en la mezcla, existe mucha cantidad de precursor en la disolución, lo que hace que las nanopartículas aumenten su tamaño muy lentamente hasta estabilizarse. Con un 50% de mosto en la disolución el crecimiento de las nanopartículas se produce rápidamente. Y en el caso de un 90% de mosto, no existe formación de nanopartículas, manteniéndose estable el plasmón en torno a 519nm, longitud de onda correspondiente al mosto.

El resto de cinéticas se pueden encontrar en el anexo del presente proyecto. En todos los casos el comportamiento de la absorbancia y de la longitud de onda frente al tiempo es el mismo.

Se ha comparado la cinética de cada una de las variedades de mosto utilizando la pendiente obtenida en las representaciones de absorbancia frente al tiempo. De esta manera se ha analizado la velocidad de reacción de la síntesis de nanopartículas con las diferentes variedades de mosto desde el comienzo de la medida con el espectrofotómetro (2 minutos desde la mezcla de reactivos) hasta el momento en el cual se estabiliza su absorbancia.

El resultado ha sido el siguiente:

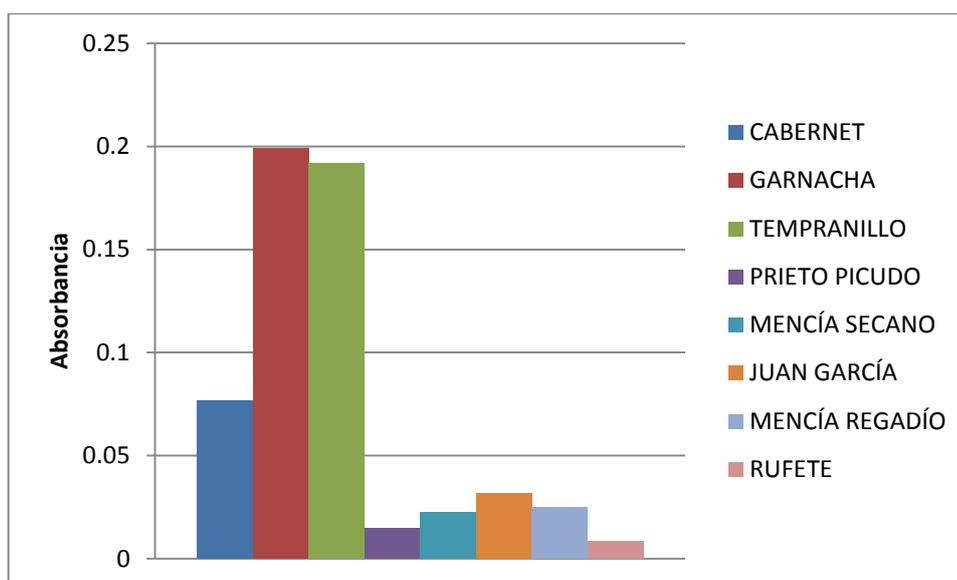


Figura 48. Pendiente de estabilización de la absorbancia de las nanopartículas sintetizadas con distintas variedades de mosto

En esta figura se demuestra que la formación de las nanopartículas obtenidas utilizando la variedad Garnacha como agente reductor es la más rápida, es decir, las nanopartículas tardan menos tiempo en llegar a la estabilización de la absorbancia. De igual forma, se puede comprobar que la variedad rufefe es la más lenta.

5.2.3. Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión

Otra manera de caracterizar las nanopartículas de oro es usando microscopía electrónica de transmisión, con la que se consigue ver estructuras de tamaño nanométrico.

Las imágenes obtenidas mediante esta técnica fueron utilizadas para estudiar la distribución de tamaño y las formas de las nanopartículas de oro, sintetizadas a temperatura ambiente, a partir del mosto elaborado con la variedad de uva tempranillo para las proporciones 50 y 90% de mosto.

En un primer momento, se tomaron imágenes en el microscopio Jeol Jem-1011HR (Figuras 49 y 50). En estas micrografías se observan nanopartículas de oro de tamaño del orden de nanómetros distribuidas de manera homogénea en la superficie.

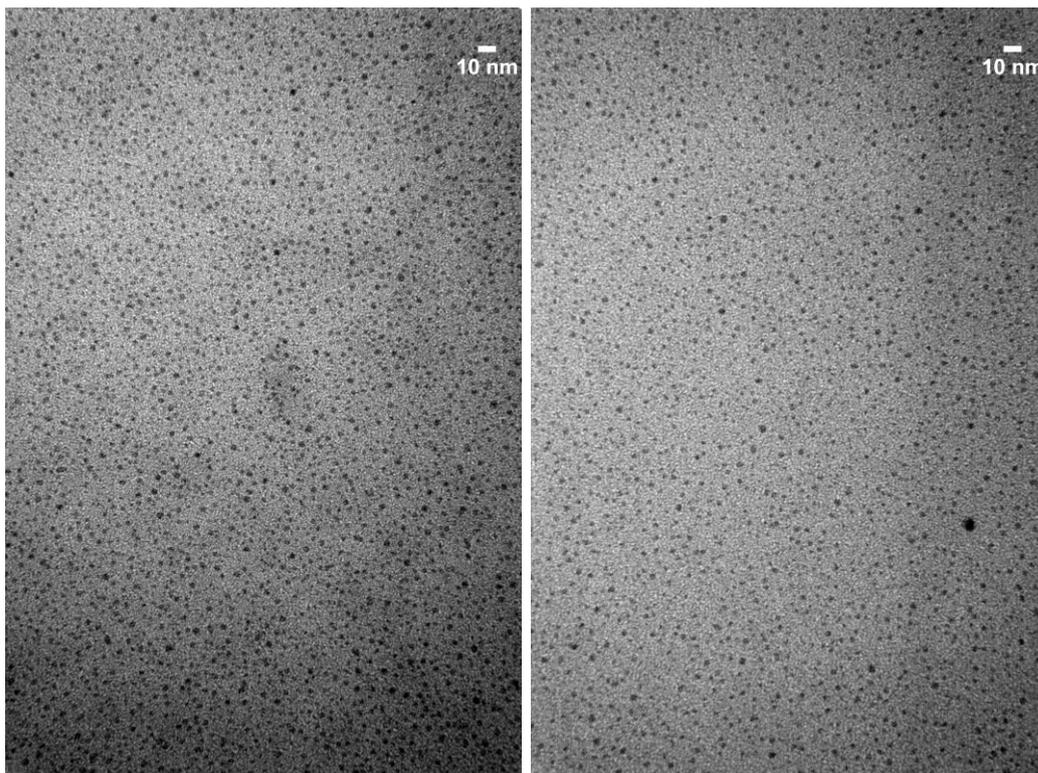


Figura 49. Micrografía de las AuNP's con un 50% de mosto tempranillo (derecha) y un 90% de mosto tempranillo (izquierda) tomadas con el microscopio Jeol Jem-1011HR a 80Kv a 500000X.

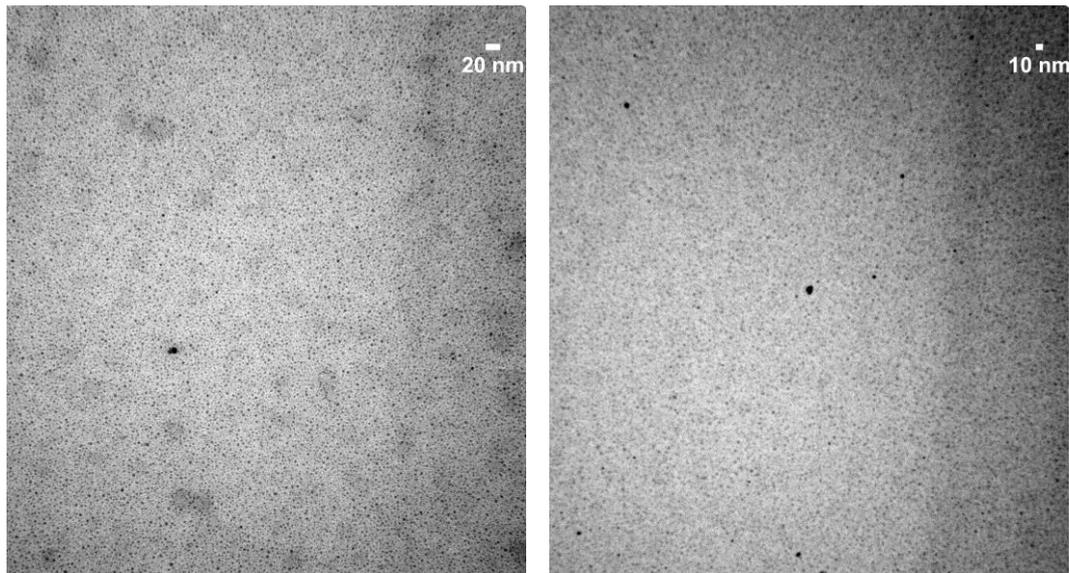


Figura 50. Micrografía de las AuNP's con un 50% de mosto tempranillo (derecha) y un 90% de mosto tempranillo (izquierda) tomadas con el microscopio Jeol Jem-1011HR a 80Kv a 200000X.

Con el fin de mejorar la resolución de las imágenes, se utilizó un microscopio unifocal con el que se logró aumentar la resolución (Figuras 51 y 52).

En la Figura 52 también se muestra la micrografía de la rejilla con el fin de interpretar mejor la imagen.

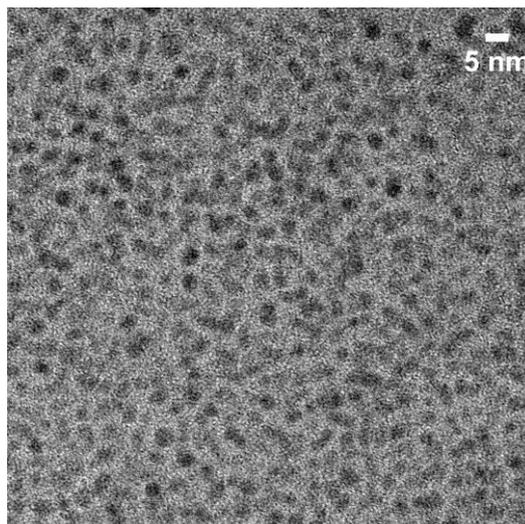
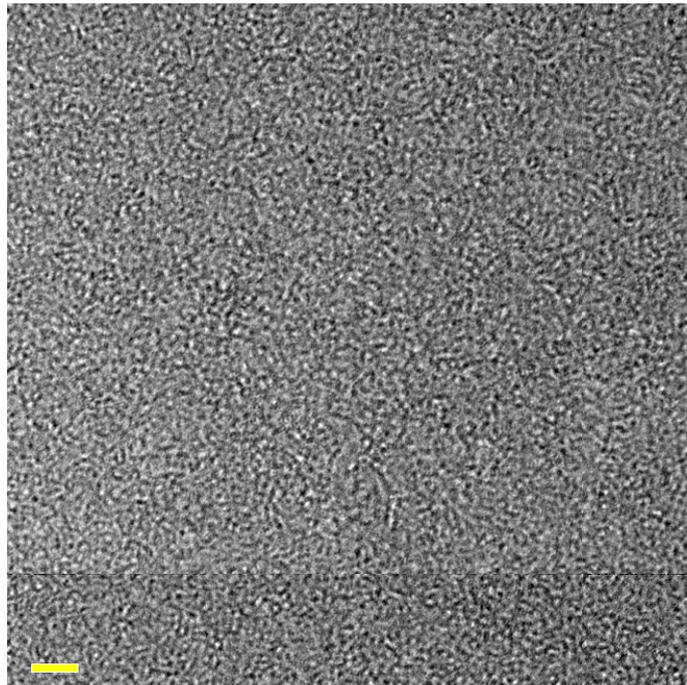
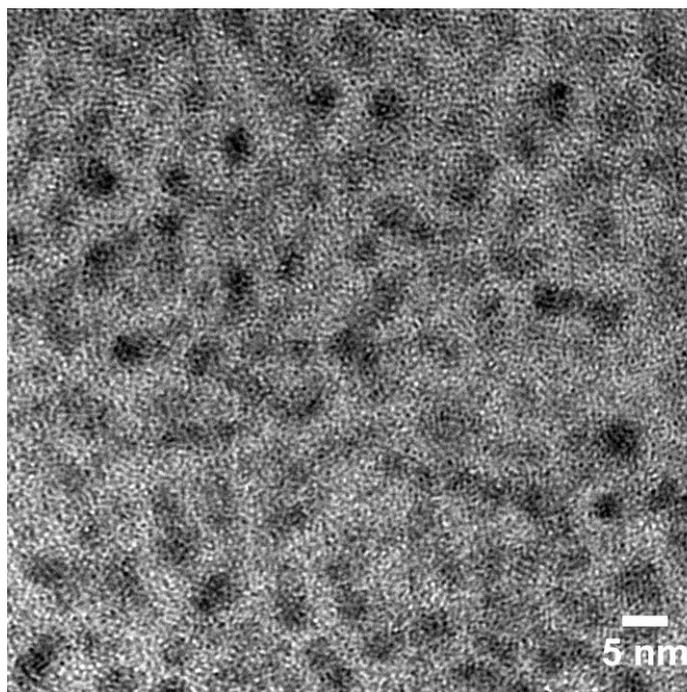


Figura 51. Micrografía de las AuNP's con un 50% de mosto tempranillo tomadas con el microscopio Jeol Jem-FS2200 HRP a 200Kv a 200000X.



a) Rejilla de carbono 200KV- 300000X



b) AuNP's 200KV-300000X

Figura 52. a) micrografía de la rejilla de carbono. b) micrografía de la rejilla de carbono con Las AuNP's con un 50% de mosto tempranillo tomadas con el microscopio Jeol Jem-FS2200 HRP a 200Kv a 300000X.

Los resultados obtenidos mediante microcopia electrónica de transmisión determinaron que, mediante el método de reducción química y bajo las condiciones de síntesis establecidas en el diseño experimental, es posible obtener nanopartículas de oro de pequeñas dimensiones (3nm de tamaño aproximadamente) denominadas nanoclusters. Asimismo se pudo observar la prevalencia de nanopartículas de forma esferoidal y con una baja distribución de tamaños.

También se observa que las distintas muestras de mosto analizadas presentan nanoclusters de tamaños semejantes.

Además, se puede destacar la uniformidad en el tamaño de las nanopartículas (monodispersidad). La uniformidad en el tamaño es una característica esencial en la fabricación de dispositivos basados en el empleo de AuNP's que proporcionen medidas estables y reproducibles, como en el caso de los sensores.

Se observa que los nanoclusters prácticamente se encuentran sin formar agregados. Incluso se pudo apreciar detalles estructurales y morfológicos, como la existencia de facetas bien definidas que no se pueden apreciar claramente en estas fotos, pero que se observaron con aumentos de 400000X durante el estudio de las muestras.

4.2.4. Análisis estadístico

Los cambios de posición en los picos e intensidad en las señales se deben a las diferentes características de las muestras analizadas. Además, los volúmenes de sal de oro empleados (500 μ l y 100 μ l) pueden ser considerados como señales representativas del tipo de uva, presentando cada una de las variedades de uva una respuesta particular para cada uno de los volúmenes añadidos a la mezcla de reacción.

Los datos que proporciona la red de señales pueden ser utilizados para discriminar y clasificar las distintas variedades de mosto mediante análisis multivariante. El método de análisis de componentes principales (PCA) (42) se trata de una técnica muy conocida y utilizada para el procesamiento de conjuntos de datos multivariantes de medidas experimentales. Es una técnica estadística que reduce la cantidad de datos a una serie de componentes principales que sean combinaciones lineales de las variables originales que describen cada muestra, sin perder información importante. Como es lógico, estos componentes principales se eligen de tal manera que la primera componente principal (PC1) recoja la mayor parte de la variación que hay en el conjunto de datos, la segunda (PC2) la siguiente mayor parte de la variación y así sucesivamente, de tal manera que cuando exista una correlación significativa, sucederá que el número de componentes principales útiles será mucho menor que el número de variables originales, reduciendo así en gran medida la cantidad de datos a manejar.

Las medidas experimentales se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos fueron pretratados empleando el método kernel desarrollado en nuestro grupo (Figura 53). Para ello, los espectros obtenidos fueron estandarizados a media cero y varianza unidad para que todos ellos tuvieran el mismo peso en el tratamiento estadístico, evitando así que una única variable controle la información proporcionada por una de las componentes principales. Las curvas normalizadas son divididas en 10 partes denominadas kernels y estos diez valores son empleados como matriz de entrada del tratamiento estadístico realizado en el programa informático Matlab.

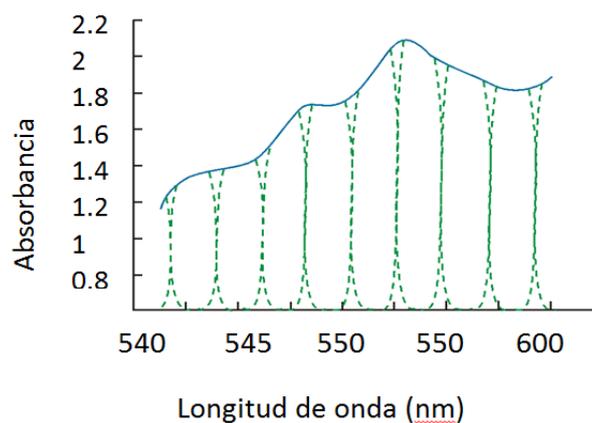


Figura 53. Método kernel

A continuación se explican los resultados alcanzados:

En el gráfico de scores en 3 dimensiones y 2 dimensiones (Figura 54 y 55) obtenido de la PCA, donde cada uno de los números simboliza a una variedad de mosto. Tenemos que la primera componente principal representa el 61.48% de la variación de la señal, la segunda componente aporta el 20.65% de la variación y la tercera componente principal explica hasta el 14.04% de la variación total de las muestras. De este modo, entre la primera, segunda y tercera componente se explica el 96.17% de la variación total de las muestras.

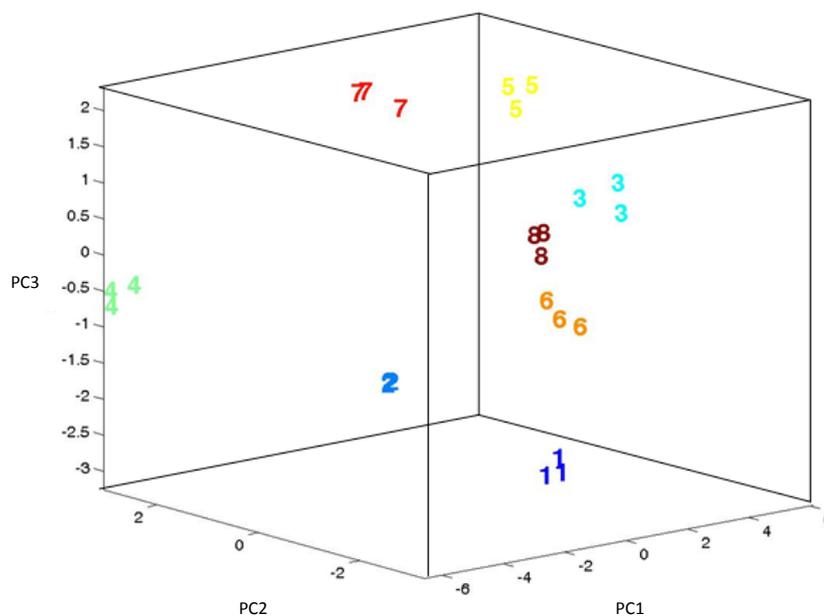


Figura 54. PCA (score) en 3D obtenido a partir de los datos obtenidos de los volúmenes 500 μ l y 100 μ l *

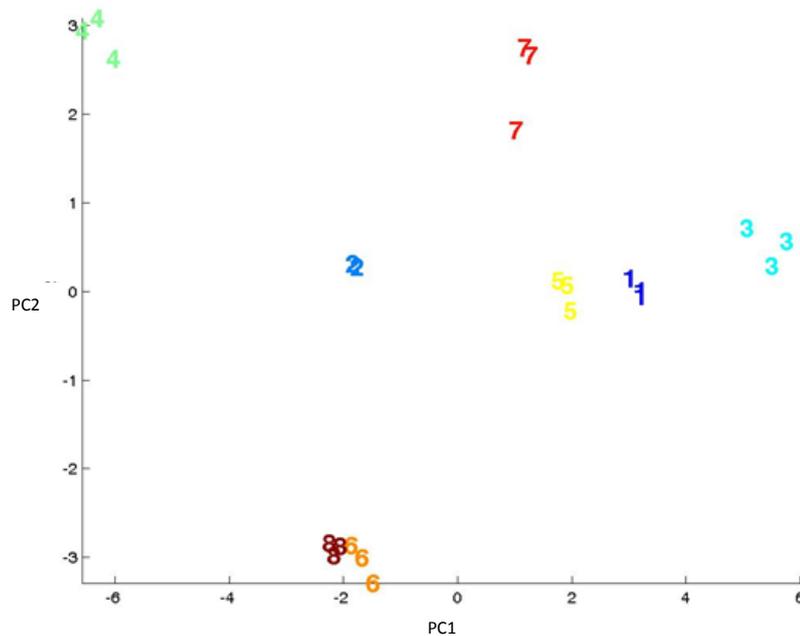


Figura 55. PCA (score) en 2D obtenido a partir de los datos obtenidos de los volúmenes 500µl y 100 µl *

(*Leyenda: 1: Garnacha, 2: Cabernet; 3: Mencia Regadío; 4: Mencia Secano; 5: Rufete; 6: Prieto Picudo; 7: Tempranillo; 8: Juan García)

En primer lugar se observa que las tres repeticiones realizadas para cada uno de los mostos aparecen agrupadas demostrando la buena reproducibilidad del método. Por otra parte, las diferentes variedades de uva se encuentran distribuidas a lo largo del gráfico, pudiéndose concluir que las señales representativas (ambos volúmenes de sal de oro) son capaces de discriminar las muestras analizadas.

Mediante el gráfico loadings (Figura 56) se puede comprobar la complementariedad de las señales teniendo en cuenta que cada una de ellas aporta un total de diez valores que provienen de cada uno de los diez kernels. Como se puede ver en la figura, los parámetros empleados presentan una alta complementariedad, ya que sus kernels se encuentran distribuidos en los cuatro cuadrantes del gráfico. En la parte derecha del gráfico encontramos los puntos correspondientes a las señales de 500µl y en la parte izquierda los relacionados con las señales de 100µl.

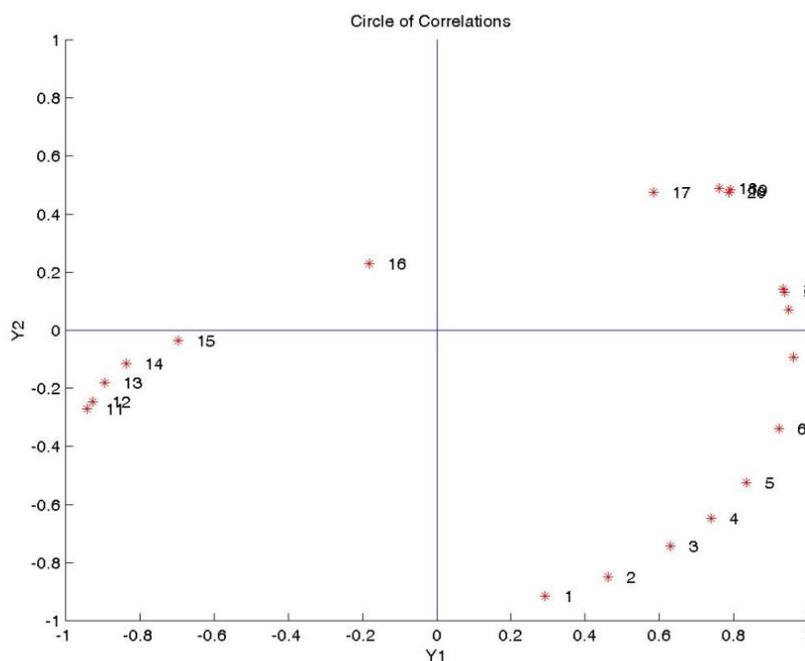


Figura 56. PCA (loading) obtenido a partir de los datos obtenidos de los volúmenes 500µl y 100 µl

A continuación se ha aplicado la técnica multivariante PLS para establecer correlaciones con propiedades de interés en los mostos:

La técnica PLS (regresión por mínimos cuadrados) utiliza un método de proyección basado en la reducción de variables por medio del PCA. Este método está fundamentado en algoritmos multivariantes lineales que, a partir de conjuntos de variables independientes X , construyen modelos de predicción de otras variables Y , que son conocidas. Esta técnica no está restringida a un número de variables determinado a modelar con respecto al número de objetos o muestras, pudiendo además establecerse predicciones o correlaciones entre una o varias variables dependientes simultáneamente.

Como se dijo anteriormente, los compuestos químicos en forma de azúcares y polifenoles son agentes reductores muy abundantes en el vino y juegan un papel muy importante en las características y calidad de éstos. Por ello, en esta investigación se ha empleado un análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares Regression Analysis, PLS) para el establecimiento de correlaciones entre la respuesta de las señales representativas de los tipos de uvas (resultados obtenidos con la PCA) y diversos parámetros fisicoquímicos de las muestras de mosto, como son el contenido polifenólico y los azúcares (Tabla 6).

	BRIX	Azúcar (gr/l)	pH	Ac. Total (gr/l)	Ac. Malico (gr/l)	Ac.Tartarico (gr/l)	IPT (Polifenoles)
Mencia Regadio	21.90	213.6	3.96	5.62	2.26	4.04	19
Mencia Secano	22.70	222.9	3.93	4.55	2.19	3.91	19
Rufete	20.20	194.2	3.37	9.08	3.47	4.52	27
Juan Garcia	19.80	189.7	3.39	8.61	3.25	3.77	24
Prieto Picudo	22.00	214.8	3.35	8.68	3.24	4.19	26
Garnacha	20.20	194.2	3.17	8.19	3.41	7.78	17
Tempranillo	22.80	224.1	3.30	6.53	2.65	6.41	24
Cabernet Sauvignon	22.40	219.5	3.17	6.30	2.93	5.44	14

Tabla 6. Datos del análisis químico

En la tabla 7 se recogen los resultados de los parámetros estadísticos para los modelos de regresión PLS. En términos generales las correlaciones entre las medidas de los sensores y los parámetros químicos (azúcares, IPT y Brix) no son las ideales. Es difícil explicar porque no existe una buena correlación con estos parámetros.

	RMSEP	RMSEC	Rp2	Rc2	VL
Azúcares	7.922544	4.987022	0.817359	0.92604	6
IPT	1.41765	0.971594	0.946383	0.974757	5
Brix	0.694737	0.437309	0.815204	0.92517	6

Tabla 7. Parámetros de la regresión PLS

Siendo:

- RMSEP: error medio cuadrático de predicción. Mide la capacidad de predicción de un modelo.
- RMSEC: error medio cuadrático de calibración. Esta medida informa sobre cómo de bien modelada es la variable a estimar por el conjunto de datos de calibración.
- Rp²: coeficiente de correlación de predicción.
- Rc²: coeficiente de correlación de validación
- VL: número de variables latentes
- IPT: índice de polifenoles totales
- Brix: concentración de azúcar en el mosto

4.3. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS SECUENCIALES

Se ha realizado un estudio de las muestras de la variedad de uva tempranillo cosechadas semanalmente desde el envero hasta la post-vendimia en el año 2014.

Se ha observado que las nanopartículas sintetizadas con la misma variedad de mosto pero en diferentes semanas de maduración presentan diferentes características. Esto se debe principalmente a los diferentes componentes reductores que contiene la uva en los distintos periodos.

4.3.1. Caracterización óptica

Las coloraciones obtenidas debido a la formación de nanoestructuras fueron muy similares para todas las semanas. Dos de los ejemplos tomados son los siguientes:



Figura 57: NPs sintetizadas con mosto tempranillo de la segunda semana de cosecha

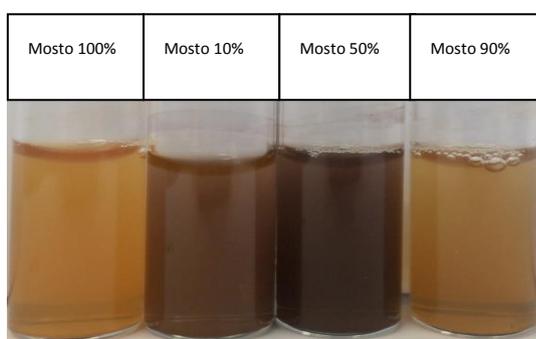


Figura 58: NPs sintetizadas con mosto tempranillo de la tercera semana de cosecha

Se han tomado los espectros UV-Visible de las nanopartículas obtenidas en solución a los 90 minutos desde el momento de inicio de la reacción para los volúmenes de mezcla del 10%, 50% y 90% de agente reductor, siguiendo el procedimiento explicado en la sección 3.1.2.

De la misma manera que en la caracterización óptica de las distintas variedades de mosto (sección 4.2.1), los espectros del mosto diluido han sido restados con la finalidad de observar la banda del plasmón únicamente de las nanopartículas sintetizadas (Figuras 59- 61)

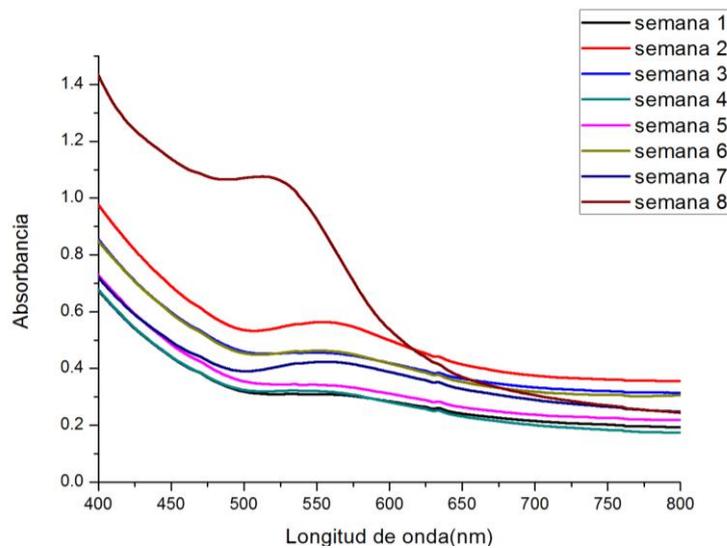


Figura 59. Espectro UV-visible de AuNp's con un 10% de mosto en la reacción (Tempranillo)

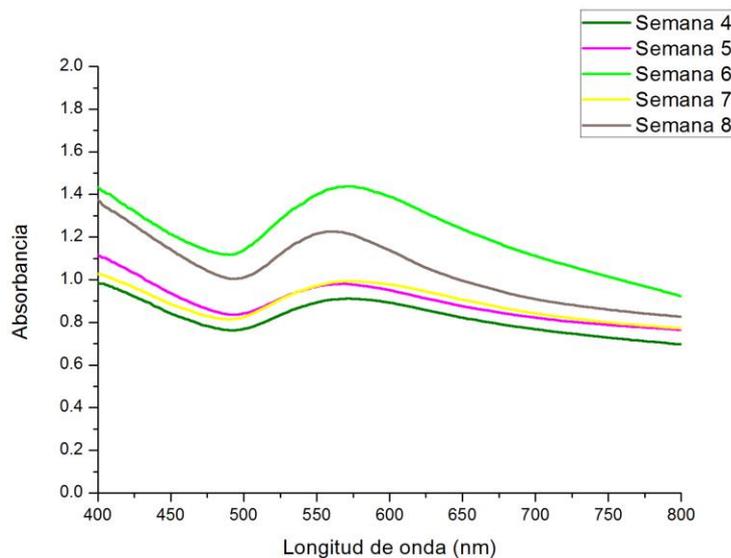


Figura 60. Espectro UV-visible de AuNp's con un 50% de mosto en la reacción (Tempranillo)

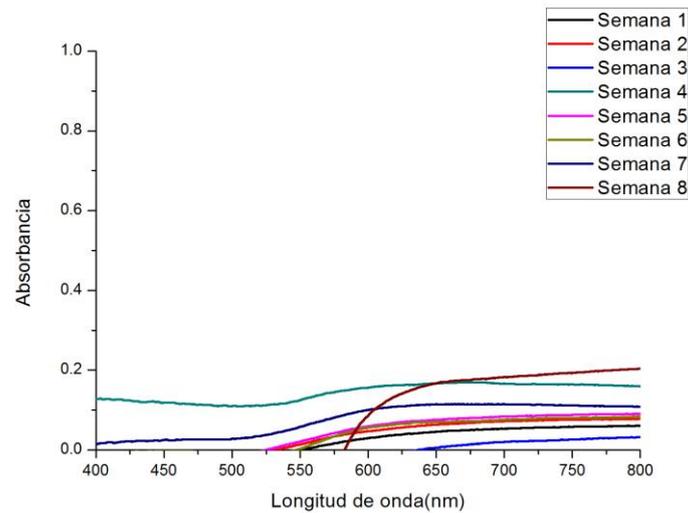


Figura 61. Espectro UV-visible de AuNp's con un 90% de mosto en la reacción (Tempranillo)

Se observa que con un 90% de mosto en la solución no se forman nanopartículas para ninguna proporción de mosto (no existe pico de absorción), mientras que con un 10% sí que se consiguen sintetizar pero en baja cantidad. Las nanopartículas que se forman con un 50% de mosto en la solución son las más abundantes

4.3.2. Análisis estadístico

La respuesta que presenta cada semana de maduración de la uva es particular para cada uno de los volúmenes añadidos a la mezcla de reacción, por lo que los volúmenes de sal de oro empleados (500 μ l y 100 μ l) pueden ser considerados señales representativas de la semana de maduración en la que se encuentra la uva.

Igual que en la sección 4.2.4, las medidas experimentales se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos fueron pretratados empleando el método kernel desarrollado en nuestro grupo (diez kernels). De esta manera, los diez valores obtenidos de cada espectro son escalados entre los valores máximos y mínimos para descartar el efecto de rango de corriente (normalizado). Se estandarizan los espectros obtenidos a media cero y varianza unidad para que todas las variables tengan el mismo peso, ya que de no ser así, si una variable tuviera una varianza mucho más grande, sería esta variable la que controlaría la primera componente principal.

Tratando los datos con el programa informático Matlab y aplicando el análisis de componentes principales (PCA) a la matriz de datos correspondiente, se obtienen los siguientes resultados para la red de señales:

En el gráfico de scores en 2 dimensiones y 3 dimensiones (Figura 62 y 63), cada uno de los números simboliza a una semana distinta de maduración de la variedad de uva Tempranillo. La primera componente principal representa el 48.59% de la variación total de las muestras, la segunda componente aporta el 30.96% de la variación y la tercera componente explica hasta el 16.59%. De este modo, entre la primera, segunda y tercera componente se explica el 96.14% de la variación total de las muestras.

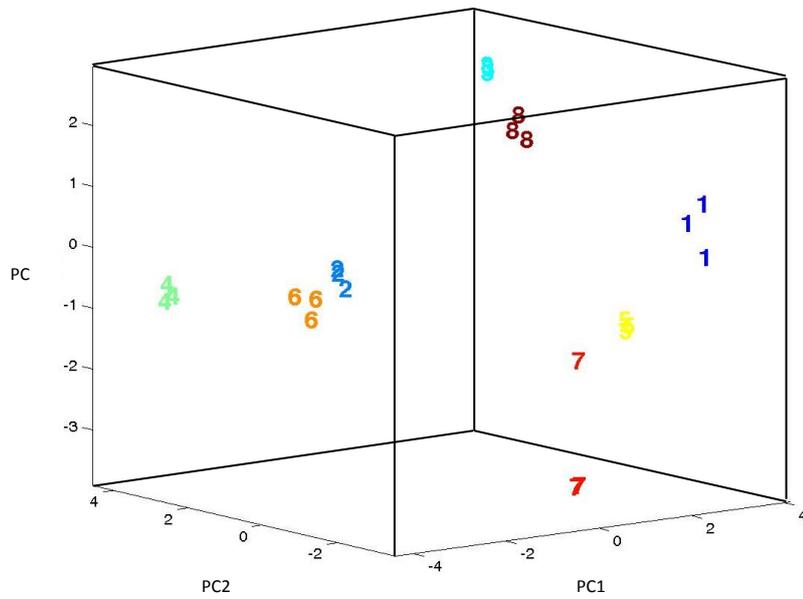


Figura 62. PCA (score) en 3D obtenido a partir de los datos obtenidos de los volúmenes 500µl y 100 µl *.

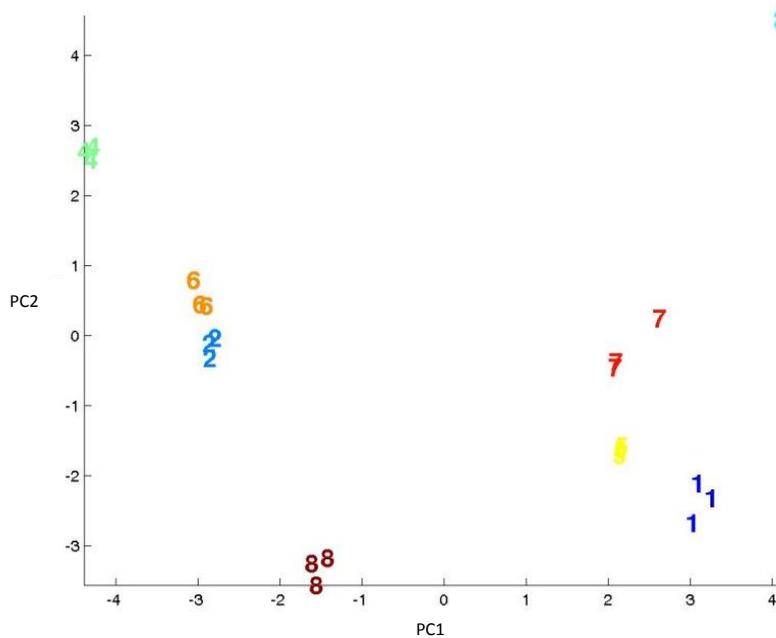


Figura 63. PCA (score) en 2D obtenido a partir de los datos obtenidos de los volúmenes 500µl y 100 µl *.

(*Leyenda: 1: semana1; 2: semana2; 3: semana2; 4: semana4; 5: semana5; 6: semana6; 7: semana7; 8: semana8)

Con el gráfico de scores se demuestra la buena reproductibilidad del método debido a que las tres repeticiones realizadas para cada una de las semanas de maduración se encuentran agrupadas en clusters. Además, las diferentes semanas de maduración se encuentran distribuidas a lo largo del gráfico, pudiéndose concluir que los volúmenes de sal de oro considerados como señales representativas son capaces de discriminar las muestras analizadas.

Con el gráfico loadings (Figura 64) se comprueba la complementariedad de las señales ya que sus kernels se encuentran distribuidos en dos de los cuadrantes del gráfico.

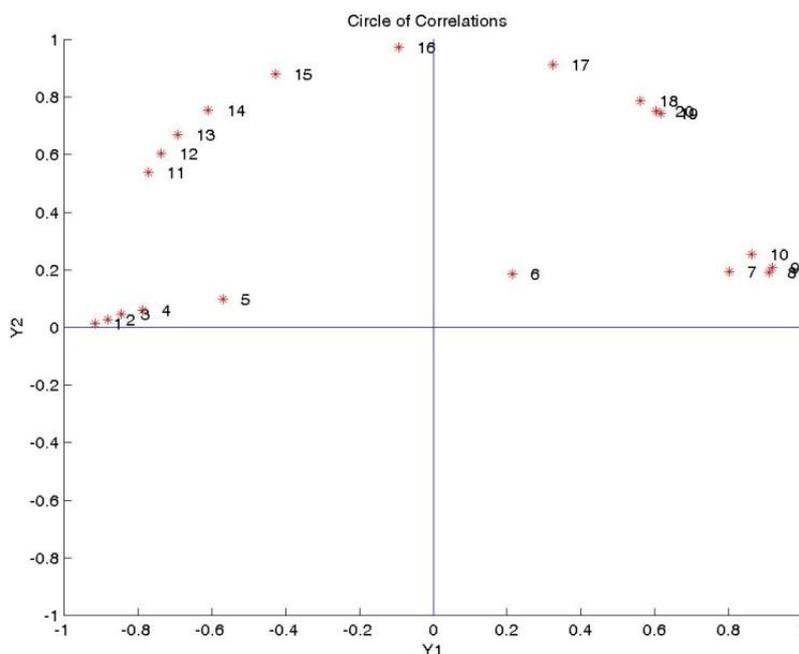


Figura 64. PCA (loading) obtenido a partir de los datos obtenidos de los volúmenes 500 μ l y 100 μ l

También se ha aplicado la técnica PLS (regresión por mínimos cuadrados) para establecer predicciones o correlaciones entre la respuesta de las señales (resultados obtenidos con la PCA) y diversos parámetros

fisicoquímicos del mosto Tempranillo, tales como el contenido polifenólico y los azúcares (Tabla 8).

VARIEDAD	BRIX	AZUCAR	pH	Ac. Total	Ac. Malico	Ac.Tartarico	IPT
TEMPRANILLO		(gr/l)		(gr/l)	(gr/l)	(gr/l)	(Polifenoles)
Semana 1	17.90	150.3	2.91	11.24	6.40	5.07	3
semana 2	19.00	180.5	3.05	9.83	6.80	5.69	20
Semana 3	20.70	200.0	3.16	8.01	3.04	6.18	16
Semana 4	22.10	216.0	3.29	6.29	2.65	6.07	17
Semana 5	22.40	219.5	3.26	5.75	2.30	5.82	19
Semana 6	22.80	224.1	3.30	6.53	2.65	6.41	24
Semana 7	23.40	231.1	3.36	5.56	1.99	6.26	18
Semana 8	24.20	240.3	3.27	7.03	2.99	7.46	19

Tabla 8. Datos del análisis químico

Los errores, coeficientes de correlación y número de variables latentes para los modelos de regresión PLS obtenidos se encuentran en la Tabla 9:

	RMSEP	RMSEC	Rp2	Rc2	VL
Azúcares	15.0493	9.005708	0.78788	0.923588	5
IPT	2.286535	1.69285	0.918621	0.955594	5
Brix	1.312315	0.787207	0.787207	0.923234	5

Tabla 9. Parámetros de la regresión PLS

Las correlaciones entre las medidas de las señales y los parámetros químicos (azúcares, IPT y Brix) no son perfectos, creemos que por la compleja composición molecular de los mostos.

4.4. DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE DISPOSITIVO DE ANÁLISIS PRE-COMPETITIVO

Las nanopartículas de oro obtenidas también han sido caracterizadas mediante el espectrofotómetro Elisa a las longitudes de onda de 492 y 620 nm, siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 3.2.2.

El objetivo del empleo de este método es realizar el análisis de un número mayor de muestras en menor tiempo y con el gasto de una pequeña cantidad de muestra (300 μ L).

En la Figura 65 se pueden observar los colores correspondientes a las nanopartículas de oro sintetizadas en el minuto uno tras la preparación de la muestra.

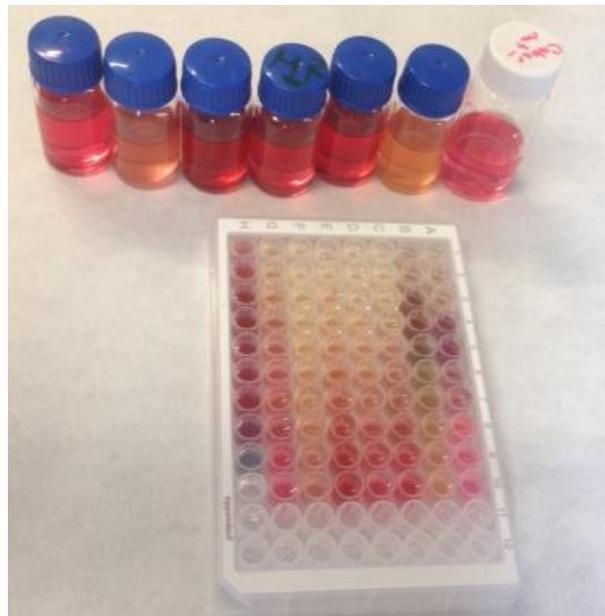


Figura 65. Nanopartículas sintetizadas (en el momento) sobre la placa Elisa con sus respectivos mostos

Con el paso del tiempo la mayor parte de las mezclas siguen reaccionando, pues la reacción en algunos casos no es instantánea, produciéndose un cambio de color en las disoluciones (Figura 66)

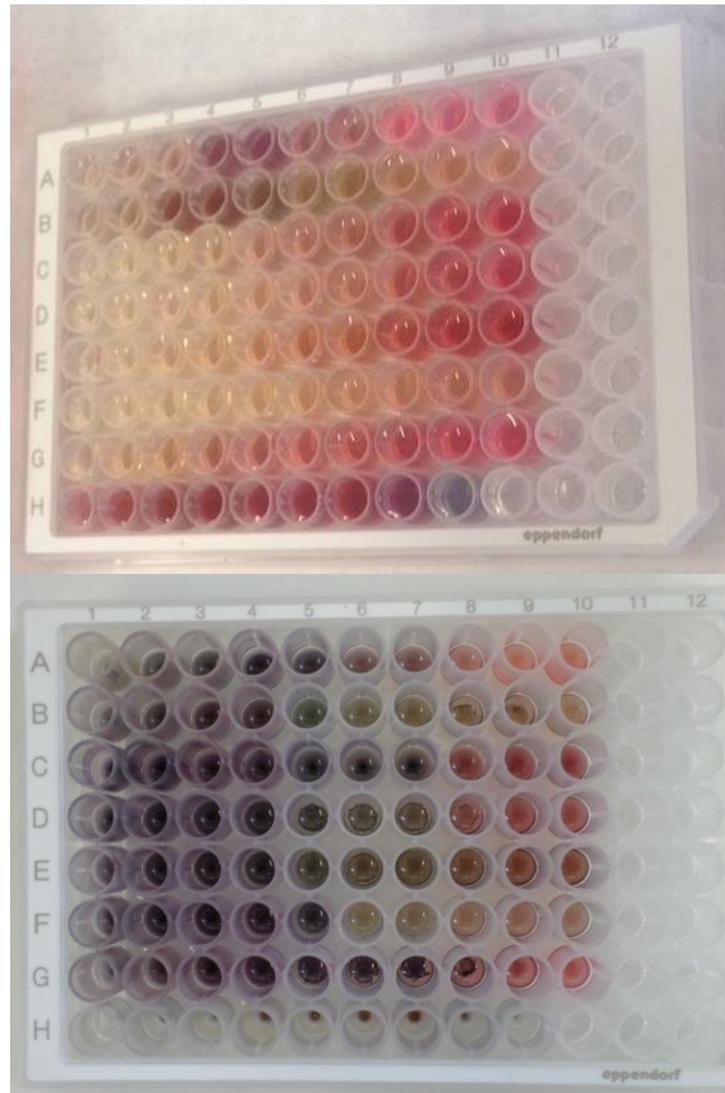


Figura 66. Comparación de las nanopartículas sintetizadas en el momento (superior) y pasados dos días (inferior).

El espectrofotómetro analiza las absorbancias de las muestras (pocillos) a las longitudes de onda elegidas (492 y 620nm). Los datos obtenidos mediante esta técnica nos confirman los resultados obtenidos en el apartado de 4.2.2.

Las Figuras 67 y 68 representan la absorbancia frente al tiempo de la muestra Prieto Picudo. En la figura 67 se observa que la curva tiende a estabilizarse en el tiempo debido al efecto protector del mosto frente a la agregación de las nanopartículas de oro sintetizadas, mientras que en la Figura 68 se puede observar como la absorbancia se mantiene estable. La forma de la curvas es equiparable a las obtenidas empleando el espectrofotómetro UV-Visible (sección 4.2.2), pero los valores de absorbancia

obtenidos con el espectrofotómetro Elisa no se pueden comparar con los datos obtenidos con el espectrofotómetro UV-Vis debido a que el paso óptico del haz de luz es distinto en ambos casos por tener diferentes recipientes para depositar las muestras (Ley de Lamber-Beer).

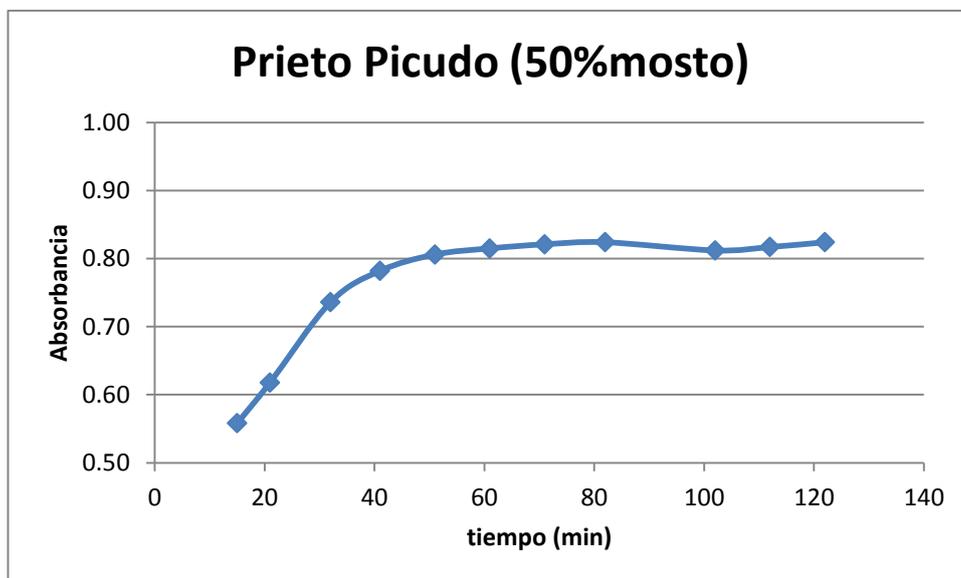


Figura 67—Absorbancia frente al tiempo de las nanopartículas al 50% obtenidas mediante el espectrofotómetro Elisa .

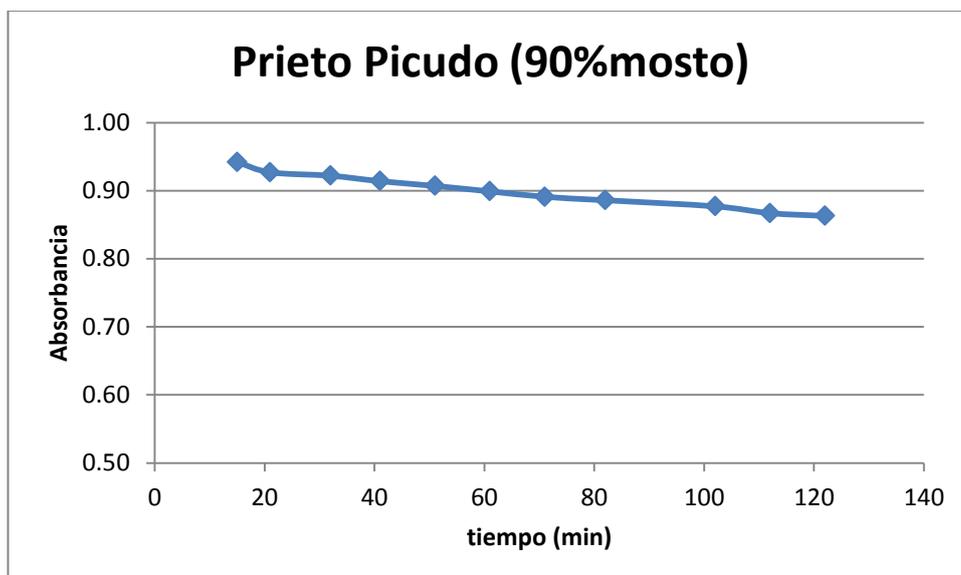


Figura 68—Absorbancia frente al tiempo de las nanopartículas sintetizadas al 90% obtenidas mediante el espectrofotómetro Elisa.

4.5. POSIBLE APLICACIÓN FUTURA

Las nanopartículas de oro podrían ser aplicadas a sensores ópticos portátiles de pequeño tamaño que permitieran medir la cantidad de agentes reductores que existen en los mostos con la finalidad de, por ejemplo, conocer el momento adecuado de recogida de la uva en el proceso de vendimia.

En los sensores químicos la información química que se obtiene en tiempo real, y posiblemente in situ, es resultado de la interacción entre el sensor y el analito en un proceso de dos pasos: reconocimiento y procesamiento de la señal. En nuestro caso, la respuesta del sensor se basa en el cambio de color que ocurre como consecuencia de la reacción del receptor (solución de sal de oro inmovilizado) con el analito (mostos). Como el reconocimiento químico en el receptor no produce modificación de una propiedad eléctrica sino de una propiedad óptica, será necesaria una transducción para generar una señal eléctrica compatible con la circuitería de procesamiento electrónico necesaria, similar a la de un espectrofotómetro en nuestro caso, para el tratamiento de la señal.

El uso de nanopartículas de oro en sensores químicos de mostos necesitaría mucha más experimentación ya que, como se ha observado en este Proyecto, los mostos son sustancias muy complejas en composición.

Se ha encontrado mucha información acerca de sensores ópticos portátiles que existen o están en proceso de investigación actualmente (43).



CONCLUSIONES

1. Es posible la síntesis de nanopartículas de oro a partir de la reacción de la sal precursora HAuCl_4 y el mosto como agente reductor.
2. Las mediciones por UV-Visible de las nanopartículas de oro sintetizadas han presentado una intensa banda de absorción centrada en el torno a 550nm, característica del plasmón de resonancia de las nanopartículas de oro.
3. La respuesta de las nanopartículas ha sido diferente para cada tipo de mosto debido a la diferente composición química de cada uno de ellos.
4. Se han realizado estudios de estabilidad, demostrando que los AuNP's son estables en disolución coloidal a partir de los 90 minutos desde el momento de la mezcla.
5. Se ha observado que los parámetros que controlan el tamaño de las nanopartículas son el tiempo de reacción y la cantidad de extracto de mosto, siendo este último el que mayor influencia ejerce sobre las características de las nanopartículas.
6. Estudios de microscopio electrónico de transmisión han mostrado que el mosto, utilizado como agente reductor, favorece la formación y estabilización de nanopartículas de muy pequeñas dimensiones (nanoclusters) con forma casi esférica, distribución uniforme y un tamaño aproximado de 3nm.
7. La relación 50% mosto-50% sal de oro en la solución es la mejor opción para fabricar un sensor, ya que con esta proporción se obtienen nanopartículas con todas las variedades y en todas las semanas del proceso de maduración del mosto.
8. La red de señales es capaz de discriminar las distintas variedades y semanas de maduración del mosto.



BIBLIOGRAFÍA

1. "Surface plasmon resonance of capped Au nanoparticles . **M. A. García, J. de la Venta, P. Crespo, J. Llopis, S. Penadés, A. Fernández y A. Hernando.** s.l. : Physical Review B, (2005).
2. Nanociencia y nanotecnología. [En línea] [Citado el: 30 de marzo de 2015.] <http://cmcaamendez.jimdo.com/origenes/discurso-de-freyman/>.
3. **Muñoz, Mario German Friederici.** *Nanopartículas de Au y Pd: síntesis, funcionalización y aplicaciones catalíticas.* Barcelona : Universitat de Barcelona, 2013.
4. **Cobo, Eldara Rodríguez.** *Síntesis, Propiedades y Funcionalización de Clústeres Metálicos.* [ed.] Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Química. Santiago de Compostela : s.n., 2012.
5. **Alonso, María Cruz.** *Síntesis, caracterización y empleo de Nanoclusters de Oro en el desarrollo de un inmunoensayo fotoluminiscente: aplicación a la determinación de IgE.* [ed.] Universidad de Oviedo. Oviedo : s.n., 2014.
6. *Recent Advances on the Synthesis of Metal Quantum Nanoclusters and Their Application for Bioimaging.* **Le Guevel, X.** 3, 2014, IEEE Journal of selected topics in quantum electronics, Vol. 20, págs. 45,46.
7. *Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications.* **Li Shanga, Shaojun Dong, G.Ulrich Nienhaus.** 4, 2011, Nanotoday, Vol. 6, págs. 401-418.
8. *Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective.* **Mélanie Auffan, Jérôme Rose, Jean-Yves Bottero, Gregory V. Lowry, Jean-Pierre Jolivet y Mark R. Wiesner.** 2009, Nature Nanotechnology, págs. 634 - 641.
9. *The Lycurgus Cup – A Roman nanotechnology.* **Ian Freestone, Nigel Meeks, Margaret Sax, Catherine Higgitt.** 4, December 2007, Gold Bulletin , Vol. 40, págs. 270-277.
10. **Faraday, Michael.** *Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light.* [ed.] Royal Society of London. s.l. : Philos. págs. 145-181. Vol. 147 (1857).
11. Sabelotodo.org. [En línea] [Citado el: 12 de Marzo de 2015.] <http://www.sabelotodo.org/elementosquimicos/oro.html>.
12. **Cao, Guozhong.** *Nanostructure and Nanomaterials.* s.l. : Imperial College Press, 2004.
13. *Nanopartículas metálicas: oro.* **Remuñan-López, Sonia Al-Qadi y Carmen.** [ed.] Real academia nacional de farmacia. Madrid : s.n., 2009, págs. 223-248.

14. *Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology*. **Astruc, Marie-Christine Daniel and Didier**. 104, 2004, Chem. Rev., págs. 293-346.
15. **Granda, José de la Venta**. *Propiedades magnéticas de nanopartículas de oro*. Madrid : Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones, 2009. Tesis .
16. *AFM characterization of small metallic nanoparticles*. I. **Carabias, J. de la Venta, A. Quesada, M. A. García, L. Kolodziejczyk, J. M. de la Fuente, S. Penades, A. Fernández, P. Crespo y A. Hernando**. 4, s.l. : Nano newsletter, 2006, pág. 11.
17. *Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda*. **Daniel A. Cruz, Miriam C. Rodríguez, Juan M. López, Virginia M. Herrera, Alejandro G. Orive, Alberto H. Creus**. 2012, Avances en Ciencias e Ingeniería, págs. 67-78.
18. **Navarro, Alfonso J. Viudez**. *Síntesis, caracterización y ensamblaje de nanopartículas de oro protegidas por monocapas moleculares*. [ed.] Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2011.
19. *Growth of Highly Fluorescent Polyethylene Glycol- and Zwitterion-Functionalized Gold Nanoclusters*. **Fadi Aldeek, † M. A. Habeeb Muhammed, Goutam Palui, Naiqian Zhan, and Hedi Mattoussi**. 2509-2521., ACS Nano, Vol. 7.
20. **Grijalva, Angel Slistan**. *Determinación de los mecanismos de formación de nanopartículas de plata sintetizadas en etilén glicol utilizando caracterización teórica y experimental de la banda de plasmón*. 2005.
21. *Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlado forma y tamaño*. **Zanella, Rodolfo**. [ed.] Mundo nano. 1, enero-junio 2012, Vol. 5.
22. *Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability*. **Jingfang Zhou, John Ralston, Rossen Sedev, David A. Beattie**. s.l. : Elsevier, 2009, Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 331, págs. 251-262.
23. *The greener synthesis of nanoparticles*. **Oxana V. Kharissova, H.V. Rasika Dias, Boris I.Kharisov, Betsabee Olvera Pérez, Victor M. Jiménez Pérez**. 4, México : Elsevier, Abril de 2013, Trends in Biotechnology, Vol. 31.
24. *Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts*. **Amit Kumar Mittal, Yusuf Chisti, Uttam Chand Banerjee**. s.l. : Elsevier, 2013, Biotechnology Advances, Vol. 31, págs. 346-356.
25. *Synthesis of gold nanoparticles by *Cacumen Platycladi* leaf extract and its simulated solution: toward the plant-mediated biosynthetic mechanism*. **Guowu Zhan, Jiale Huang, Liqin Lin, Wenshuang Lin, Kamana Emmanuel, Qingbiao Li**. 10, 2011, Journal of Nanoparticle Research , Vol. 13, págs. 4957-4968.

26. *Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas*. **Monge, Miguel**. 1, 2009, Anales de la Real Sociedad Española de Química , págs. 33-41.
27. *Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de polímeros estabilizantes*. **Ángela B. Sifontes, Luis Melo*, Carlos Maza, Juan J. Mendes y Marta Mediavilla**. 6, 2010, Quim. Nova., Vol. 33, págs. 1266-1269.
28. **Sánchez, Silvia Rodríguez**. *Influencia de los compuestos de naturaleza proteica presentes en *Jatropha curcas* sobre la síntesis de nanopartículas de oro*. Txacala : s.n., 2014.
29. **Trigo, José Angel Hernández**. *Theory and experiment in modular Raman spectroscopy with fiber optics applied to the analysis of pigments*. [ed.] Universidad politécnica de Cataluña. Barcelona : s.n., 2011.
30. **Osuna, Lorena Gómez**. *Aplicación de la espectroscopía Raman al estudio analítico de fármacos*. [ed.] Universidad politécnica de cataluña. Barcelona : s.n., 2011.
31. **Baker, Colin C., Pradhan, Anshu y Shah, S. Ismat**. *Metal Nanoparticles*. s.l. : American Scientific Publishers, 2004. págs. 449 - 474. Vol. 5.
32. **Mendez, Miguel Angel Aguilar**. *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides**. 2009.
33. **Pariente, Francisco París**. *Desarrollo de una lengua electrónica basada en una red de sensores electroquímico - másicos para el análisis de diferentes variedades de uva*. [ed.] Universidad de Valladolid. 2013.
34. **Melero, Cristina Lasanta**. *Estudio y aplicación de nuevos procesos para la mejora de la elaboración de vinos tintos en zonas de clima cálido*. [ed.] Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Universidad de Cádiz. Cádiz : s.n., 2009.
35. **fisiología, La vid. Organografía y**. [En línea] 2014. [Citado el: 06 de Marzo de 26.] <http://es.slideshare.net/Lorenzo2061969/la-vid-fisiologa>.
36. **(EVEGA), Consellería do medio rural, estación de viticultura e enoloxía de Galicia**. Xunta de Galicia, consellería do medio rural e do mar. [En línea] [Citado el: 28 de Abril de 2015.] http://www.medioruralemar.xunta.es/fileadmin/arquivos/investigacion/transferecia_tecnologica/componentes_uva_vino.pdf.
37. **Faulín, Ana Belén Casares**. *Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación*. [ed.] Universidad politécnica de Cataluña. Barcelona : s.n., 2010. Vol. IV.
38. *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular*. **M. Quiñones, M. Miguel y A. Aleixandre**. [ed.] 1Departamento

de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. 2 Instituto de Investigación en. Madrid : s.n., 2012, Nutrición hospitalaria, Vol. 27, págs. 76,89. ISSN 0212-1611.

39. *Carbon paste electrodes made from different carbonaceous materials: application in the study of Antioxidants.* **Constantin Apetrei, Irina Mirela Apetrei , Jose Antonio De Saja and Maria Luz Rodriguez-Mendez.** 2011, Sensors , Vol. 11, págs. 1328-1344.

40. *Los compuestos fenólicos de la uva.* **Ojedo, Hernán.** 4, 2007, Revista Enología.

41. *Changes in sugars, organic acids and phenolics of grape berries of cultivar Cardinal during ripening.* **Mikulic-Petkovsek, Ana Topalovic and Maja.** 2010, Journal of Food, Agriculture & Environment, Vol. 8, págs. 223 - 227 .

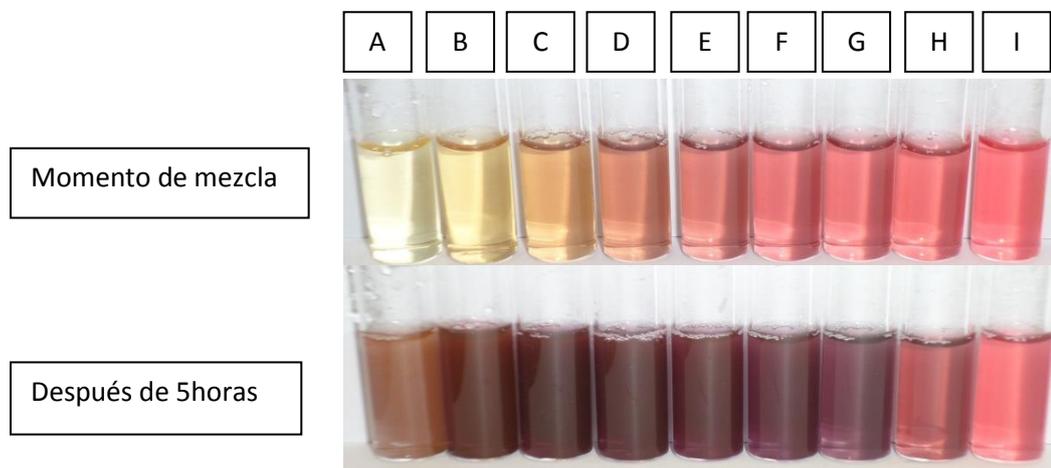
42. **Miller J. N., Miller J. C.** *Estadística y Quimometría para Química Analítica.* s.l. : Prentice Hall.

43. **analítica, Grupo regional andaluz. Sociedad española de Química.** Miniaturización e instrumentación portátil. Mayo/Junio 2014. 8. ISSN: 2254-1241.

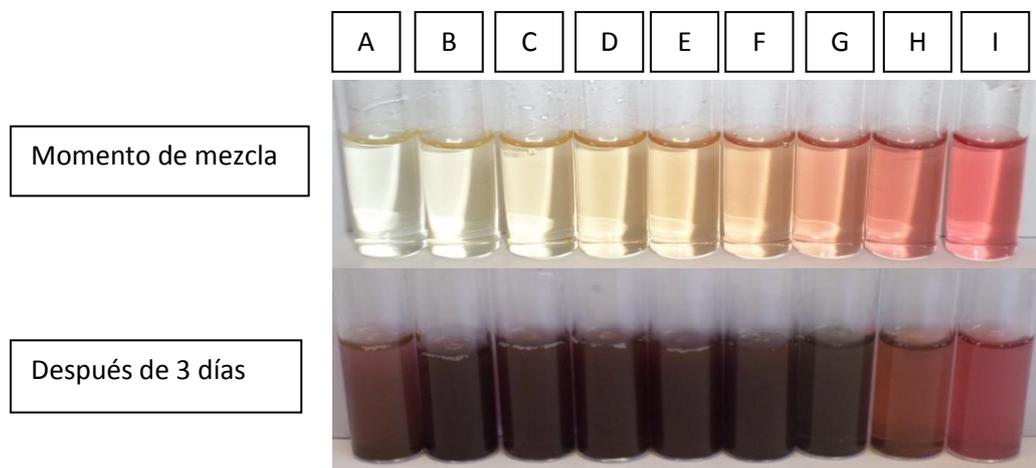


ANEXOS

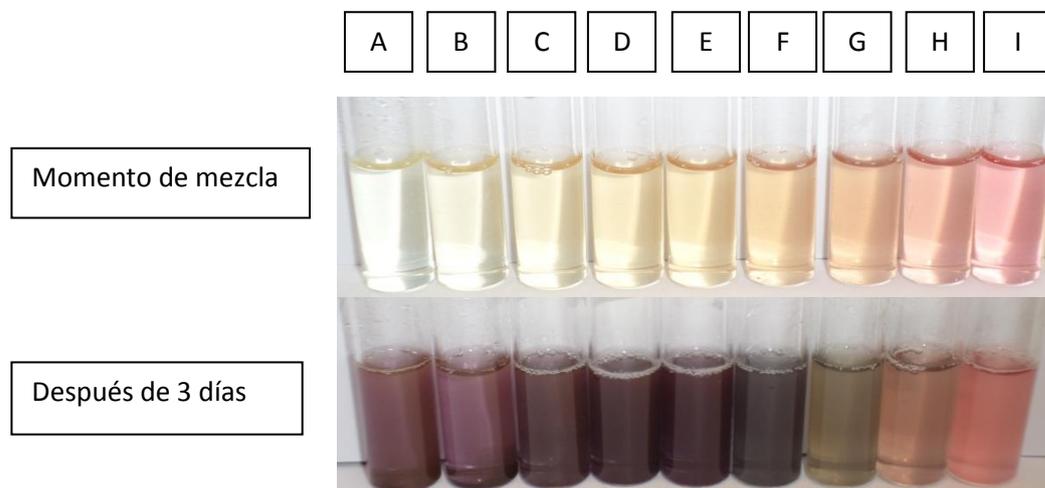
ANEXO 1 – FOTOGRAFÍAS DE LOS MOSTOS EN DISTINTAS PROPORCIONES



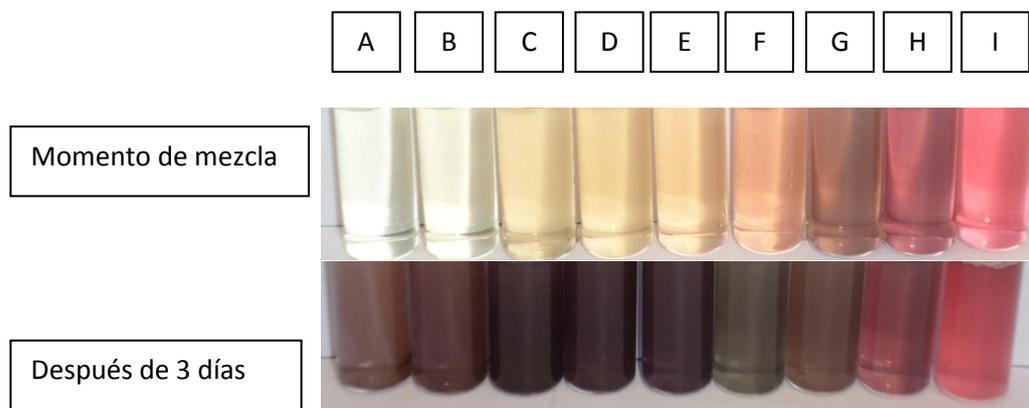
Nanopartículas de oro obtenidas con la variedad Cabernet en distintas proporciones



Nanopartículas de oro obtenidas con la variedad Juan García en distintas proporciones



Nanopartículas de oro obtenidas con la variedad Mencía Secano en distintas proporciones

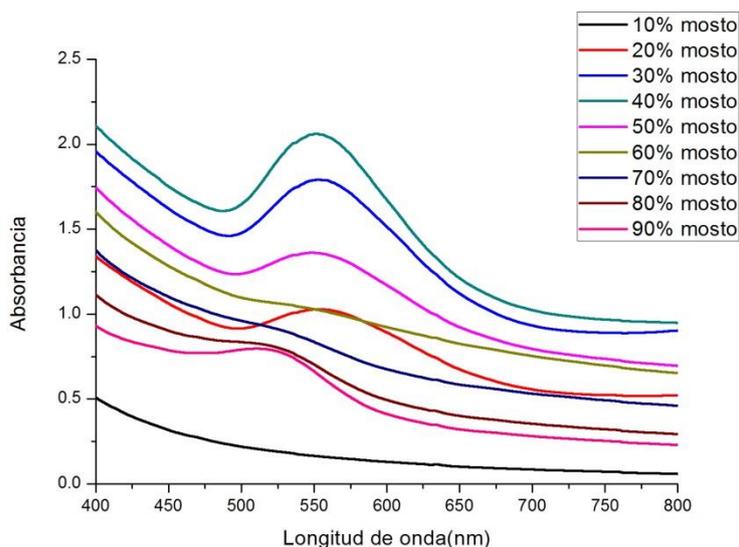


Nanopartículas de oro obtenidas con la variedad Mencía Regadío en distintas proporciones

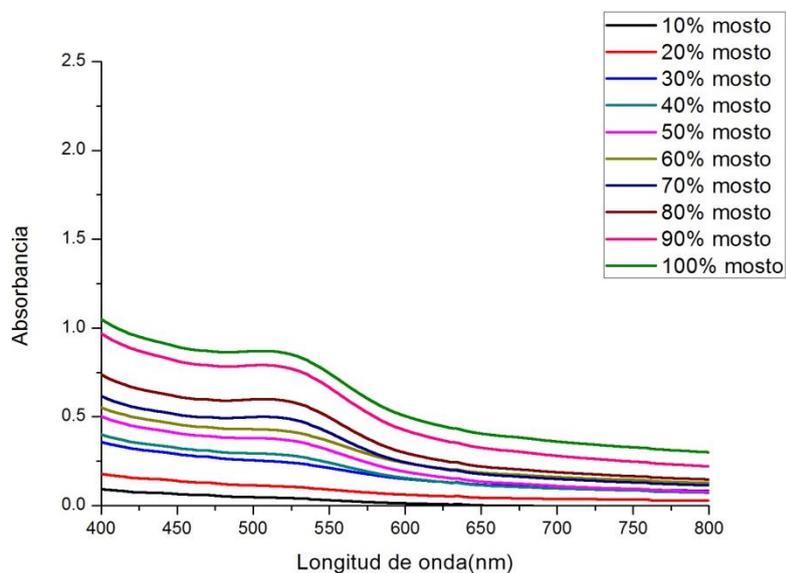
**ANEXO 2 – ESPECTROS ULTRAVIOLETA-VISIBLE DE LOS MOSTO EN DISITNTAS
PROPORCIONES**

RUFETE

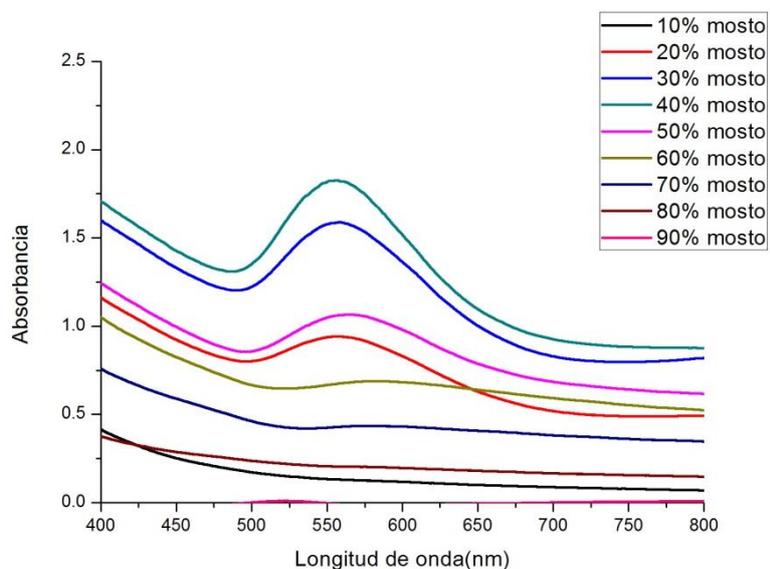
Espectro UV-visible de la mezcla de Au³⁺ más mosto (Rufete)



Espectro UV-visible del Mosto diluido (Rufete)

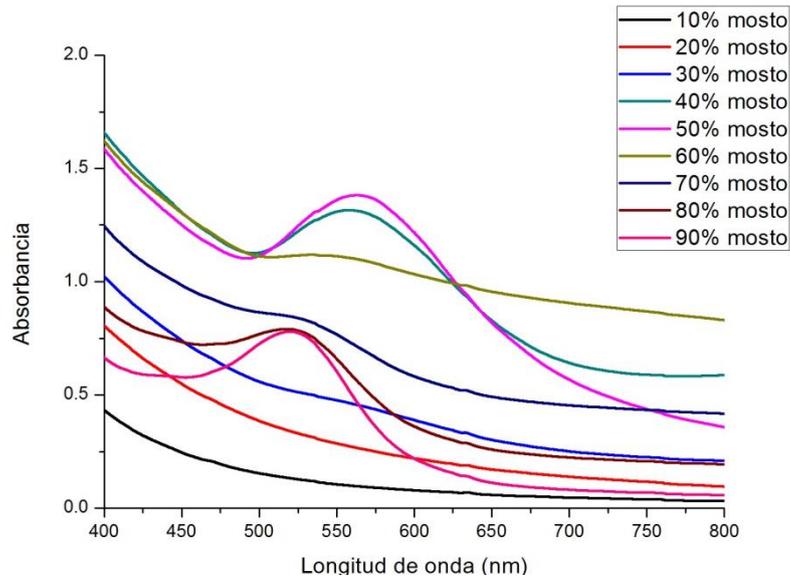


Espectro UV-visible de AuNp's (Rufete)

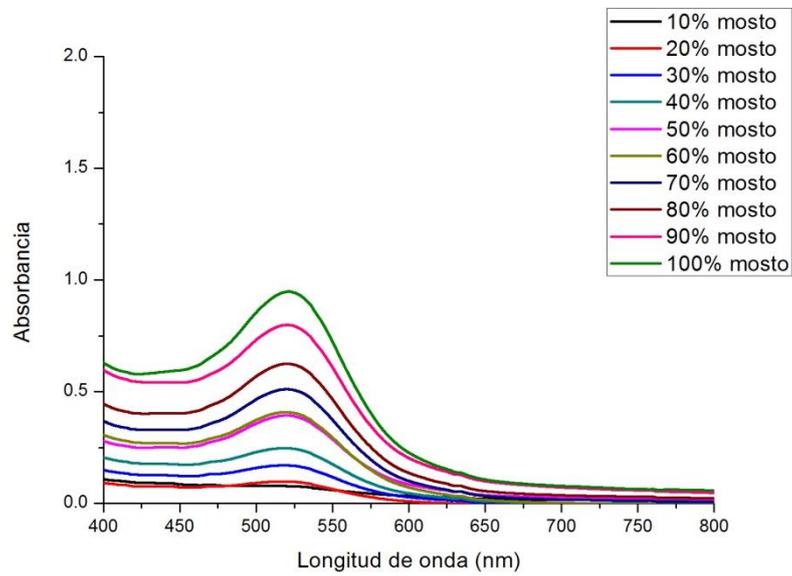


MENCÍA
REGADÍO

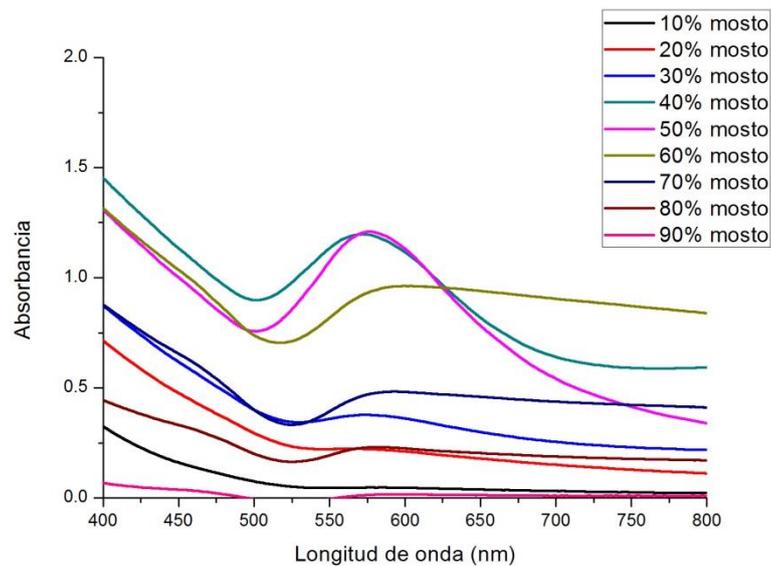
Espectro UV-visible
de la mezcla de
Au³⁺ más mosto
(M. regadío)



Espectro UV-visible
del Mosto diluido
(M. regadío)

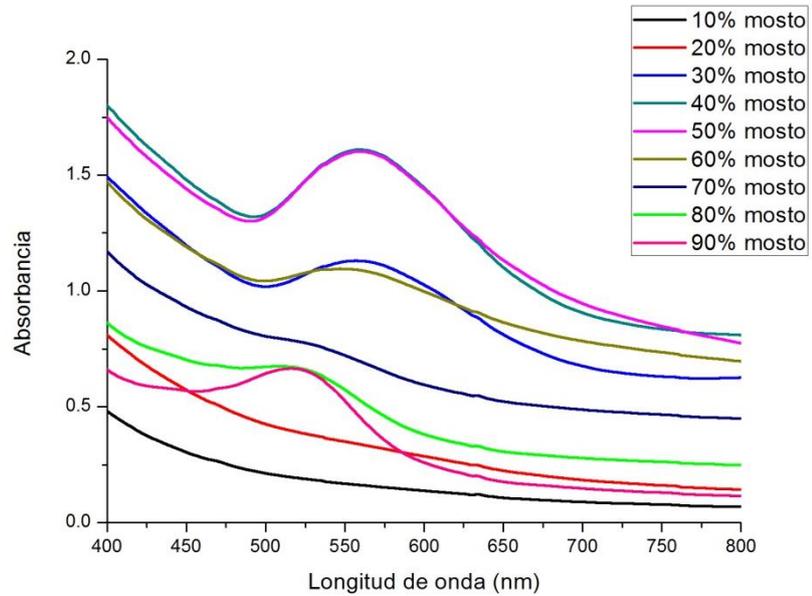


Espectro UV-visible
de AuNp's (M.
regadío)

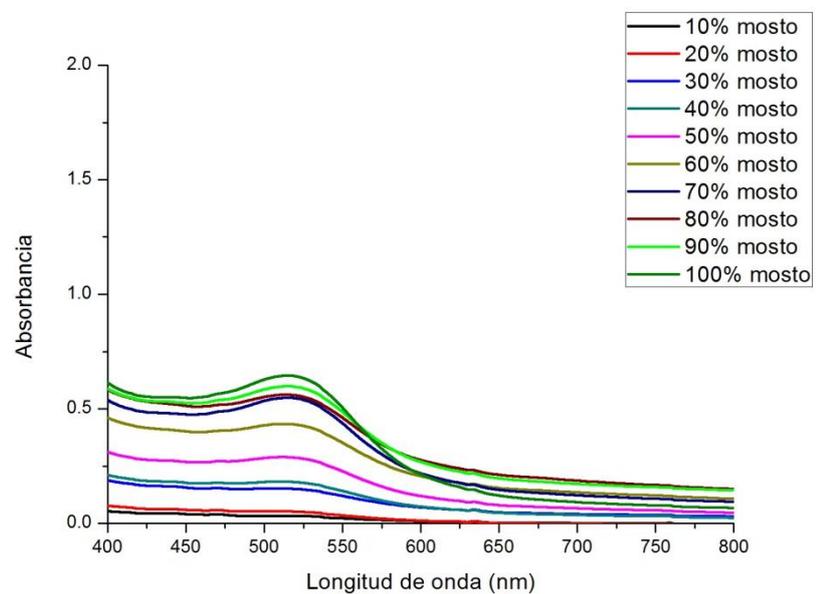


MENCÍA
SECANO

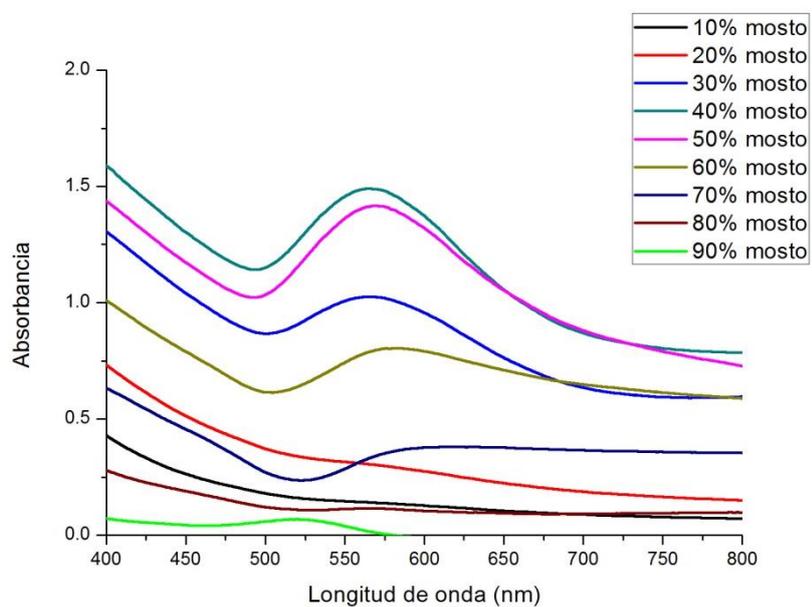
Espectro UV-
visible de la
mezcla de Au³⁺
más mosto (M.
secano)



Espectro UV-
visible del Mosto
diluido (M.
secano)

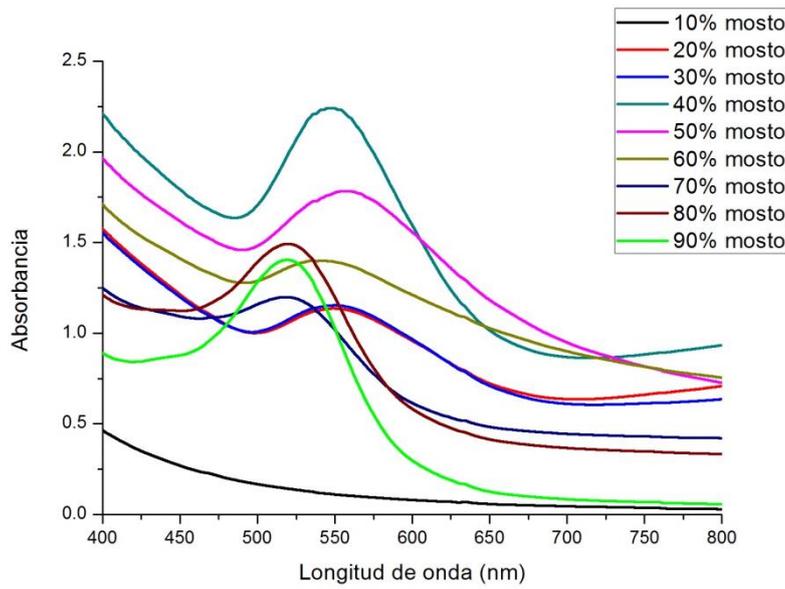


Espectro UV-
visible de AuNp's
(M. secano)

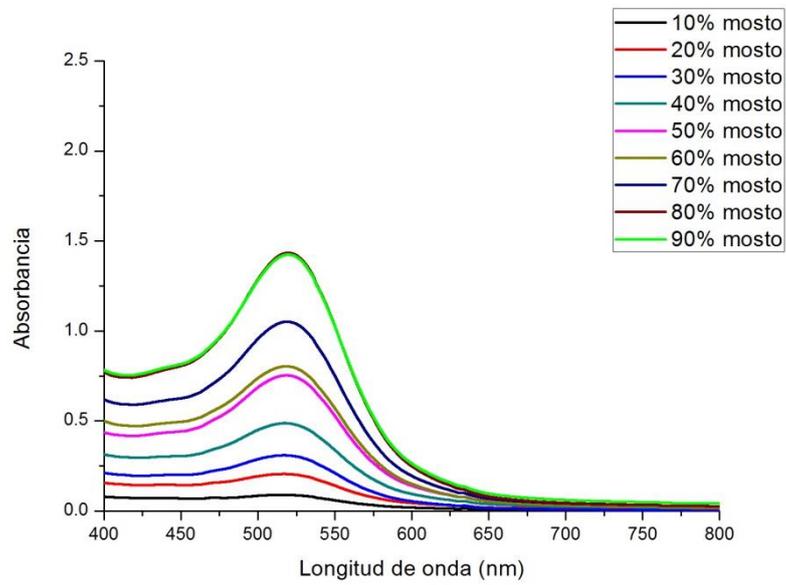


JUAN GARCÍA

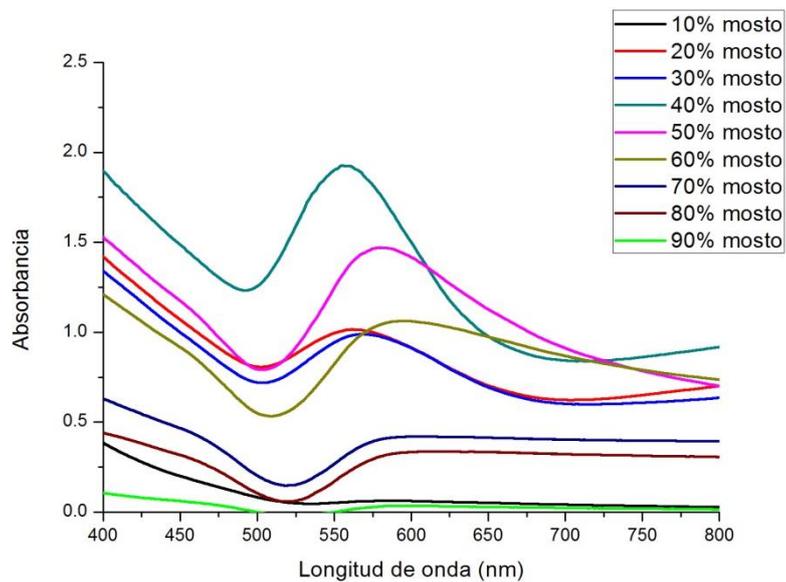
Espectro UV-visible de la mezcla de Au³⁺ más mosto (Juan García)



Espectro UV-visible del Mosto diluido (Juan García)

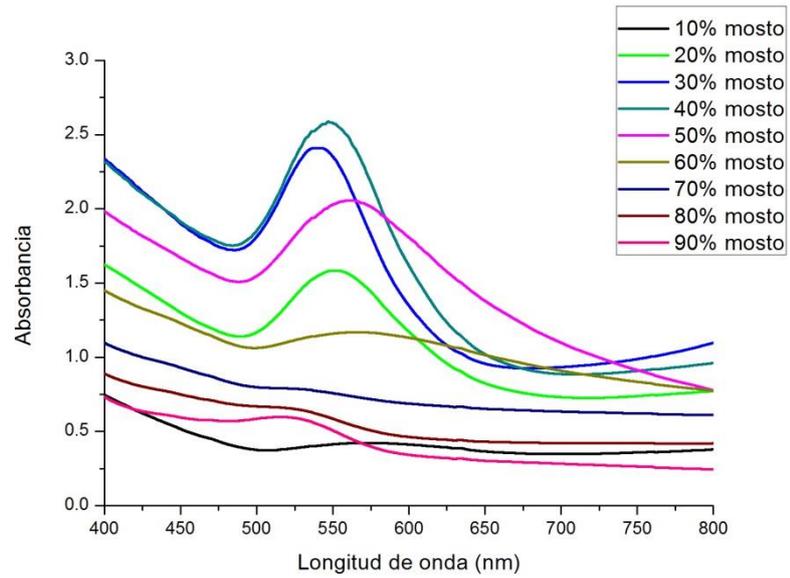


Espectro UV-visible de AuNp's (Juan García)

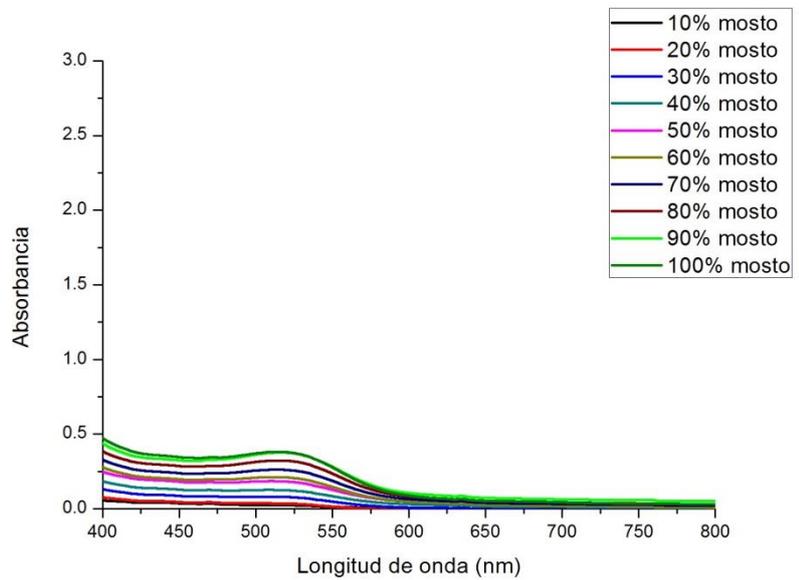


GARNACHA

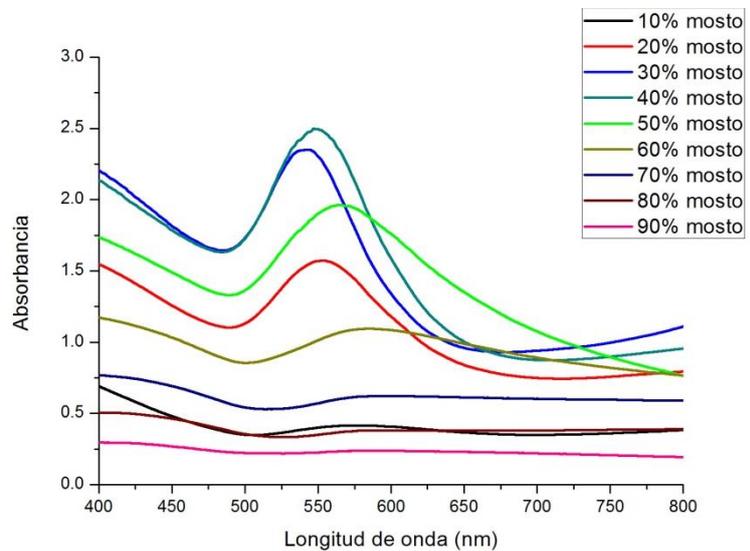
Espectro UV-visible de la mezcla de Au³⁺ más mosto (Garnacha)



Espectro UV-visible del Mosto diluido (Garnacha)

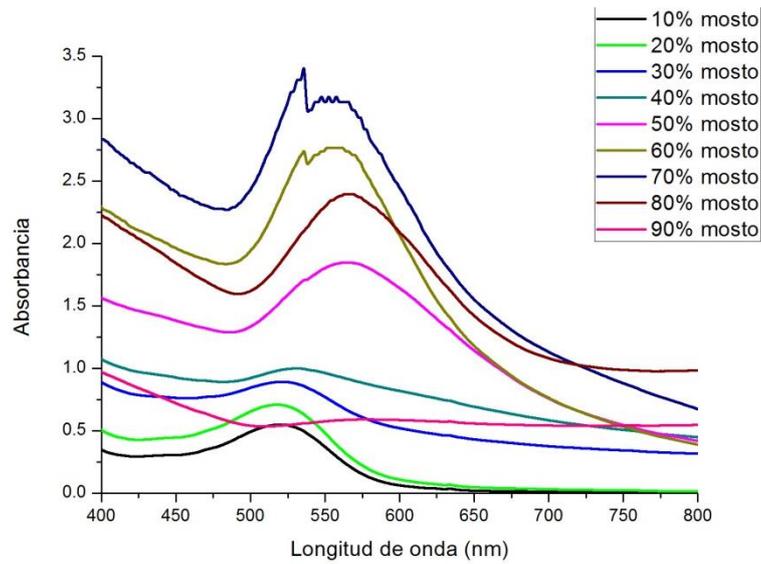


Espectro UV-visible de AuNp's (Garnacha)

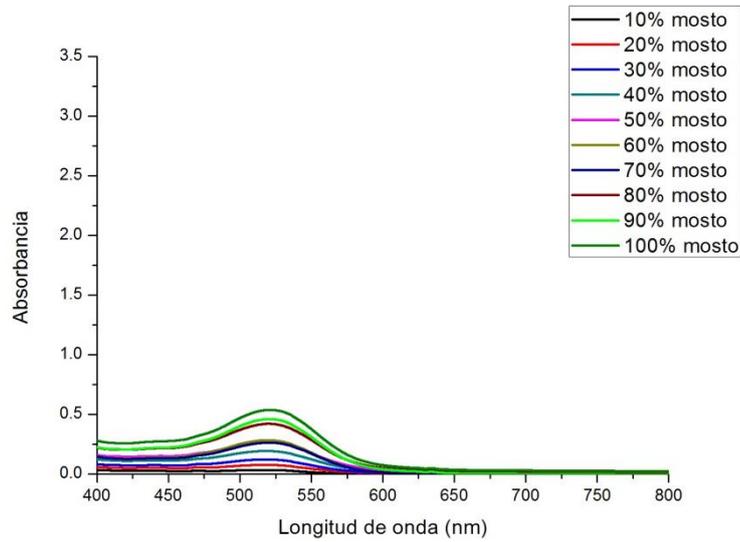


CABERNET

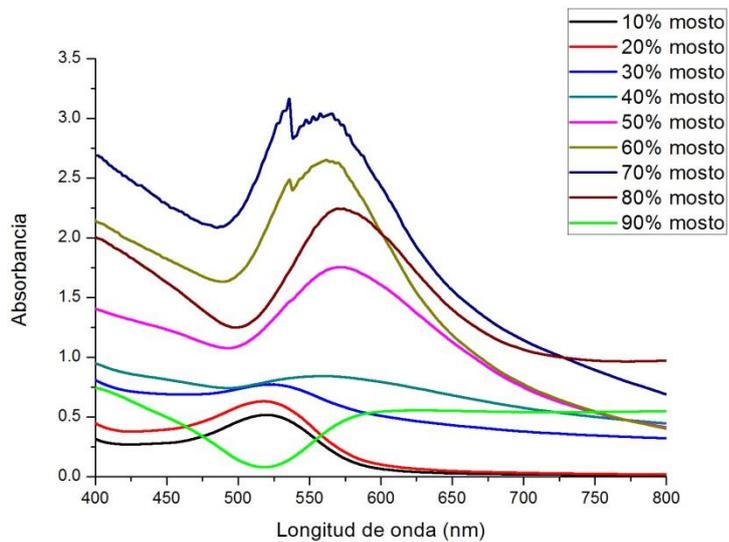
Espectro UV-visible de de la mezcla de Au³⁺ más mosto (Cabernet)



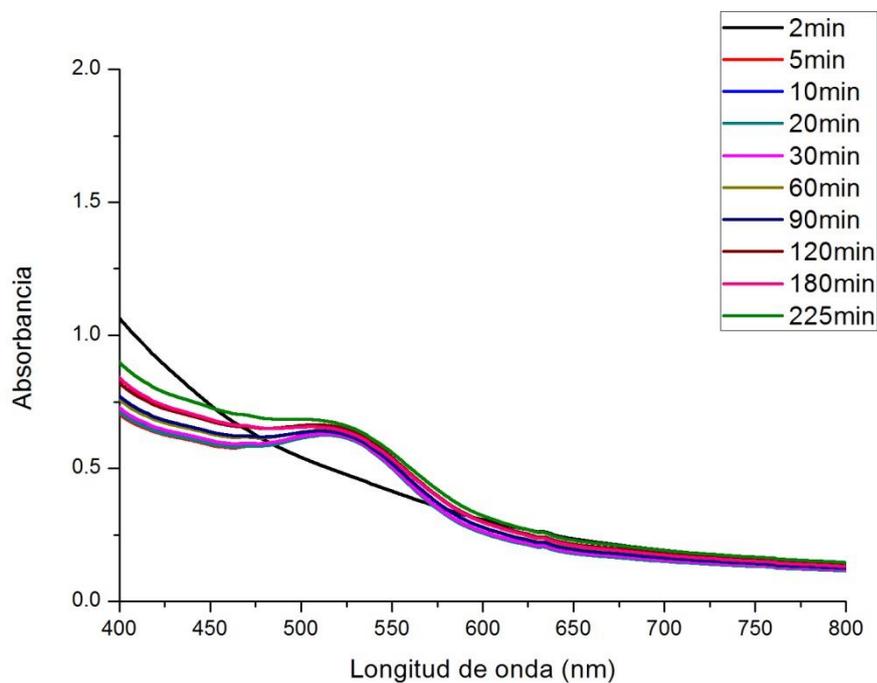
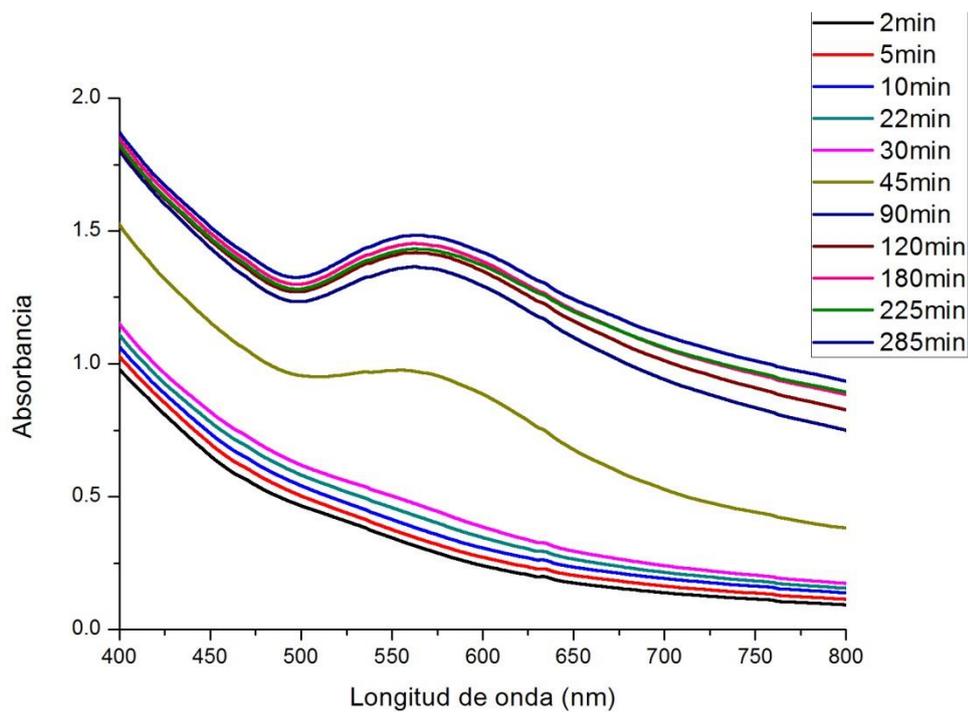
Espectro UV-visible del Mosto diluido (Cabernet)



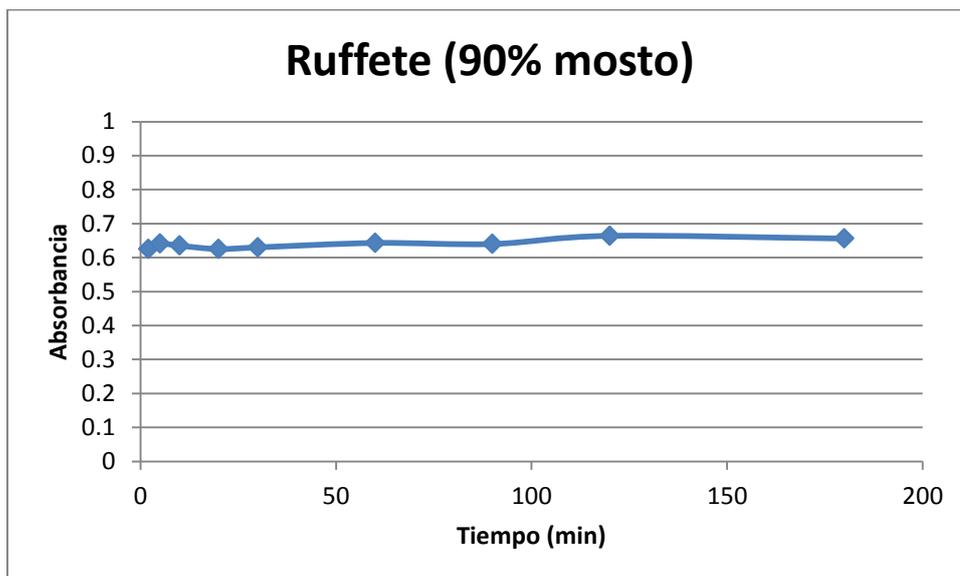
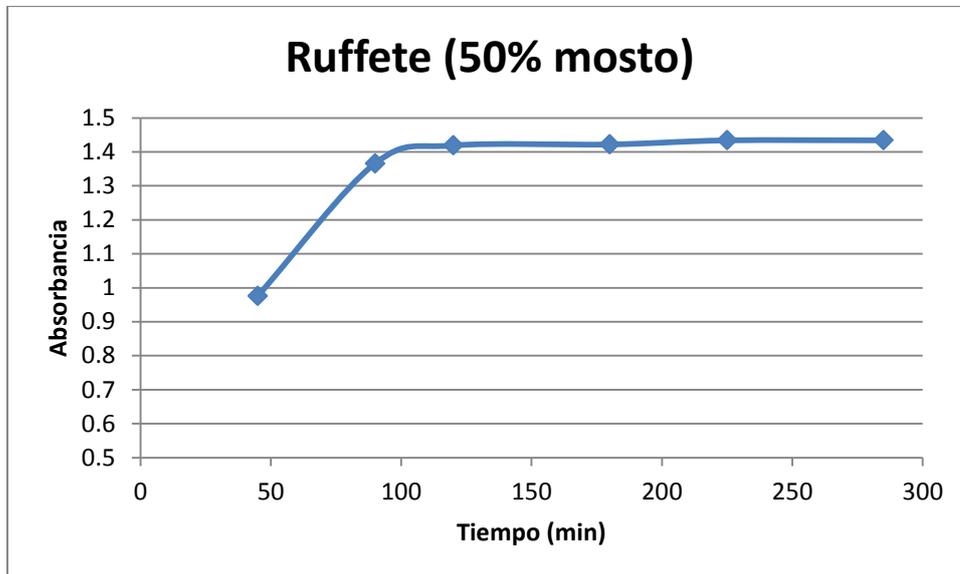
Espectro UV-visible de AuNp's (Cabernet)



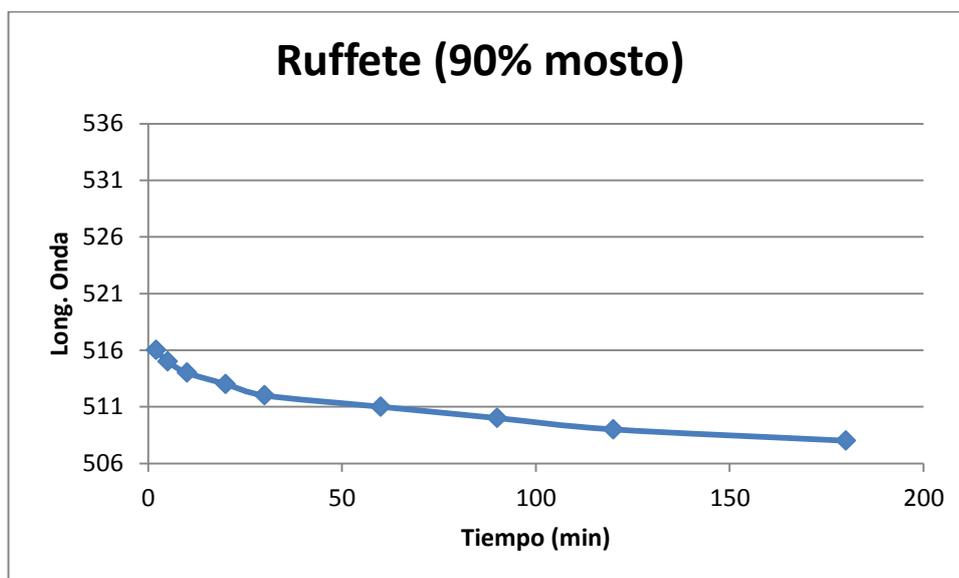
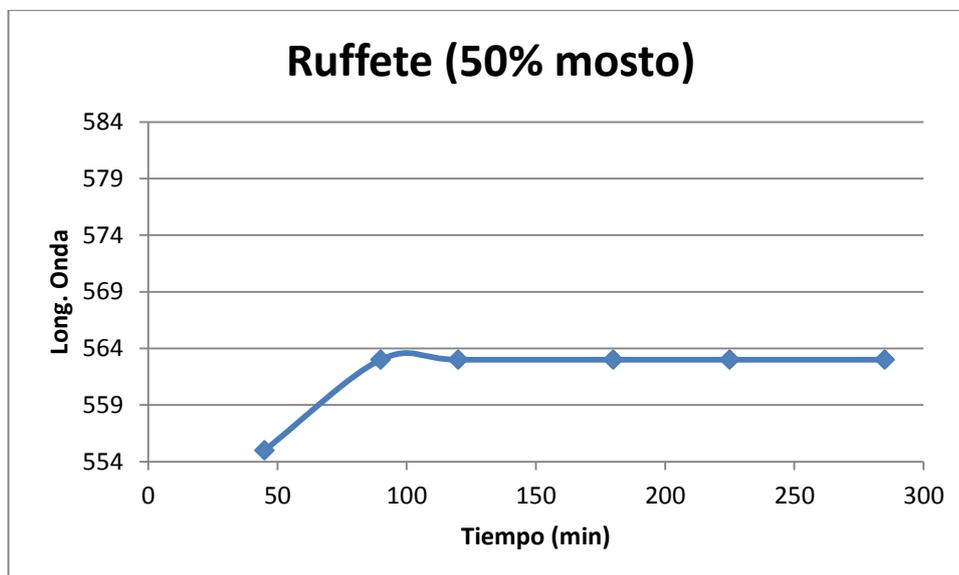
**ANEXO 3 - ESPECTROS ULTRAVIOLETA-VISIBLE DE LAS CINÉTICAS DE LOS
MOSTOS**

RUFETE

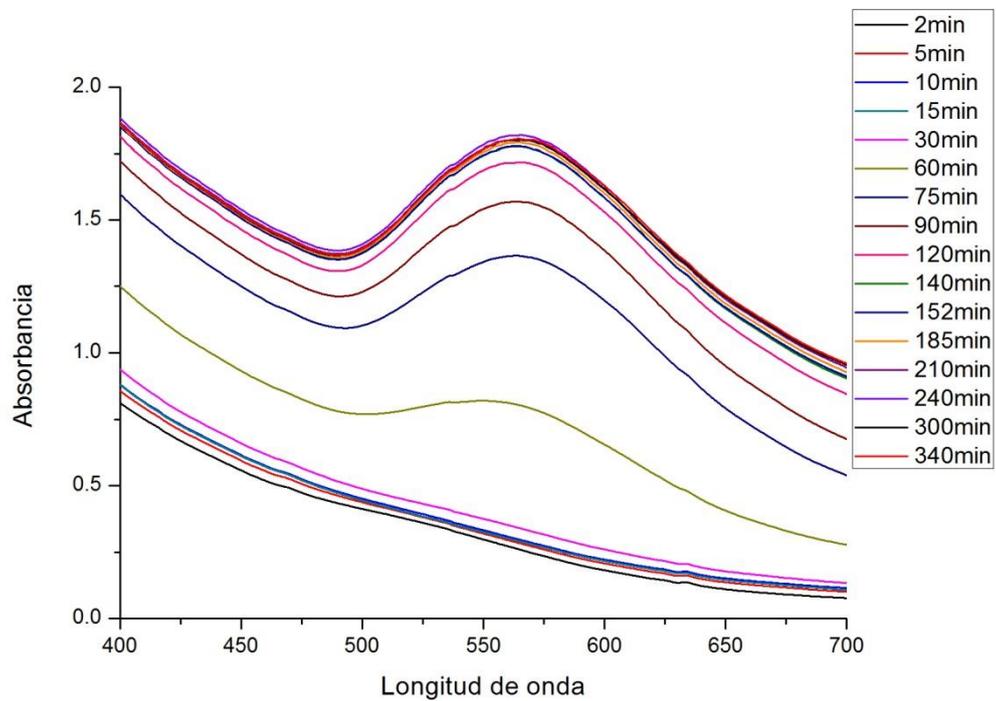
Espectro UV-visible de las cinéticas de las AuNPs en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Rufete.



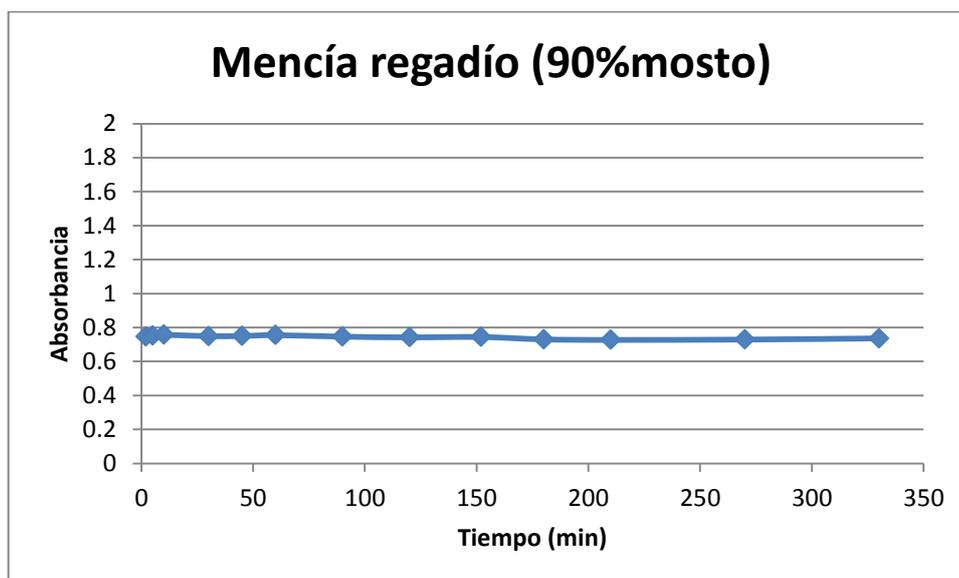
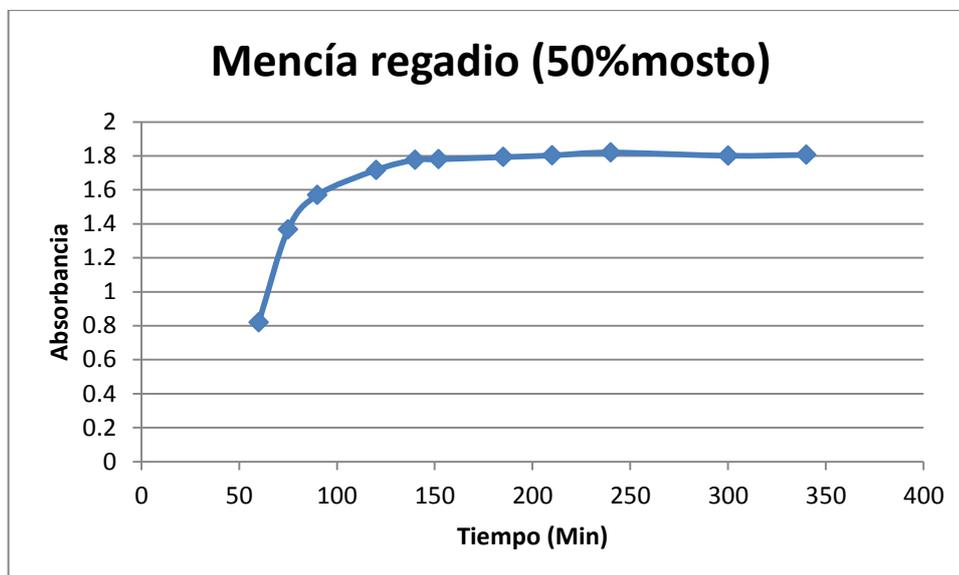
Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Ruffete.



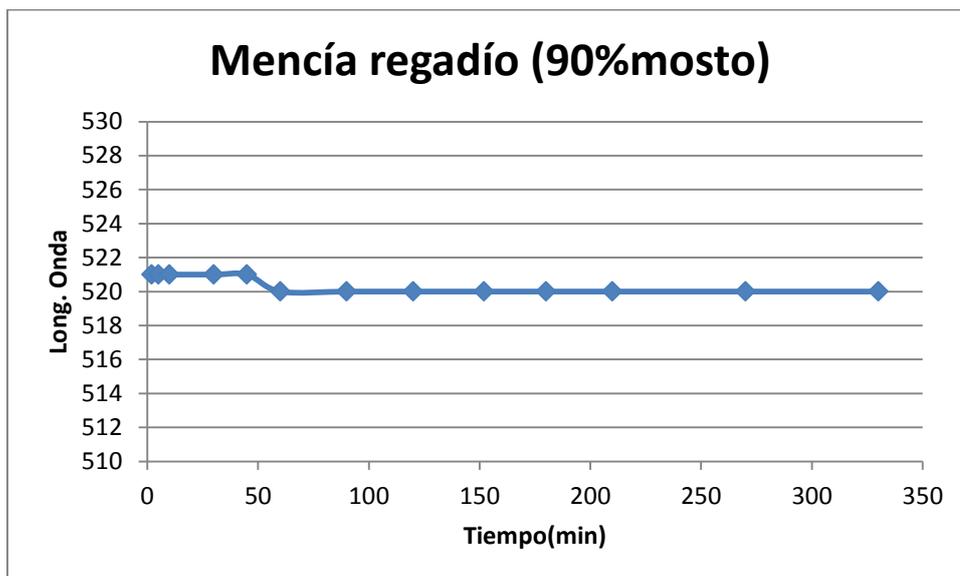
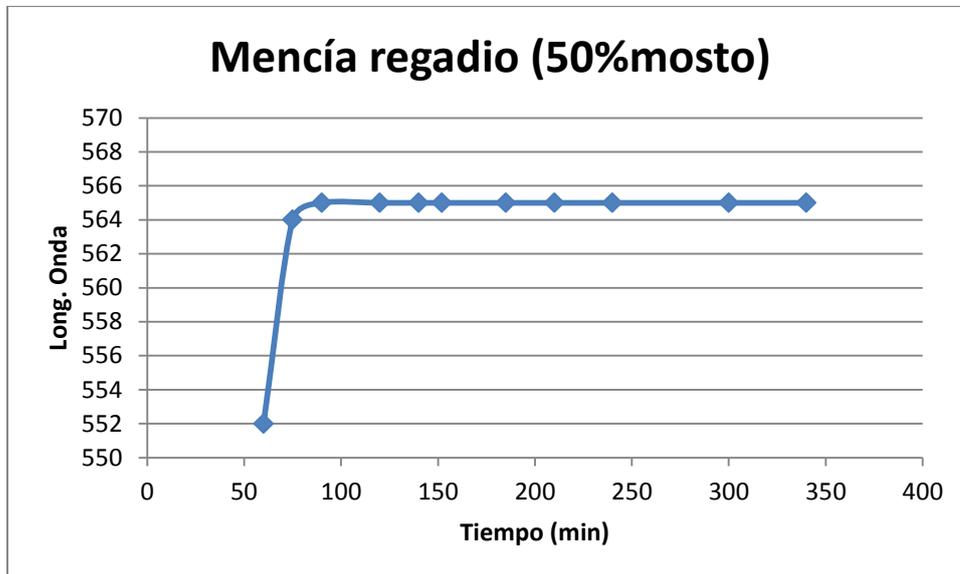
Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Ruffete.

MENCÍA REGADÍO

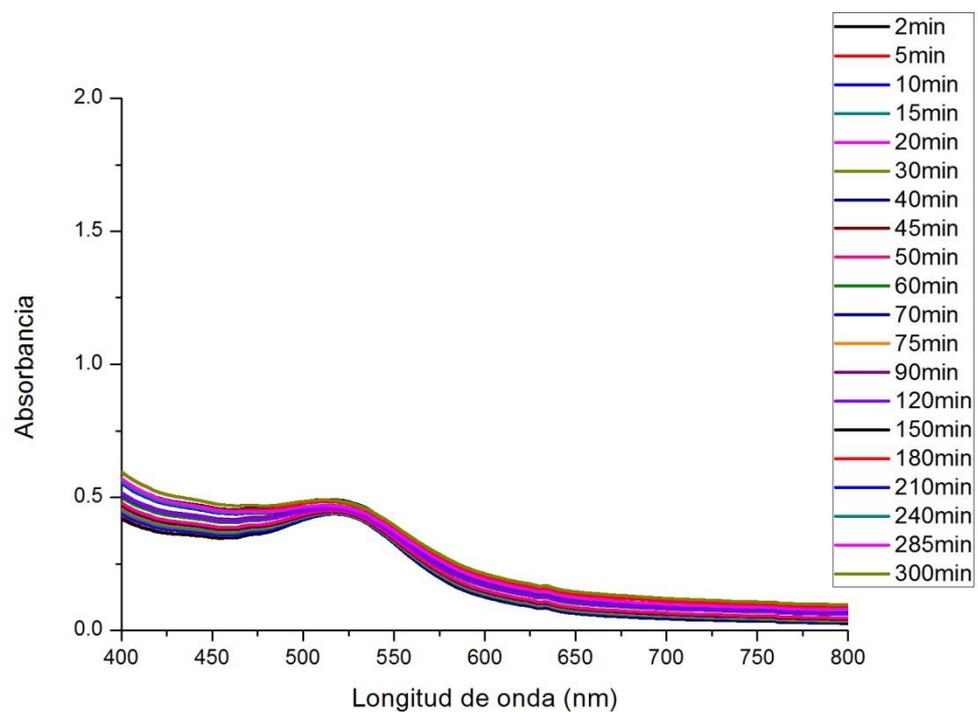
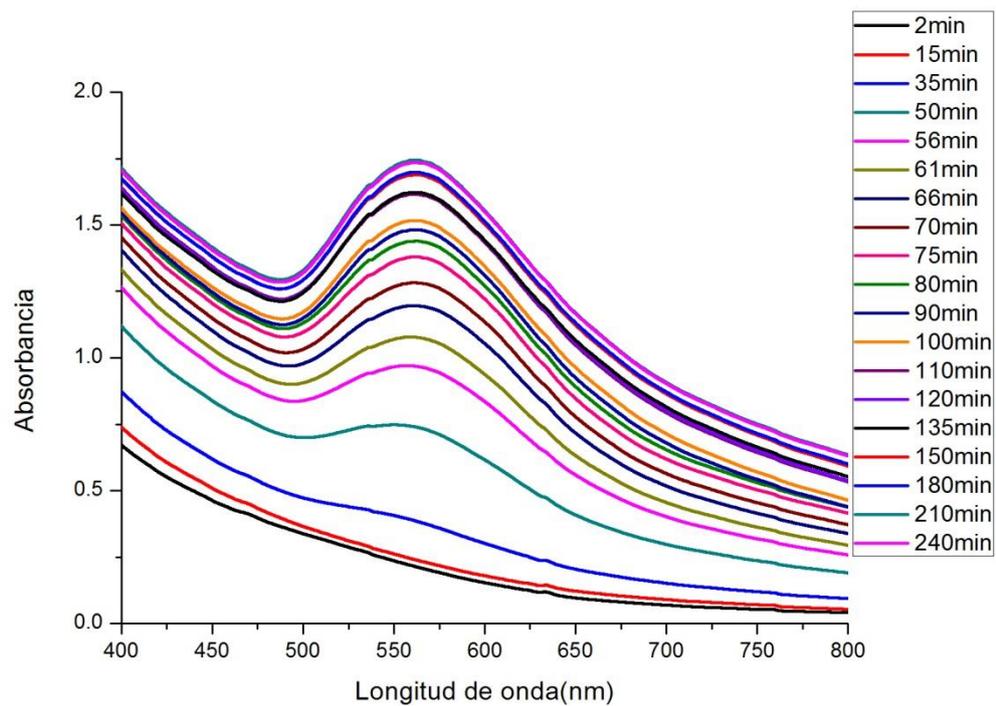
Espectro UV-visible de las cinéticas de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Mencía regadío.



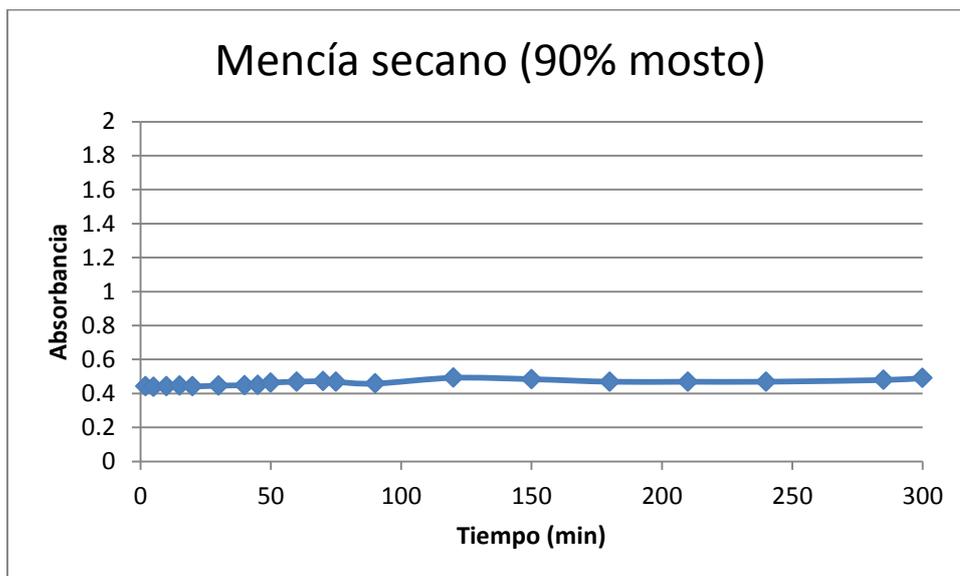
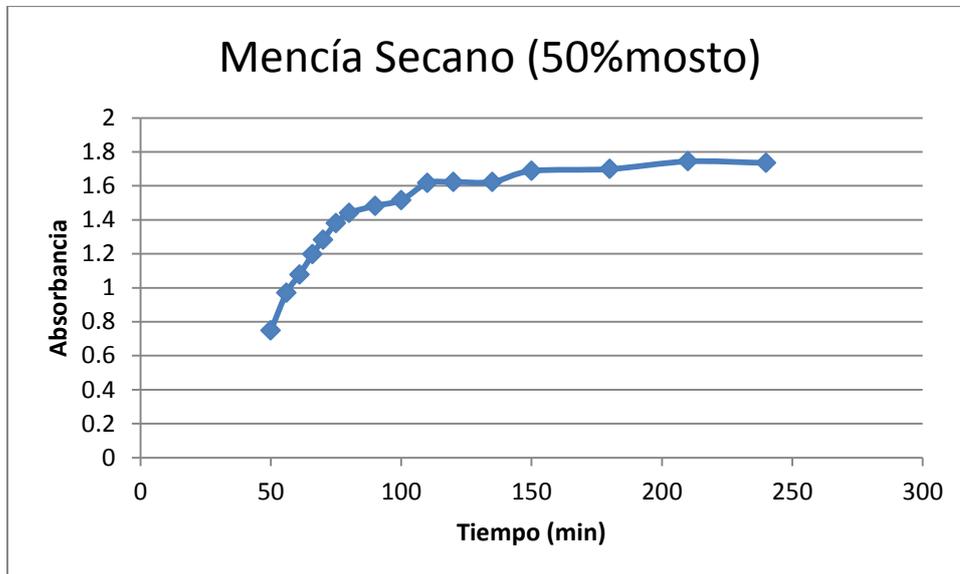
Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Mencia Regadio.



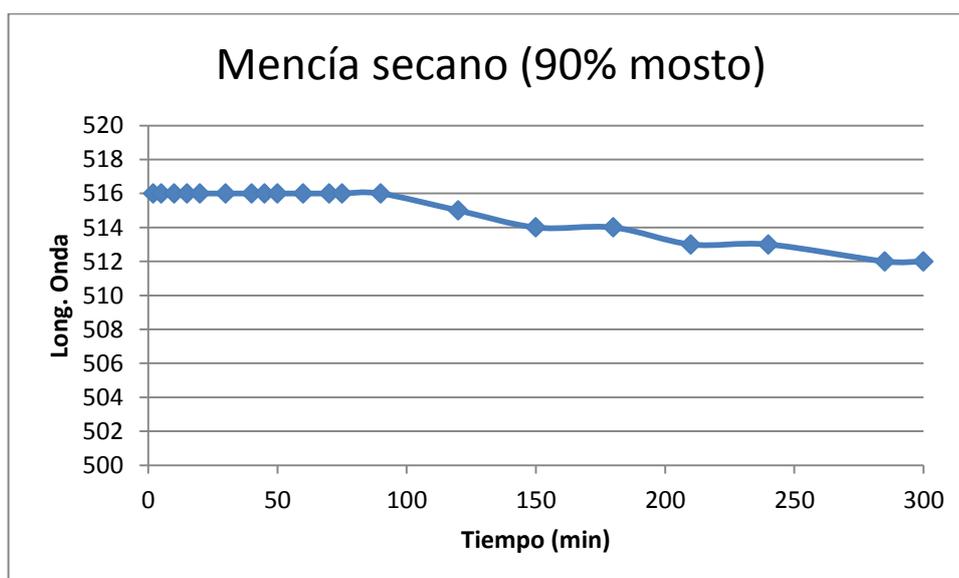
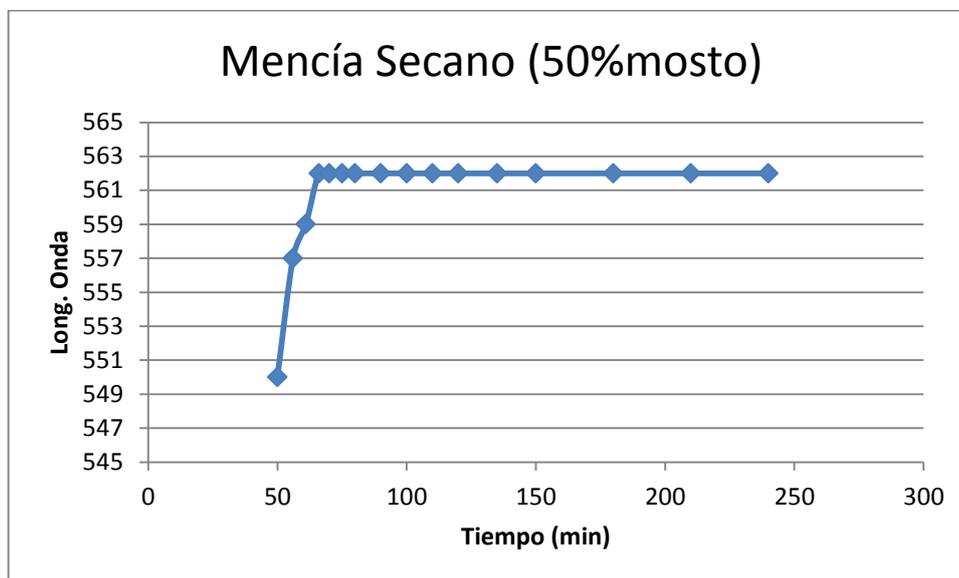
Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Mencía Regadio.

MENCÍA SECANO

Espectro UV-visible de las cinéticas de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Mencía Secano.

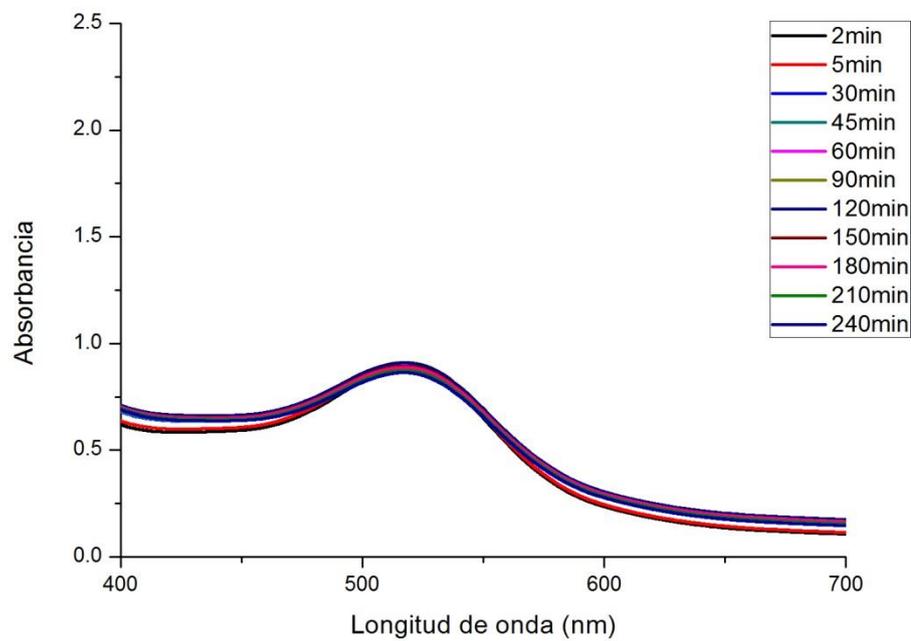
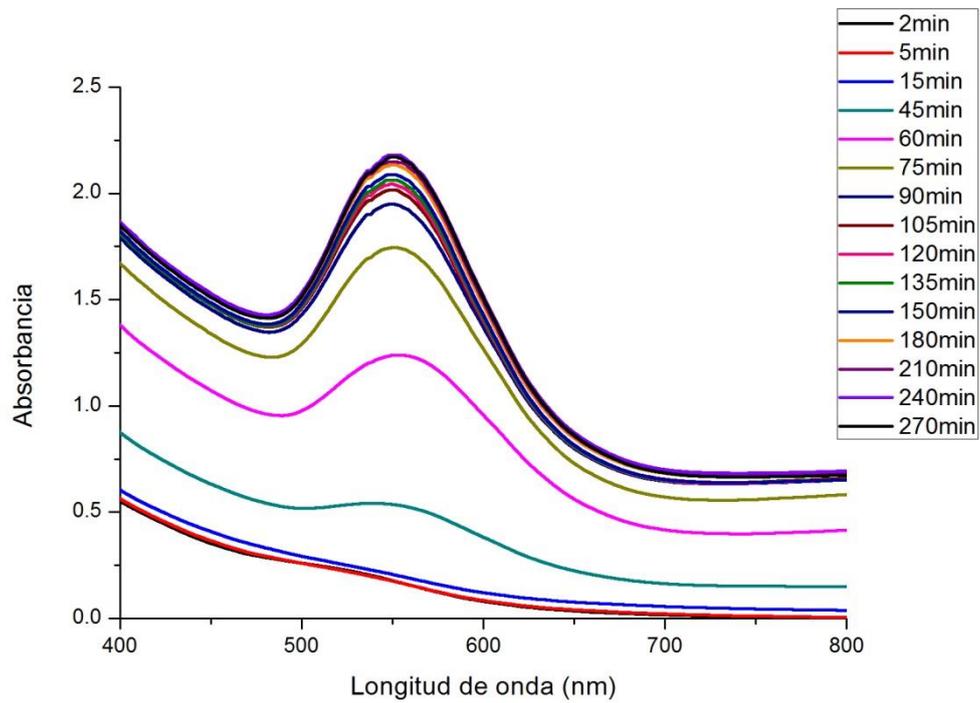


Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Mencia Secano.

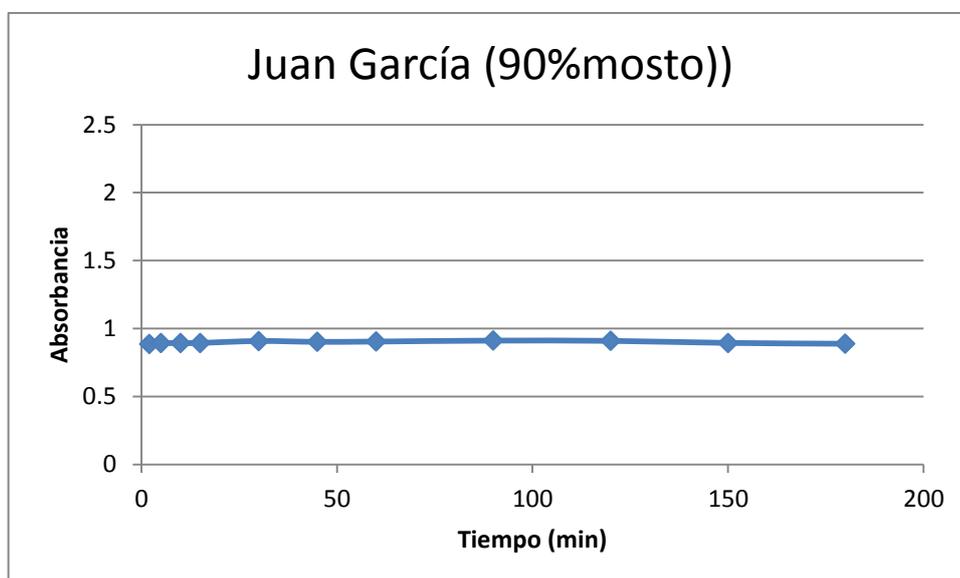
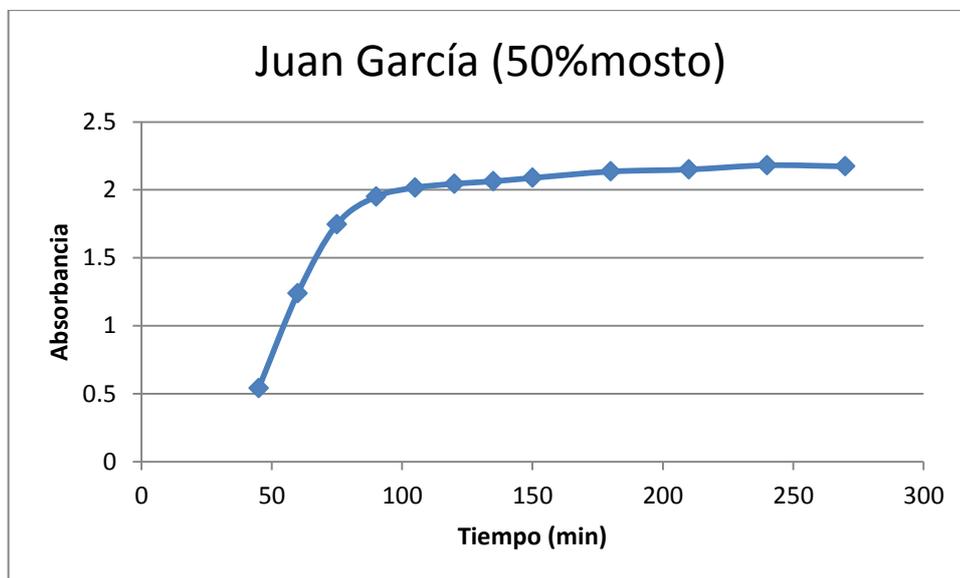


Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Mencía Secano.

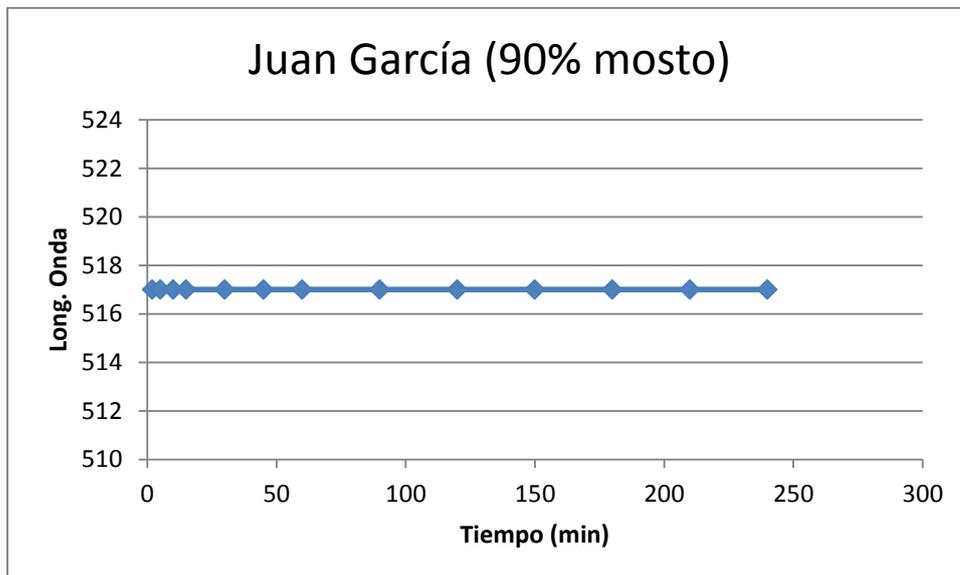
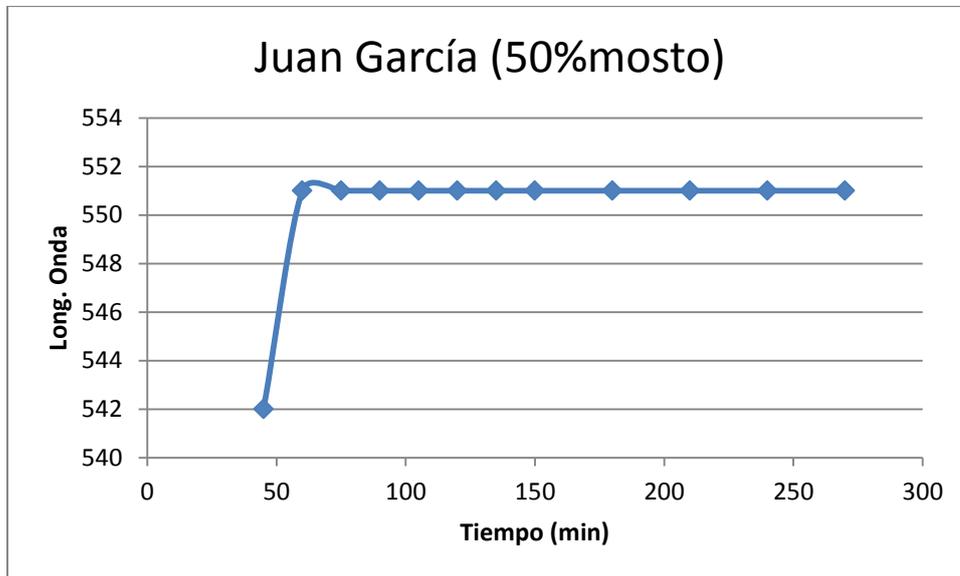
JUAN GARCÍA



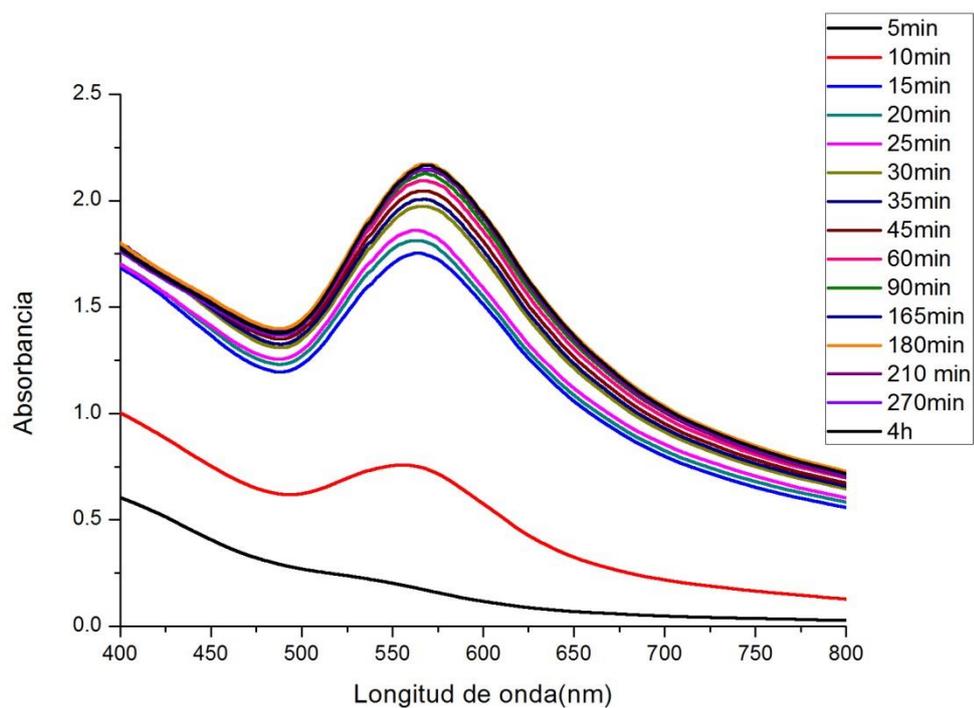
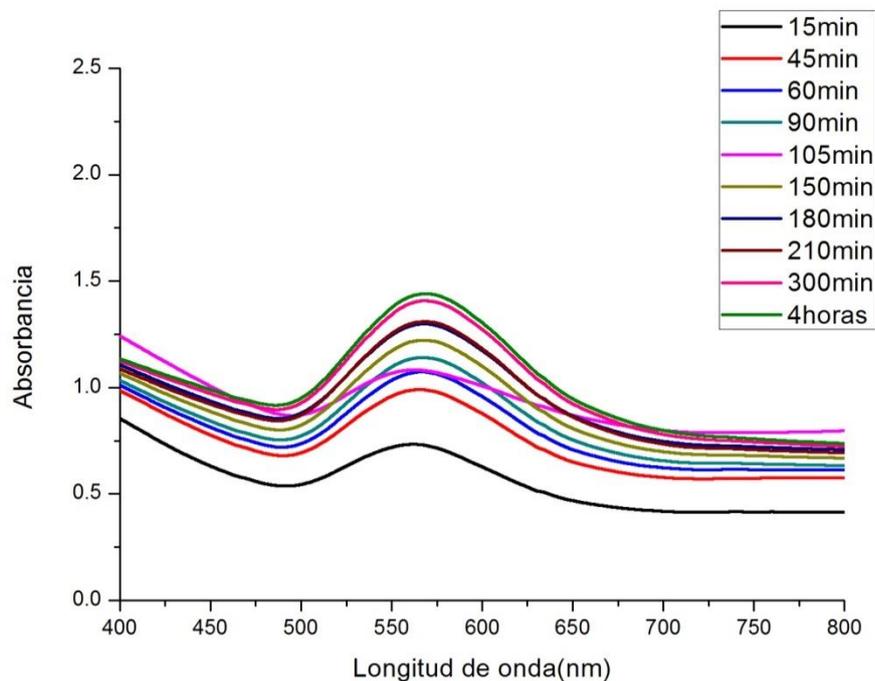
Espectro UV-visible de las cinéticas de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Juan García.



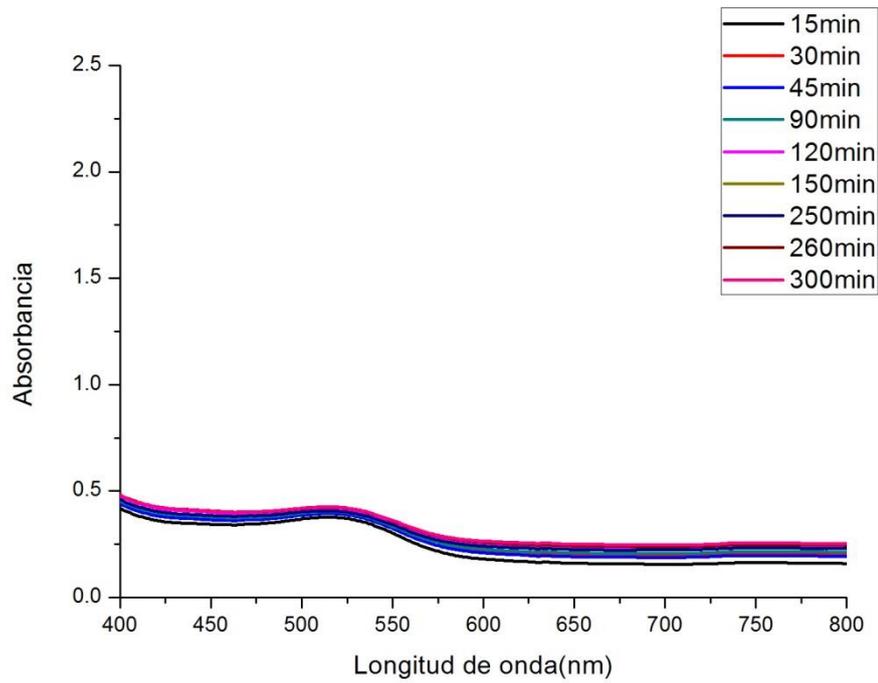
Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Juan García.



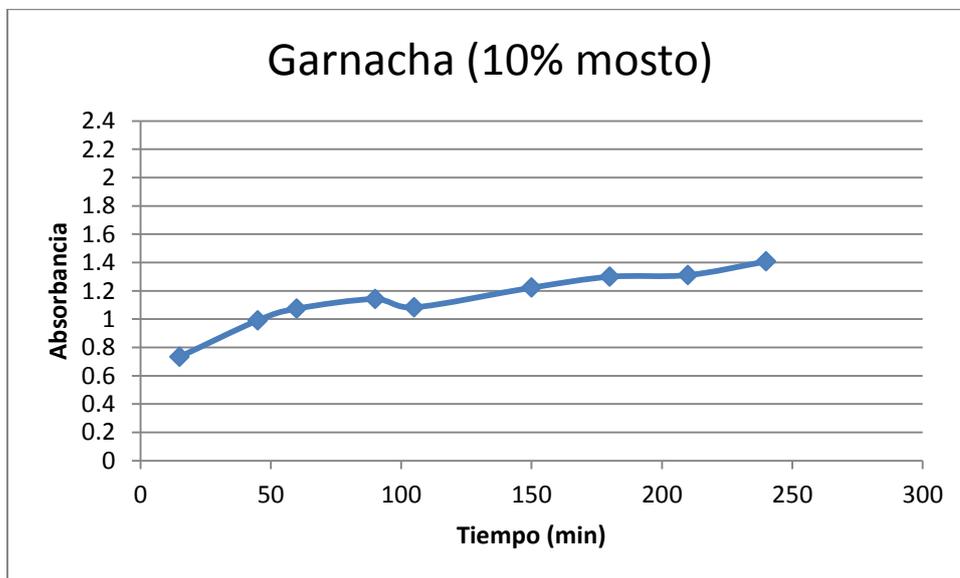
Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Juan García.

GARNACHA

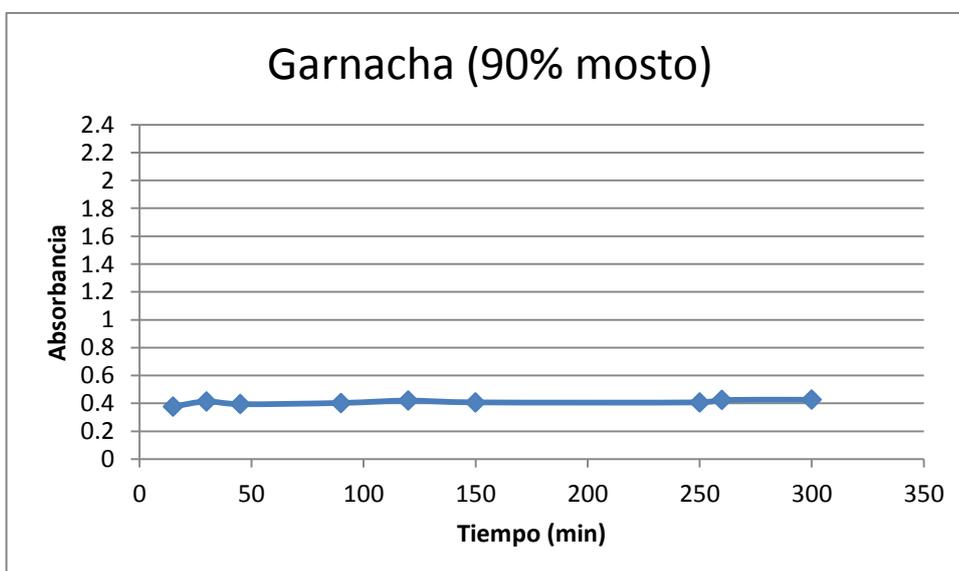
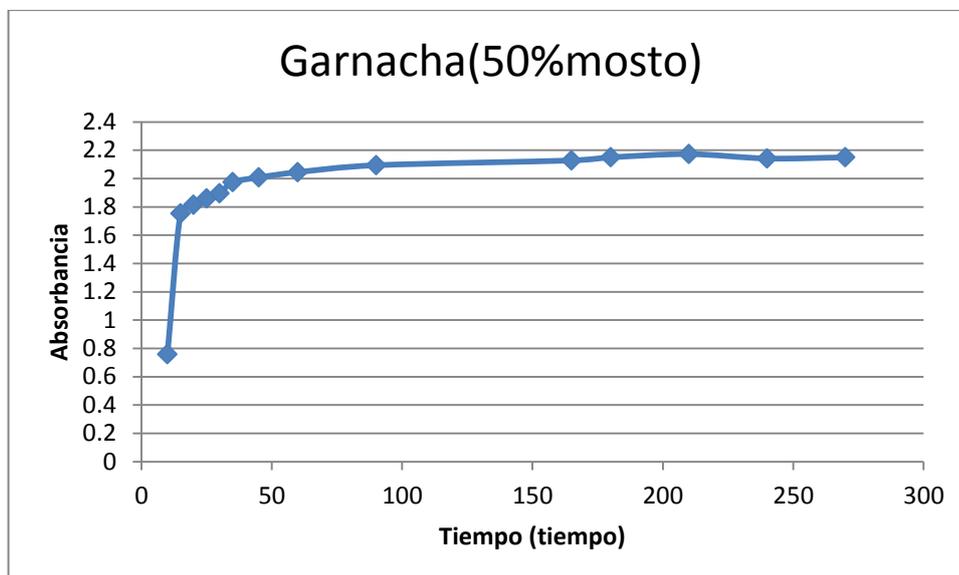
Espectro UV-visible de las cinéticas de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 10% de mosto (superior) y un 50% mosto (inferior) de la variedad Garnacha.



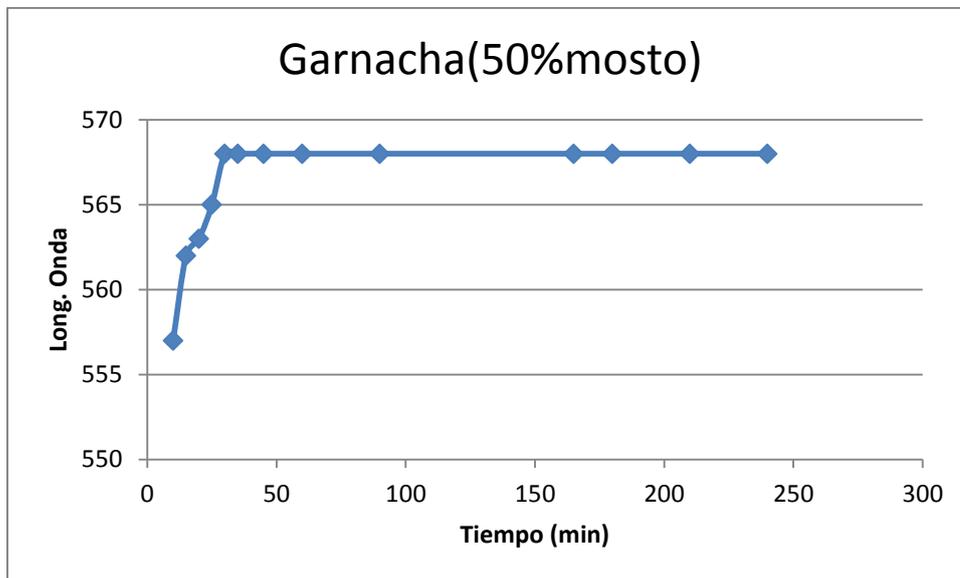
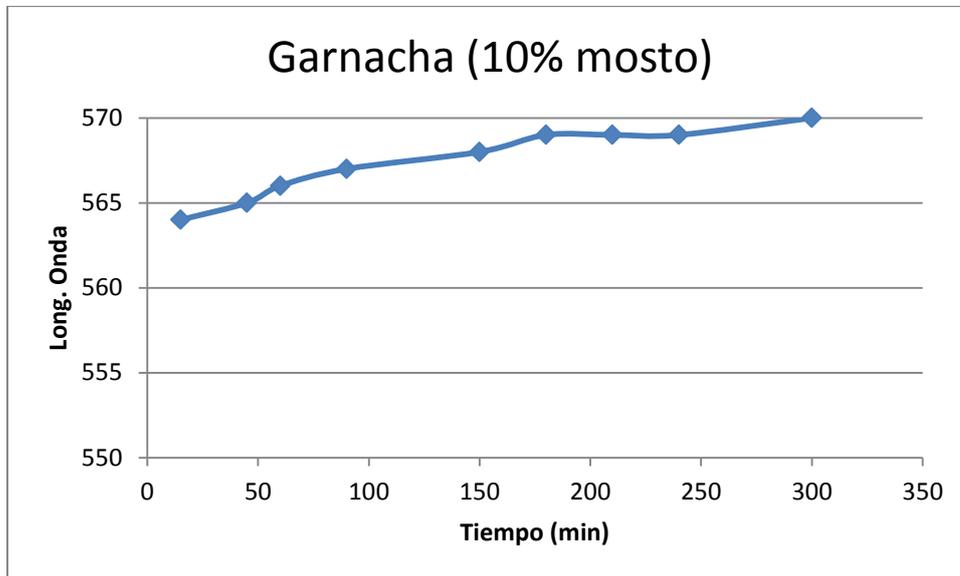
Espectro UV-visible de las cinéticas de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 90% mosto de la variedad Garnacha.



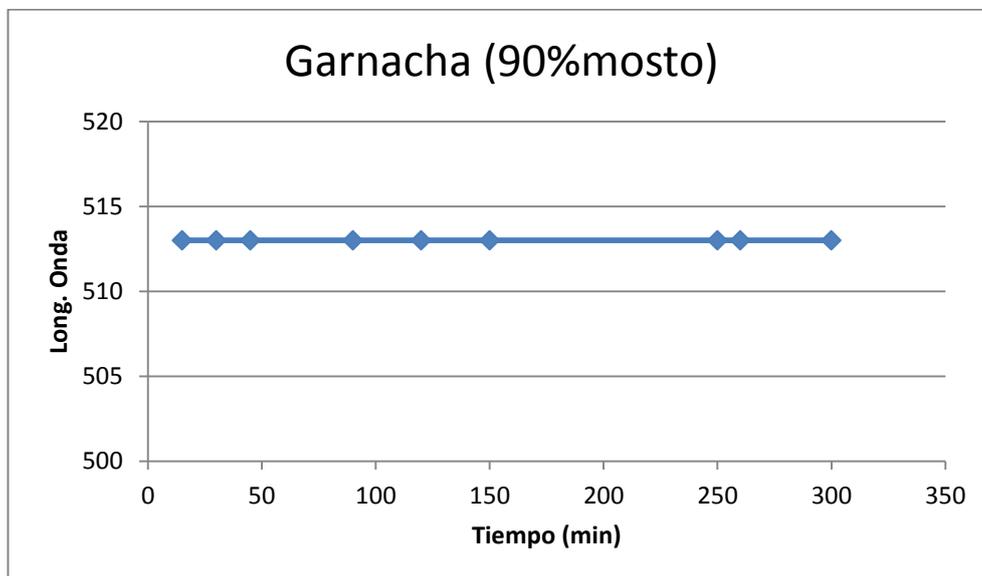
Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 10% de mosto de la variedad Garnacha.



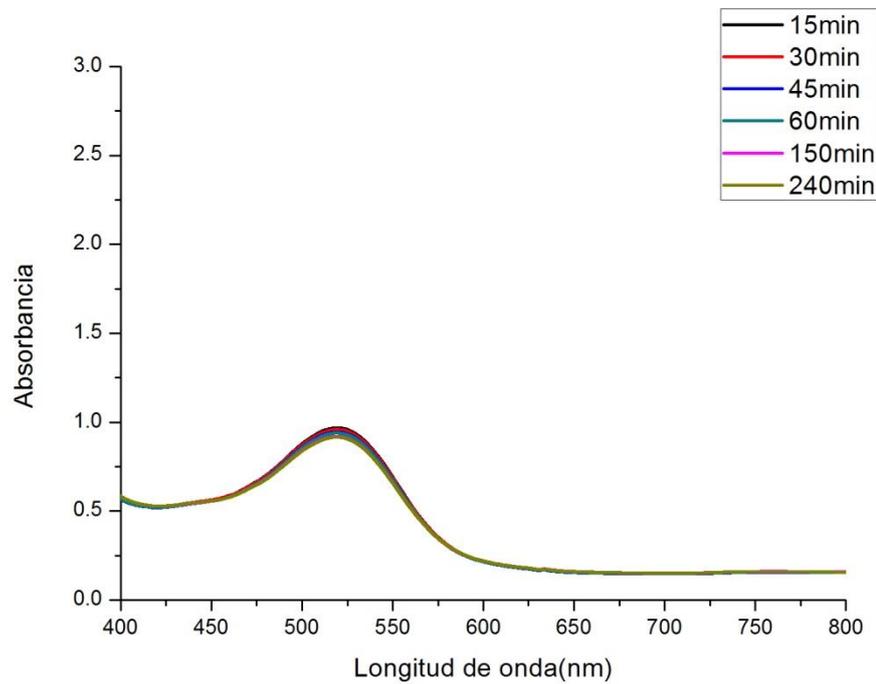
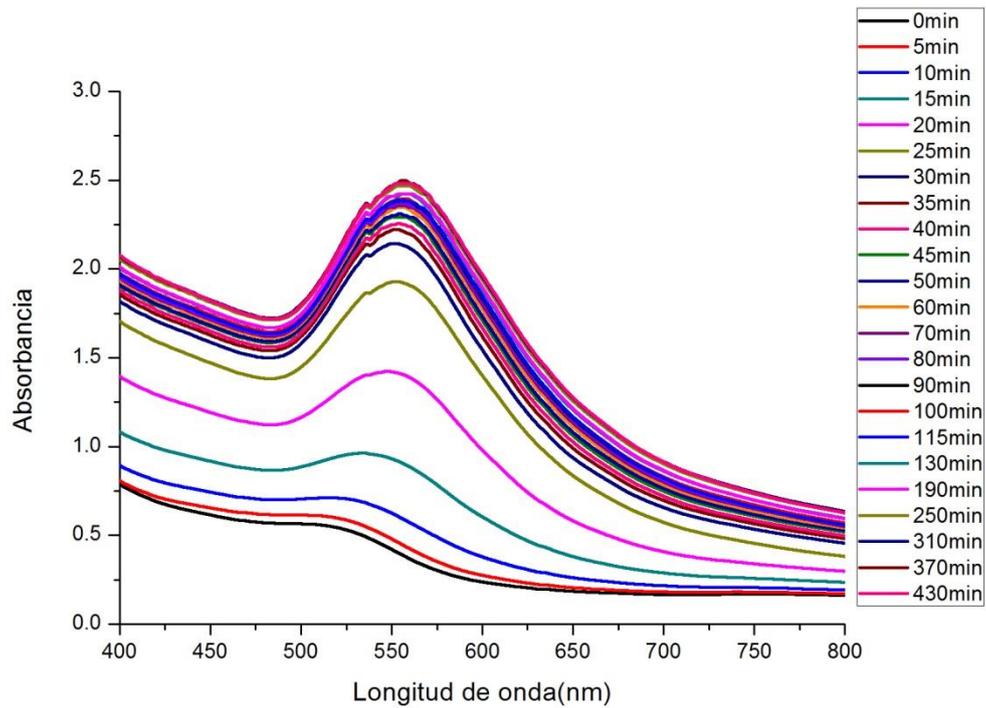
Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Garnacha



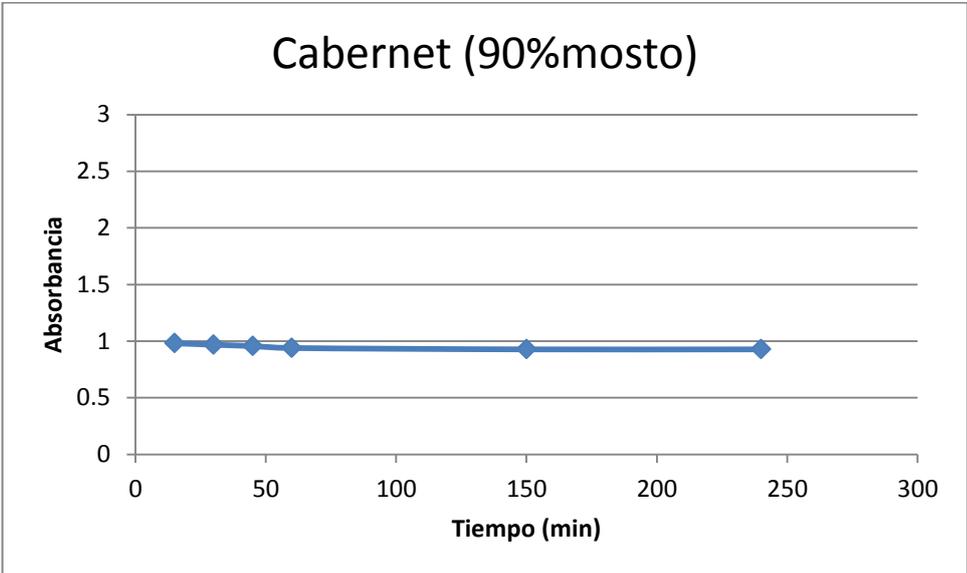
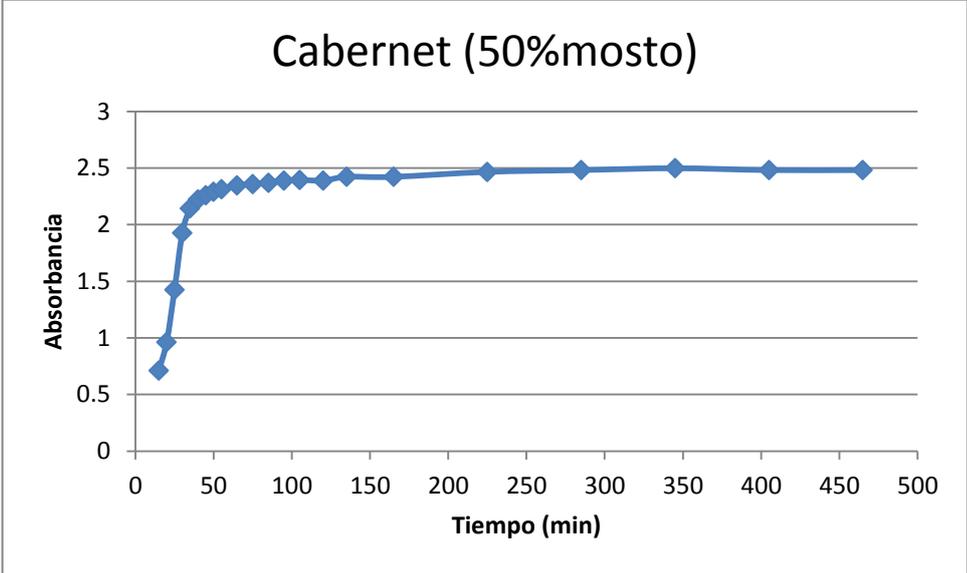
Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 10% de mosto (superior) y un 50% mosto (inferior) de la variedad Garnacha.



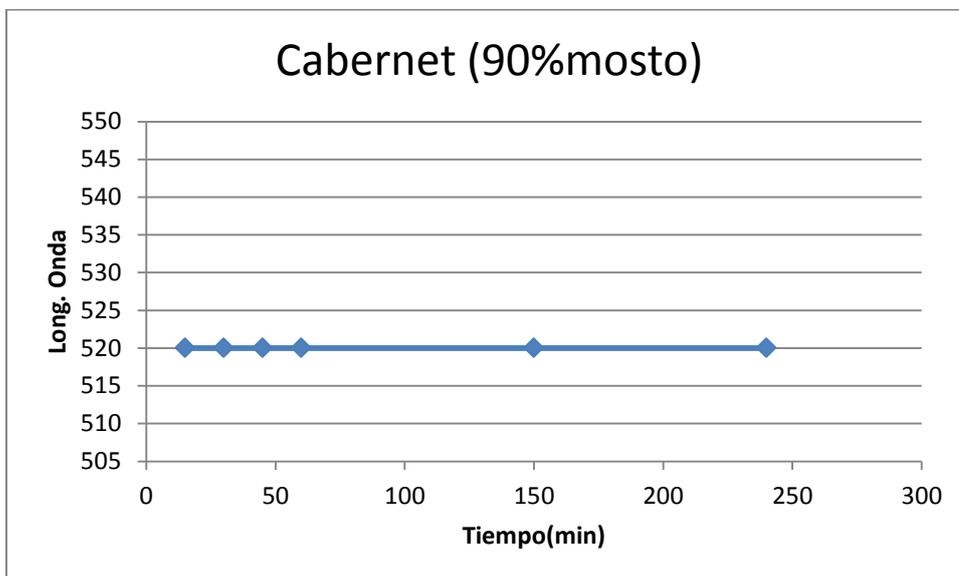
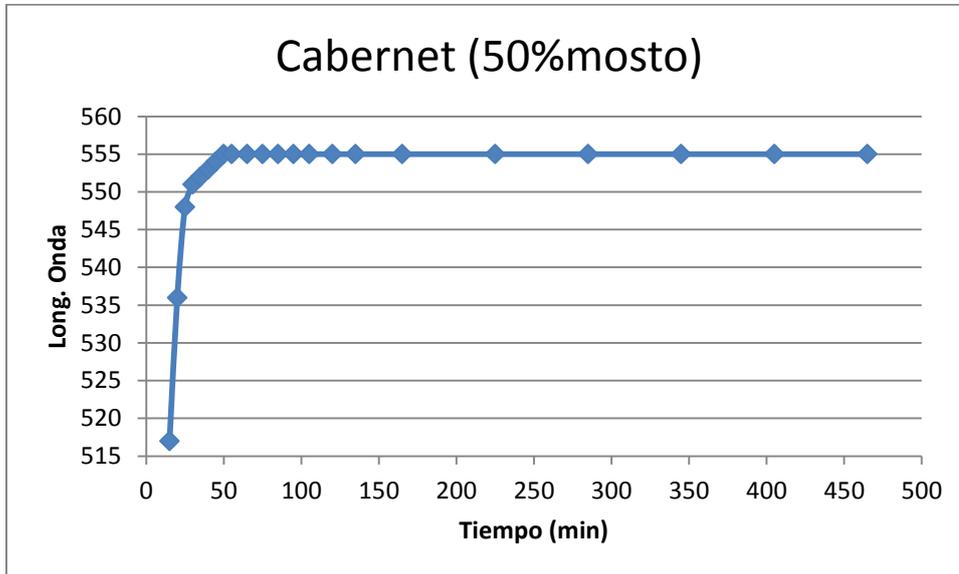
Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 90% de mosto de la variedad Garnacha.

CABERNET

Espectro UV-visible de las cinéticas de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Cabernet.



Absorbancia frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Cabernet



Longitud de onda frente tiempo de las AuNPs de oro en solución obtenidas con un 50% de mosto (superior) y un 90% mosto (inferior) de la variedad Cabernet

