



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Caracterización de nanopartículas de plata en bebidas mediante SP-ICP-MS

Characterization of silver nanoparticles in drinks using SP-ICP-MS

Autor/es

Alba Guerrero Pérez

Director/es

Martín Resano Ezcaray

Diego Pereira Leite

Facultad de Veterinaria

2018

Índice:

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
4. Justificación y Objetivos.....	13
5. Metodología.....	14
5.1 Materiales.....	14
5.2 Instrumentación:	15
5.3 Métodos:	16
6. Resultados y discusión.....	18
6.1. Investigación de los efectos de matriz.....	18
6.2. Elección del tipo de nebulizador.....	19
6.3. Caracterización de AgNPs en vinos sintéticos.....	20
6.4 Aplicación del método para muestras de vinos reales.....	25
7. Conclusiones.....	27
8. Conclusions.....	28
9. Valoración personal.....	29
10. Bibliografía.....	30

1. Resumen.

Caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs) en bebidas mediante SP-ICP-MS:

El vino es un alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva que, tomado con moderación y acompañando en las comidas, es saludable para el organismo. Sin embargo, contiene sulfitos, compuesto químico de gran importancia en enología por sus propiedades como antioxidante, antioxidásico y antimicrobiano. Actualmente, este aditivo es prácticamente irremplazable y, pese a sus desventajas, sólo se ha conseguido reducir las dosis de empleo.

Una de las alternativas para su eliminación es la utilización de AgNPs. Sin embargo, la exposición humana a AgNPs se va a aumentar considerablemente en los próximos años y es importante controlar este aumento. Por lo tanto, es imprescindible su determinación para evitar que se superen unos límites, que actualmente no están establecidos en el vino.

Para su determinación, caracterización y cuantificación, la metodología que se ha utilizado en este Trabajo de Fin de Grado (TFG) es la llamada Detección Individual de Partículas mediante Plasma de Acoplamiento Inductivo con Detección por Espectrometría de Masas (SP-ICP-MS).

A través de los estudios realizados se escogió, en función del diámetro obtenido y de la recuperación del número de partículas, el nebulizador más adecuado para la detección, cuantificación y caracterización de AgNPs. Además, se comprobó la existencia de efectos de matriz en la muestra de vino y se desarrollaron estrategias para mitigarla.

El método desarrollado permite caracterizar NPs a niveles de concentración muy bajos y sin tratamiento de muestra, con valores satisfactorios de recuperación, si bien el diámetro tiende a ser algo menor del esperado (10 - 20 %).

2. Abstract.

Characterization of silver nanoparticles in drinks using SP-ICP-MS:

Wine is a natural food obtained exclusively by alcoholic fermentation, total or partial, of fresh grapes, crushed or not, or grape-juice that, taken in moderation and accompanying in meals, is healthy for the body. However, it contains sulphites, a chemical compound of great importance in oenology due to its antioxidant, antiseptic and antimicrobial properties. Currently, this additive is practically irreplaceable and, despite its disadvantages, only the employment doses have been reduced.

One of the alternatives for its elimination is the use of AgNPs. However, human exposure to AgNPs will increase considerably in the coming years and it is important to control this increase. Therefore, its determination is essential to avoid exceeding limits, which are currently not established in wine.

To its determination, characterization and quantification, the methodology that has been used in this End of Degree Project, is called Individual Detection of Particles by Inductively Coupled Plasma with Detection by Mass Spectrometry.

Through the studies carried out, the most appropriate nebulizer for the detection, quantification and characterization of AgNPs was chosen based on the diameter obtained and the recovery of the number of particles. In addition, the existence of matrix effects in the wine sample was verified and strategies were developed to mitigate it.

The developed method allows to characterize NPs at very low concentration levels and without sample treatment, with satisfactory recovery values, although the diameter tends to be somewhat lower than expected (10 - 20 %).

3. Introducción.

La vid y el vino forman parte de la vida cotidiana del ser humano, siendo una de las primeras plantas que ha sido investigada y cultivada, debido a sus aplicaciones como alimento, medicina e incluso como cosmético. A lo largo de la historia, ningún producto agrícola ha llegado a ser considerado objeto de culto como el vino (Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Gobierno de España, 2017). Del mismo modo, la cultura del vino está relacionada con el ser humano y está presente especialmente en el mundo occidental, que la ha valorado y desarrollado económica, social, artística y literariamente desde múltiples puntos de vista (Alonso, 2014).

En el siglo XIX, el vino surgió como una forma de turismo de interés especial, que cubrió las necesidades demandadas por un segmento que estaba en creciente auge, el enológico. El turismo enológico tiene su origen en las diversas manifestaciones del mundo del vino: las tradiciones, los negocios, la salud, la gastronomía, las competiciones, etc. orientadas al turismo. El negocio del enoturismo ha experimentado un desarrollo importante en todo el mundo (Millán, 2012).

Actualmente, la viticultura se ofrece fuerte, ambiciosa y deseosa de alcanzar más metas en la elaboración y difusión de su producto y de sus valores. En España hay un extenso y afamado patrimonio cultural vinculado al vino, con una gran superficie de viñedo plantada y un elevado número de Denominación de Origen Protegida (DOP) vitivinícola. Según la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) en 2014, España con aproximadamente 1 millón de hectáreas se consideraba la mayor superficie del mundo de viñedo plantada. Cada vez más es mayor el número de bodegas que pueden presumir de ser identificadas no solo por sus vinos, sino también por otros valores culturales como edificios singulares, museos y colecciones de arte, alcanzando un reconocimiento tanto en el ámbito nacional como en el internacional (Alonso, 2014).

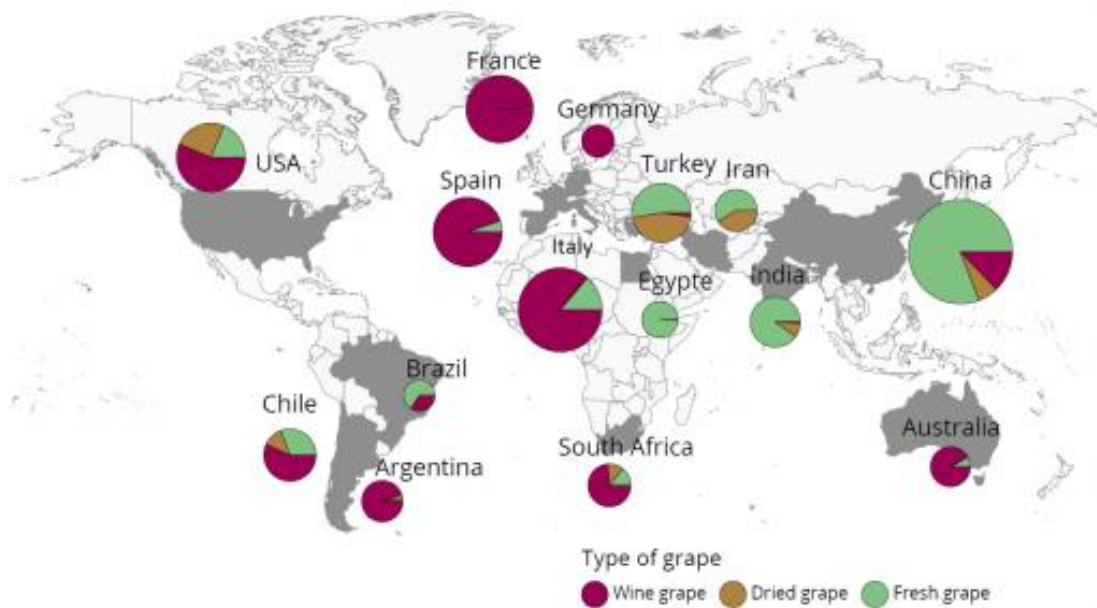
El vino, según el artículo 2 de la Ley 24/2003, está definido como el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva (Boletín Oficial del Estado (BOE), 2003).

Este alimento es una pieza más de la pirámide nutricional y de la dieta mediterránea que, tomado con moderación y acompañando en las comidas, es saludable para el organismo. Muchos estudios han demostrado los beneficios de un consumo moderado de vino tinto. Como la prevención de enfermedades cardiovasculares, mejoras del metabolismo y la

reducción de algunos tipos de cáncer y de cálculos renales. Estas propiedades saludables se deben, sobretodo, a la presencia de polifenoles que también se encuentran en el cacao, arándanos, fresas, etc (López et al., 2013).

Según el informe de la OIV de 2017, España destina sus uvas principalmente para la producción de vino. Como se puede observar en la Figura 1, Alemania, España, Francia e Italia destacan como principales productores de vino frente a productores de uva de mesa y uva seca, como China, Estados Unidos, Irán y Turquía.

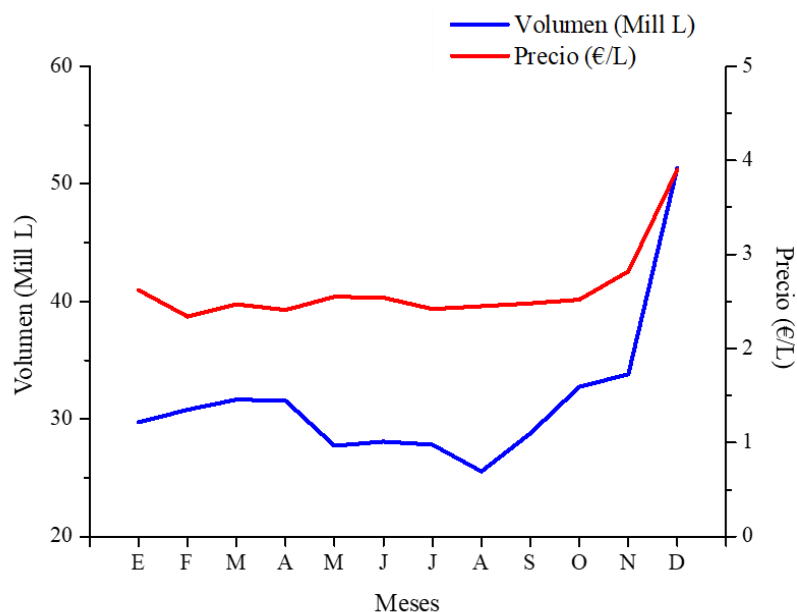
Figura 1. Distribución de los destinos de la uva en el mundo (OIV, 2017).



En España, el vino es un producto estacional con un pico de consumo entre octubre y diciembre, meses en los que aumenta el volumen (véase la Figura 2) y el consumo frente al resto del año se duplica. El crecimiento en valor del producto acompaña el aumento del consumo.

Es relevante destacar que en el mes de diciembre, se obtendrían unas ganancias de 200 millones de euros en vino en España, si se llegase a vender todo lo producido.

Figura 2. Evolución mensual de total compras y precio medio en España (Enero-Diciembre, 2016) (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA), 2017).

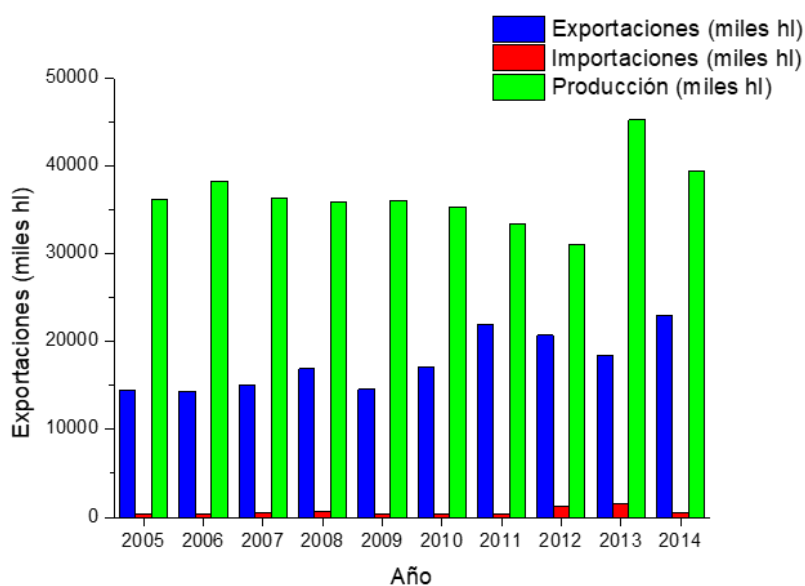


El consumo doméstico de total de vinos a lo largo del año 2016 aumentó un 0,8 % con respecto a 2015. Los hogares españoles destinan a la compra de vinos el 1,53 % de su presupuesto para la alimentación y bebidas, lo que supone un gasto per cápita de 23,38 €/persona/año (un 7,8 % más en relación a 2015), siendo el consumo medio de 8,65 litros/persona/año. El tipo de vino con mayor consumo por persona se corresponde con los vinos sin DOP/Indicación Geográfica Protegida (IGP), con un consumo de 4,07 litros/persona/año (MAPAMA, 2017).

En la Figura 3, se pueden observar los datos de exportación, importación y producción de España desde el año 2005 hasta el 2014.

Como conclusión, se obtiene que aproximadamente la mitad de lo que se produce se exporta y que tan apenas se importa de otros países.

Figura 3. Datos de producción, exportación e importación en España (OIV).



Según la Base de Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA), el componente que proporciona la mayor cantidad de energía al vino, es el alcohol con un 97 %, y luego se encuentran los carbohidratos con un 2 % y la proteína con un 1 %. Estos valores se corresponden al vino tinto. Sin embargo, no hay grandes diferencias con los valores respecto al vino rosado y blanco. Los principales elementos macronutrientes que componen los vinos son calcio, hierro, potasio, magnesio, sodio, fósforo, selenio y zinc (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de minerales en el vino tinto.

Minerales	Masa/100 g de porción
Calcio	7,6 mg
Hierro, total	0,9 mg
Potasio	93,0 mg
Magnesio	11,0 mg
Sodio	4,0 mg
Fósforo	14,0 mg
Selenio, total	0,2 µg
Zinc	0,05 mg

A parte de estos compuestos, el vino también contiene sulfitos, que se pueden encontrar de forma natural debido a su formación en la etapa de fermentación del vino, o pueden ser el resultado de una adición en el proceso de fabricación.

El dióxido de azufre (SO₂) es un compuesto químico de gran importancia en enología por su gran variedad y complejidad de propiedades, tales como antioxidante, antioxidásico y antimicrobiano. Actualmente, es un aditivo difícilmente reemplazable y, pese a sus desventajas, sólo se ha conseguido reducir las dosis de empleo. En los mostos y vinos son de destacar las siguientes propiedades (Izquierdo, 2010):

- Inhibe el crecimiento de levaduras y bacterias, consiguiendo que la fermentación no se produzca de forma incontrolada. Se ha probado que su acción antiséptica es selectiva y actúa específicamente contra bacterias acéticas y lácticas e inhibe el crecimiento de levaduras apiculadas a concentraciones por debajo de 50 mg/L, mientras que las levaduras elípticas, especialmente *S. cerevisiae* presentan alta resistencia, sobreviviendo a niveles de 1.200 mg/L.
- Efecto antioxidante protegiendo al mosto del oxígeno del aire, debido a su carácter reductor.
- Destruye las oxidasas de la uva, enzimas catalizadoras de la oxidación de los fenoles y el aroma de los mostos.
- Facilita la extracción de fenoles y materias colorantes durante la maceración y estabiliza el color del vino durante la etapa de crianza.
- Activa las reacciones de transformación de glucosa y fructosa de la uva en alcohol.

No obstante, el sulfitado en la vinificación puede tener también consecuencias desfavorables como retrasar o impedir la fermentación maloláctica, decolorar parcialmente el vino tinto, por unión del SO₂ a los antocianos. También puede originar aromas poco agradables. Si la dosis de SO₂ adicionada es demasiado elevada, el vino adquiere un olor picante y un regusto desagradable, característico de esta sustancia.

Por otro lado, se ha demostrado que la presencia de sulfitos en alimentos puede dar lugar a reacciones alérgicas, ya que no es un compuesto inocuo. Las intolerancias alimentarias, alergias y reacciones adversas al consumo de cierto tipo de alimentos constituyen un problema emergente para la salud pública. La incidencia de estas intolerancias alimentarias afecta en torno a un 10 % de la población adulta, donde se incluyen las bebidas (Nart et al., 2017). Sin embargo, los sulfitos no tienen efectos teratogénos ni

cancerígenos, no representando ningún riesgo para la inmensa mayoría de la población a los niveles presentes en los alimentos (ELIKA, 2012).

El sulfuroso se encuentra en el vino bajo dos formas: sulfuroso combinado inactivo y sulfuroso libre. Por estas razones, se ha legislado la cantidad total a añadir. Según el Anexo I B del reglamento (CE) nº 606/2009, los valores oscilan desde 150 a 250 ppm en función del vino y la zona.

La enología moderna exige elaborar vinos de calidad, y que sean beneficiosos para la salud. El sector enológico está obligado, para ser competitivo, a desarrollar y adoptar nuevos procesos que permitan satisfacer dichas exigencias manteniendo la calidad sensorial y reduciendo aquellos compuestos que puedan ser perjudiciales para la salud, entre ellos el sulfito (López et al., 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado limitar su uso e incluso eliminarlo en el tratamiento de alimentos. Por esta causa, la dosis máxima permitida en los vinos ha ido disminuyendo a lo largo de los años. Por lo tanto, existe un interés creciente en la búsqueda de otras sustancias o de nuevas tecnologías que puedan reemplazar o al menos complementar la acción del SO₂, haciendo posible la reducción de sus niveles en los vinos. Se puede emplear el uso de métodos físicos como pulsos eléctricos, ultrasonidos, radiación ultravioleta y altas presiones (López et al., 2013), o adicionar compuestos como el dimetil dicarbonato, bacteriocinas, lisozima, plata coloidal, polifenoles antimicrobianos frente a las bacterias ácido lácticas del vino como una alternativa total o parcial al empleo de SO₂ en enología (García, 2012). Recientemente, se ha empezado a explorar la adición de AgNPs, que es la que compete a este TFG.

El empleo de la plata como biocida es conocido desde hace más de 20 siglos. Las antiguas civilizaciones griegas y romanas utilizaban recipientes de plata para conservar la leche y el vino. Posteriormente, en las cruzadas, era una práctica habitual añadir una moneda de plata en los recipientes con el fin de conservar los líquidos. En el siglo XIX, su uso en medicina estaba ampliamente generalizado hasta el descubrimiento de la penicilina. Con el consecuente comienzo de la era de los antibióticos, el uso de la plata por sus propiedades antimicrobianas descendió. Sin embargo, los problemas derivados de la aparición de cepas resistentes a los antibióticos han hecho que se renueve el interés por la plata, especialmente en forma de NPs, por su actuación antibiótica (Izquierdo, 2010).

Estudios recientes han mostrado que las AgNPs tienen efectos antibióticos frente a un amplio espectro de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y presentan cierta actividad antifúngica y antiviral (Izquierdo, 2010). También es cierto que se necesitan más investigaciones para saber si se puede llegar a reemplazar a los sulfitos en el vino.

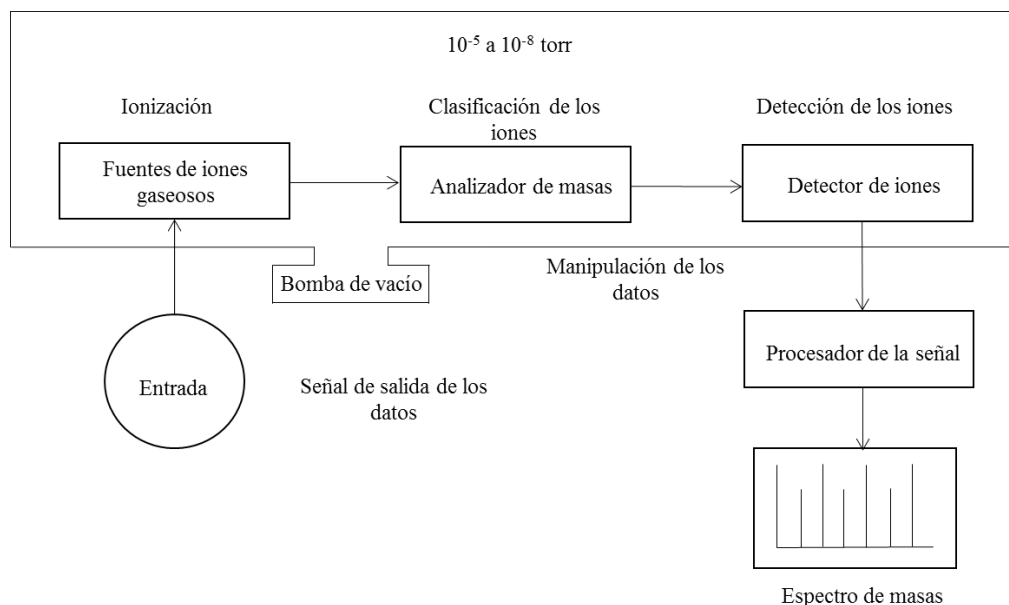
Las AgNPs pueden ser sintetizadas a través de los métodos tradicionales, como la formación de AgNPs a partir de AgNO_3 y agentes reductores (como el ácido ascórbico, los polioles o los monosacáridos). También se pueden sintetizar AgNPs mediante el método de Tollens. Los métodos de síntesis no tradicionales incluyen a los métodos físicos, fotoquímicos y biológicos, como la reducción del metal en matrices porosas, la condensación de un metal en fase de vapor sobre un soporte sólido, la ablación con láser, la fotorreducción de iones plata o la electrólisis (Escobar, 2015).

Existen una amplia gama de técnicas capaces de caracterizar nanomateriales, tales como la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Análisis de Rastreo de Partículas (PTA), Dispersión Dinámica de la Luz (DLS), Análisis de Partículas por Sedimentación Centrífuga (CPS), Dispersión de Rayos-X a Bajo Ángulo (SAXS), Fraccionamiento en Flujo Mediante Campos (FFF). Sin embargo, estas técnicas presentan diversas limitaciones, tales como costes (tanto de análisis como de adquisición y mantenimiento de la instrumentación), incompatibilidad con algunos tipos de muestras y altos límites de detección (LOD) (Pace et al., 2012).

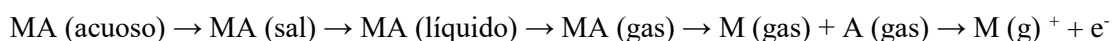
La metodología que se ha utilizado para la elaboración de este TFG es derivada de Plasma de Acoplamiento Inductivo con Detección por Espectrometría de Masas (ICP-MS), y se denomina Detección Individual de Partículas (SP) mediante ICP-MS, siendo una metodología emergente para detectar, caracterizar y cuantificar NPs (Laborda et al., 2013). El ICP-MS es la herramienta más poderosa utilizada actualmente para el análisis elemental e isotópico a nivel de trazas, ya que permite determinar casi todos los elementos del sistema periódico se pueden determinar con gran sensibilidad, selectividad y una precisión razonable (Skoog et al, 1971). Aunque el número de aplicaciones de SP-ICP-MS es todavía reducido.

Un espectrómetro de masas es un instrumento que separa los iones según su relación masa/carga. La mayoría de los iones que se generan en un ICP presentan una sola carga, de modo que la relación de iones es sencillamente la masa del ion (Skoog et al, 1971).

Figura 4. Adaptado a partir del libro "Principios de análisis instrumental" (Skoog et al, 1971). Componentes de todos los tipos de espectrómetros de masas.



En un ICP-MS, se introduce la muestra líquida de forma continua mediante un nebulizador, que la transforma en un aerosol de gotas pequeñas (menores de 100 μm) y uniformes, en un plasma formado por un flujo continuo de argón. El ICP es una fuente de calor capaz de aumentar la energía cinética y por lo tanto aumentar la temperatura hasta más de 8.000 Kelvin, originando cambios en la muestra, de acuerdo con la siguiente secuencia de pasos:



Nótese que en el último paso los enlaces de las moléculas se rompen y se producen iones a partir de los compuestos introducidos, que son cuantificados mediante espectrometría de masas. El argón es el gas que se utiliza, ya que es un gas inerte y no causa muchas interferencias. El tamaño de las gotas generadas en el nebulizador es importante, puesto que solo las gotas suficientemente pequeñas pueden ser transformadas correctamente según el esquema presentado anteriormente. La cámara de nebulización separa y elimina las gotas grandes, de forma que la eficacia total de transporte sólo llega al 1 - 2 % (Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), 2017).

El plasma se genera dentro de una antorcha, que consiste en tres tubos concéntricos de cuarzo a través de los cuales fluyen corrientes de argón en el seno de un campo electromagnético. Este plasma es un gas con parte de sus moléculas o átomos ionizados,

una mezcla gaseosa conductora de la electricidad que contiene cationes y electrones. Los iones positivos de los analitos producidos en este plasma se introducen a través de una interfase de vacío diferencial unida en un espectrómetro de masas, normalmente cuadrupolar. Este cuadrupolo consiste en cuatro barras de metal que se encuentran paralelas y equidistantes, a las cuales se les aplica un potencial de corriente continua y de radiofrecuencia. La combinación de estos campos hace que solo aquellos iones de una determinada relación masa/carga tengan una trayectoria estable y lleguen al detector. Por lo tanto, el cuadrupolo separa los iones en base a su relación masa/carga (UPCT, 2017). Posteriormente, estos iones son detectados y cuantificados por un multiplicador de electrones.

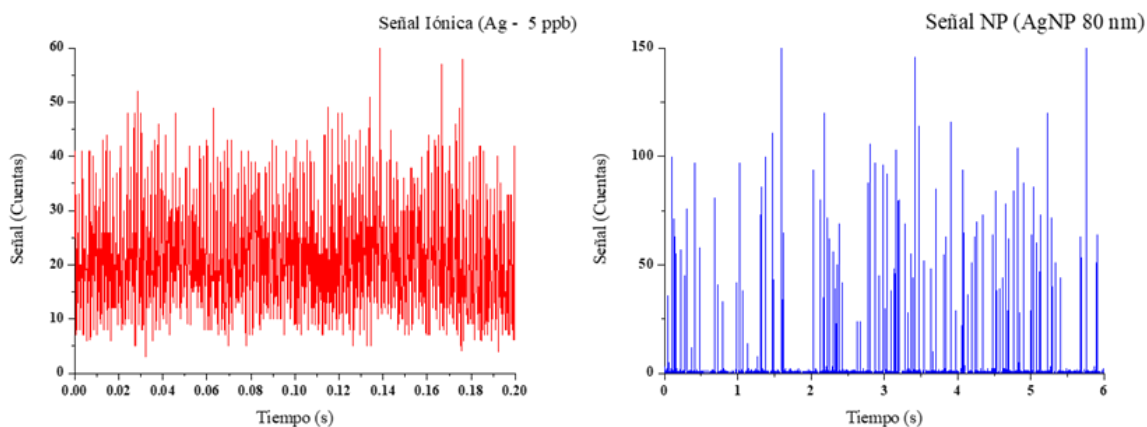
Los espectros producidos de esta manera consisten en una serie sencilla de picos de isótopos de cada elemento presente. Estos espectros se utilizan para la determinación cualitativa de los elementos presentes en la muestra y para su medida cuantitativa. Esta última se suele realizar mediante la preparación y medida de curvas de calibrado a partir de patrones de los analitos de concentración conocida (Skoog et al, 1971).

Los efectos de matriz suelen causar una reducción en la señal del analito, aunque en ciertas condiciones experimentales se observa un aumento de dicha señal. El efecto de la matriz es bastante general produciéndose a elevadas concentraciones de casi cualquier elemento, ya que dicho elemento acapara la mayoría de la energía del plasma afectando a la ionización del resto. Por lo general, dichos efectos se pueden minimizar utilizando disoluciones más diluidas, alterando el procedimiento de introducción de la muestra, o separando las especies que lo provocan. Los efectos también pueden ser eliminados en gran medida utilizando un patrón interno apropiado, es decir, introduciendo en patrones y muestras un elemento de concentración conocida que tenga aproximadamente la misma masa y potencial de ionización que el analito (Skoog et al, 1971).

La forma de trabajo en el modo SP-ICP-MS es diferente a la habitual en ICP-MS. Las formas solubles de un elemento están distribuidas homogéneamente en una solución, incluso a bajas concentraciones. Así, la masa del elemento de interés que se detecta es constante, produciendo una señal estable durante el periodo de lectura. En contraste, si la muestra contiene NPs, el elemento no está distribuido homogéneamente, es decir, está especialmente concentrado, estando presente como grupos discretos de átomos. Por ello, si se nebuliza en el plasma una suspensión suficientemente diluida de NPs, se producirá un paquete de iones para cada NP vaporizada, atomizada e ionizada, que producirá una

señal transitoria de una duración muy corta (cientos de μs , dependiendo del tamaño de las NPs) (Laborda et al., 2013).

Figura 5. Comparación de la señal iónica con la señal de las AgNP.



Es decir, en lugar de obtener señales continuas (véase la Figura 5a), en SP-ICP-MS, una dispersión de NPs altamente diluida se introduce en el ICP-MS usando tiempos de adquisición extremadamente cortos ($10 \mu\text{s} - 10 \text{ms}$)⁷ de forma que se obtienen señales transitorias intensidad-tiempo (véase la Figura 5b). Cada NP individual que llega al plasma acaba generando un pulso por encima de la señal de fondo. La intensidad de cada pulso está relacionada con la masa de la NP (y por tanto, con su tamaño), mientras que el número de pulsos por unidad de tiempo se relaciona con la concentración (número de NPs por unidad de volumen) de la suspensión analizada (Laborda et al., 2013). El motivo de diluir mucho las muestras es para evitar que dos NPs puedan llegar al plasma casi al mismo tiempo, evitando así solapamientos. Por ello, es frecuente trabajar con concentraciones del orden de 50 - 100 ng/L.

En conclusión, aunque sea necesaria una inversión económica alta para adquirir el equipo y realizar las medidas, es una técnica versátil, capaz de caracterizar, cuantificar y de detectar bajos niveles de NPs. Sobre todo, es una de las pocas técnicas que puede proporcionar simultáneamente información sobre el tamaño y la concentración de las NPs, lo que no se puede conseguir con técnicas microscópicas. En este caso, el objetivo es estudiar el potencial de SP-ICP-MS para detectar y cuantificar AgNPs en vino, prestando atención a los posibles efectos de matriz que puedan derivarse del contenido de alcohol y otras sustancias presentes en las muestras.

4. Justificación y Objetivos.

El proyecto desarrollado en el segundo cuatrimestre del Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos tiene como objetivos:

- La observación de las interferencias de matriz en el vino.
- La determinación, cuantificación y caracterización de AgNPs en vino a partir de la nebulización convencional, mediante el modo SP-ICP-MS y un nebulizador ciclónico.
- La determinación, cuantificación y caracterización de AgNPs en vino a partir de la micro nebulización, mediante el modo SP-ICP-MS y un micro nebulizador.
- La comparación de estas dos técnicas para saber cuál permite determinar el número de AgNPs correctas con el diámetro más cercano al valor real en muestras de vino tinto, blanco y rosado.

Existe una búsqueda de nuevas alternativas para la reducción o eliminación de sulfitos en la elaboración del vino. Esto es así, ya que puede constituir un problema para la salud humana en algunas personas causando reacciones alérgicas y por ello la legislación exige que existan unos límites máximos en el vino.

Una de las alternativas más recientes es la utilización de AgNPs, debido a sus efectos antibióticos presentando cierta actividad antifúngica y antiviral. Aunque, bien es cierto que se necesitan más investigaciones.

Para la detección, caracterización y cuantificación de AgNPs se utiliza la metodología de SP-ICP-MS, comparando dos nebulizadores para muestras de vino sintético, tinto, rosado y blanco. El método convencional hace que de la muestra líquida introducida sólo llegue aproximadamente del 8 al 12 % al plasma, por lo que su eficacia de transporte es baja. Sin embargo, con la micro nebulización se trabaja con volúmenes menores y puede llegar un 30 % a un 40 % de la muestra al plasma. Hay que comprobar si este hecho permitirá determinar NPs de tamaños más pequeños o no.

5. Metodología.

5.1 Materiales.

Los materiales de vidrio (probetas, Tubos Falcon, vasos de precipitados, etc.) usados para almacenar las soluciones, fueron adecuadamente descontaminados con HNO₃ 10 % (v/v), y lavados con agua Milli-Q. Para el soporte de los Tubos Falcon se emplearon gradillas

Todas las soluciones se prepararon empleando agua desionizada en sistemas de ultra purificación Milli-Q (Millipore, EE.UU.), que permite obtener agua con alto grado de pureza (resistividad > 18,2 MΩ cm).

Se utilizaron soluciones patrón en concentraciones de 1.000 mg/L⁻¹ de Ag (AgNO₃) (Merck, Alemania) para la preparación de las soluciones analíticas de referencia. Para homogeneizar las soluciones, se utilizaron Tubos Falcon con capacidad de 15 ml (VWR, EE.UU.).

El vino sintético se elaboró en el Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología (LAAE), añadiendo 5 g/L de ácido tartárico (Scharlau, España), 5 g/L de glicerina (Scharlau, España), 13,3 % de etanol en volumen (Merck, Alemania) y con pH corregido a 3,5.

Las NPs en suspensión de Ag (nanoComposix, República Checa) y las AgNPs de diámetro nominal de 75 nm (NIST, EEUU), se determinaron la distribución de tamaño de partículas y la concentración en masa por TEM y análisis gravimétrico, respectivamente (valores proporcionados por el fabricante). Las AgNPs 75 nm (diámetro certificado por el fabricante: 74,6 ± 4 nm), fueron usadas para la determinación de la eficacia de transporte en modo SP-ICP-MS, ya que es un material de referencia certificado. Los valores se recogen en la Tabla 2. Todas las suspensiones fueron agitadas e introducidas durante 10 minutos en el baño de ultrasonidos antes de su uso para evitar la aglomeración de las partículas. Las diluciones apropiadas se prepararon a partir de la suspensión original de NPs (concentración final entre 0,1 y 1,3 μg / L⁻¹) para el análisis en modo SP-ICP-MS.

Tabla 2. Información de tamaño de partícula (TEM) y concentración en partícula (análisis gravimétrico) proporcionada por Nanocomposix y NIST para las suspensiones de AgNP usadas en este trabajo.

Tamaño nominal (nm)	Tamaño real (media) (nm)	Concentración de partículas (partículas mL⁻¹)	Concentración en masa (mg/L⁻¹)
50	51 ± 6	3,0 x 10 ¹³	21,0
80	79 ± 7	7,6 x 10 ¹²	21,0
200	202 ± 30	4,8 x 10 ¹¹	22,0
NIST 75	74,6 ± 4	4,6 x 10 ¹⁶	1081,0

5.2 Instrumentación:

Para las medidas de NPs de Ag se utilizó un ICP-MS de cuadrupolo con celda de colisión/reacción, modelo Perkin Elmer Nexion 300X (Perkin Elmer, EE.UU.) en modo SP-ICP-MS. El instrumento contiene dos cuadrupolos, uno para la célula de reacción/colisión, que se encuentra antes del cuadrupolo analizador. Esta célula se puede utilizar en modo "estándar", tal y como se hizo en el presente trabajo, sin añadir gases de colisión/reacción, o en modo presurizado con un gas de colisión/reacción o mezcla, en el caso de existir interferencias espectrales. Las condiciones instrumentales empleadas se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros instrumentales de equipamiento Perkin Elmer Nexion 300X.

Parámetros	Condiciones adoptadas
Potencia de radiofrecuencia	1600 W
Caudal del gas de nebulización	0,98 L min ⁻¹
Caudal del gas auxiliar	1,3 L min ⁻¹
Caudal del gas del plasma	18 L min ⁻¹
RPa	0,00
RPq	0,50
Modo de trabajo	Estándar
Isótopos medidos	¹⁰⁷ Ag ⁺ / ¹⁹⁷ Au ⁺⁺
Tiempo de adquisición de datos (dwell time)	100 μs

5.3 Métodos:

Para la elaboración de este TFG se utilizó el modo SP-ICP-MS, para detectar, caracterizar y cuantificar NPs en vino.

Para el desarrollo del método se han utilizado AgNPs de 50, 80 y 200 nm, las cuales se añadieron en las siguientes condiciones: etanol 13,3 % (contenido de alcohol medio del vino), vino sintético, vino sintético diluido 5 y 10 veces. Para la cuantificación de estas NPs, las calibraciones se realizaron por compatibilización de matriz, es decir, medio de etanol, vino sintético y sus respectivas diluciones de las muestras probadas. Para el cálculo de la eficacia de transporte, se utilizaron AgNPs 75 nm de NIST. Las AgNPs 75 nm de NIST se añadieron a soluciones que contenían etanol, para simular el mismo mecanismo de nebulización de los vinos sintéticos. Por ello, se emplearon soluciones del 13,3 % (vino sintético), el 3,24 % (vino sintético diluido 5X) y el 1,27 % (vino sintético diluido 10X).

En las medidas, los datos brutos fueron obtenidos usando el software Syngostix Nano Application, donde por cada intervalo de tiempo se representa un determinado valor de señal (cuentas), y se tratan externamente utilizando una versión modificada de la hoja de

tratamiento de datos publicada por Peters, et al. Esta hoja de trabajo se compone de dos hojas de trabajo interrelacionadas, donde se calculan la eficacia de transporte, calculada con las AgNPs (Pace et al.), seguido por la hoja de caracterización de la NP medida. Para ello se utilizan los valores de eficacia de transporte, así como la pendiente de la curva de calibración obtenida con patrones acuosos de Ag. Es decir, en SP-ICP-MS es preciso realizar un calibrado doble: de la eficacia de transporte (con AgNPs 75 nm de NIST) y de la sensibilidad de la Ag (con patrones acuosos). Los pulsos de NPs se diferencian de los valores de la señal de fondo utilizando el criterio 5σ (5 veces la desviación estándar de la señal de fondo).

6. Resultados y discusión.

6.1. Investigación de los efectos de matriz.

Los vinos por su contenido alcohólico y proteico, poseen efectos de matriz que afectan a la caracterización de NPs, es decir, sus componentes pueden afectar positiva o negativamente a la intensidad de la señal analítica del elemento de interés. Estos efectos pueden ser resultados de las características físicas de la muestra, tales como la tensión superficial o la presión de vapor, y/o de las características químicas de la muestra, tales como la presencia de iones a altas concentraciones que afecten a las condiciones del plasma. Por lo tanto, es necesario investigar la presencia de estos efectos de matriz y, si es necesario, mitigarlos. Las diferencias en la eficacia de transporte y en la sensibilidad de la calibración iónica pueden indicar la existencia de estos efectos.

En primer lugar, se determinó la eficacia de transporte en solución de etanol 13,3 % (promedio del contenido de etanol en vinos) y en vino sintético sin dilución y diluido 5 y 10 veces con AgNPs 75 nm de NIST, que es un material de referencia certificado.

En segundo lugar, se realizó la calibración iónica de Ag, con patrones de 1,0; 2,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, además de un blanco, para definir la sensibilidad en cada condición. Los valores están representados en la Tabla 4.

Tabla 4: Eficacia de transporte y sensibilidad de acuerdo con la matriz de vino sintético.

Matriz	Eficacia de transporte (%)	Sensibilidad (cuentas/$\mu\text{g L}^{-1}$)
Etanol 13,3 %	15,01	4,434
Vino sintético	15,01	1,448
Vino sintético diluido 5X	11,32	2,010
Vino sintético diluido 10X	10,10	2,563

Se pueden observar los efectos de matriz en los dos parámetros medidos. En primer lugar, es mayor la eficacia de transporte cuanto más alto sea el contenido de etanol de la muestra. Esto se debe a que el vino tiene menor tensión superficial que el agua, por lo que el etanol 13,3 % se aspira en mayor cantidad que los vinos diluidos, que poseen menor cantidad de etanol. Además, se observa que la eficacia de transporte para la solución de etanol de 13,3

% es la misma que la del vino sintético, indicando que la eficacia de transporte solo se ve afectada por la cantidad de etanol en disolución. En relación a la sensibilidad, se observa que, cuanto más diluida la muestra, mayor es la sensibilidad, observándose un mayor efecto de supresión de señal de Ag cuanto menos sea diluida la muestra. Esta supresión es debida a la presencia de los otros contenidos del vino sintético (ácido tartárico y glicerina), ya que la disolución que contiene solamente etanol, presenta la sensibilidad observada más alta de todas las disoluciones estudiadas. De esta manera, es necesario realizar la calibración iónica diferente para cada medio estudiado.

6.2. Elección del tipo de nebulizador.

Para la caracterización de AgNPs, se comparó dos tipos de micro nebulizadores: con el nebulizador convencional, que opera a caudales de muestra entre 300 y 500 $\mu\text{L min}^{-1}$ y posee una eficacia de transporte de 8 a 12 %, y el micro nebulizador, que opera a caudales de muestra entre 20 y 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ y posee una eficacia de transporte de 30 a 40 %. Los estudios se llevaron a cabo con las muestras de vino sintético. Las prestaciones de los dos nebulizadores son evaluadas por la comparación de los siguientes parámetros: tamaño de partícula, recuperación de masa y el número de partículas, cuyos valores están reunidos en la Tabla 5. Los valores de 50 nm no están representados por la imposibilidad de caracterizar estas NPs, debidos a los efectos de supresión de la señal de Ag en vinos sintéticos.

Tabla 5: Comparación de los nebulizadores a partir de muestras de Agua MilliQ:

Instrumento	Muestra (nm)	Tamaño de partícula (nm)	Recuperación de número de partículas (%)
Micro nebulizador	80 (79 ± 7)	71,37 ± 0,12	94,96 ± 9,63
	200 (202 ± 30)	149,4 ± 0,82	113,33 ± 9,79
	NIST 75 (74,6 ± 4)	63,80 ± 1,00	80,05 ± 2,33
Nebulizador convencional	80 (79 ± 7)	72,63 ± 1,33	102,41 ± 5,23
	200 (202 ± 30)	166,57 ± 3,80	102,43 ± 3,31
	NIST 75 (74,6 ± 4)	67,30 ± 0,61	95,65 ± 2,46

De acuerdo con los valores de la Tabla 5, se puede observar que, con el nebulizador convencional, los valores experimentales obtenidos para el diámetro de las NPs están más próximos a lo esperado para cada tamaño de AgNPs. Además, con este nebulizador, son obtenidos valores más altos de recuperación en número de partículas (95,65 - 102,41 %). Una posible explicación para esto es la utilización de flujos mayores en el caso del nebulizador convencional. Sin embargo, si se dispone de una menor cantidad de muestra puede ser útil la utilización del micro nebulizador. Por lo tanto, se eligió el nebulizador convencional para la caracterización de AgNPs en vinos.

La incertidumbre en los valores calculados de tamaño de partícula y porcentaje de recuperación de partícula se expresan como la desviación estándar de 3 réplicas.

6.3. Caracterización de AgNPs en vinos sintéticos.

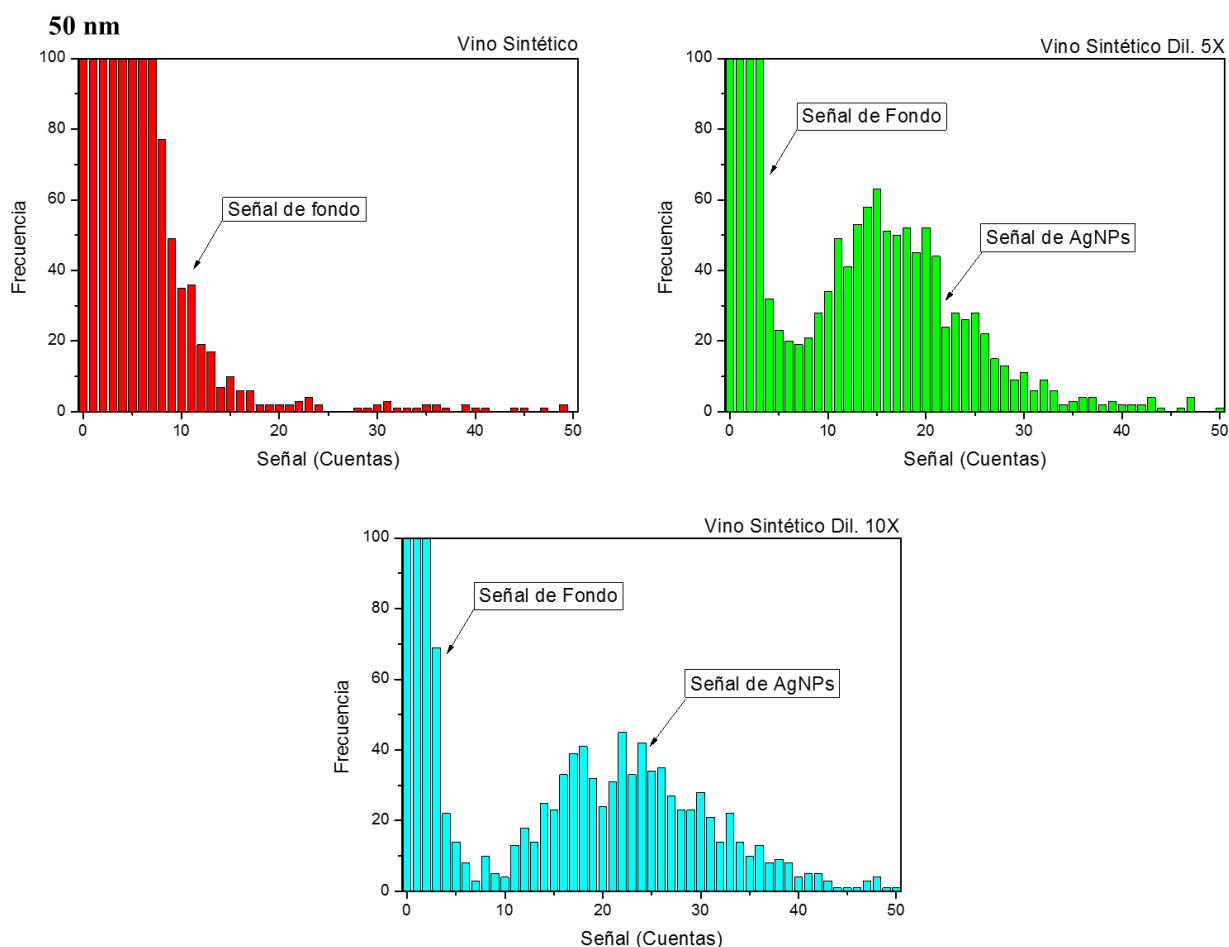
Las AgNPs fueron caracterizadas teniéndose en consideración en las respectivas matrices de vino, es decir, se hicieron las calibraciones iónicas añadiendo Ag en cada tipo de matriz. Además, también se tuvo en cuenta el contenido alcohólico de cada dilución de vino para la determinación de la eficacia de transporte.

En primer lugar, se desarrolló el método con las muestras de vino sintético. Todas las NPs fueron caracterizadas con el uso del nebulizador convencional. Las distribuciones de la intensidad de la señal de NPs fueron obtenidas de acuerdo con su frecuencia absoluta y sus valores de diámetro y de recuperación de partículas, los cuales están representados en las tablas que se presentan a continuación.

- AgNPs 50 nm

Existe la suposición básica detrás de las medidas con SP-ICP-MS de que cada pulso registrado representa una señal individual de NP. El conjunto de pulsos que corresponden a las NPs se separa de los pulsos de pequeña intensidad de la señal del fondo, haciendo posible la separación de ambas las distribuciones y, consecuentemente, la caracterización de las NPs. En la Figura 6, se puede observar las distribuciones para AgNPs de 50 nm en vinos sintéticos y sus respectivas diluciones.

Figura 6: Representación de las distribuciones de AgNPs 50 nm en vinos sintético y sus respectivas diluciones.



De acuerdo con la figura 6, no es posible detectar señales de NPs en la matriz de vino sintético. Esto ocurre debido a la menor sensibilidad obtenida en esta matriz, que imposibilita la distinción entre las distribuciones de fondo y de NP. Sin embargo, en los vinos sintéticos diluidos, debido a la mayor sensibilidad, ya es posible observar las distribuciones de señal correspondientes a las NPs. Es un claro ejemplo, de que este método al diluir la muestra es capaz de detectar las NPs más pequeñas, ya que aporta más sensibilidad.

Es un caso paradójico, ya que es preciso recordar que la señal de las NPs no disminuye en absoluto al diluir: la dilución sólo afecta al número de NPs por segundo que se detectan, pero no a su señal, que sólo depende, en teoría del número de átomos que tenga y, por tanto, de su tamaño. De hecho, en este caso la señal de NPs aumenta al existir

menor supresión por parte de la matriz. Los valores de diámetro y de recuperación de número de partículas para AgNPs 50 nm están representados en la Tabla 6.

Tabla 6: Caracterización de AgNPs de 50 nm con el nebulizador convencional en distintas matrices de vinos sintéticos.

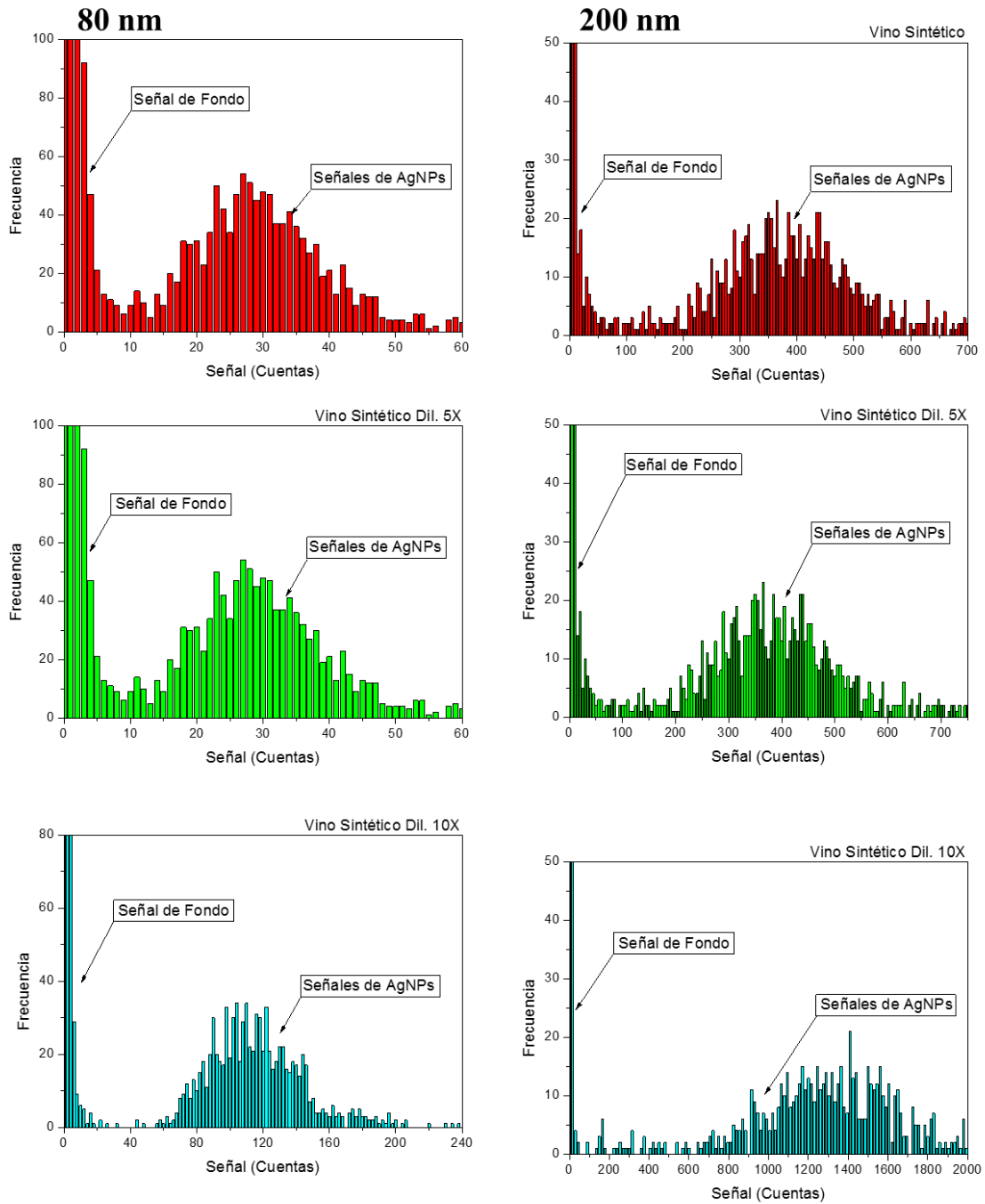
	50 (51 ± 6) nm	
Matriz	Diámetro (nm)	Recuperación de número partículas (%)
Vino sintético	-	-
Vino sintético diluido 5X	41,67 ± 0,35	96,78 ± 3,50
Vino sintético diluido 10X	41,33 ± 0,51	86,67 ± 3,61

Los vinos sintéticos diluidos, tienen un diámetro muy similar pero algo menor del esperado, diferenciándose en la recuperación de partículas, siendo un 10 % más elevada la recuperación de partículas en el vino menos diluido. No obstante, ambas muestras se encuentran dentro de los valores que se suelen considerar adecuados de recuperación (80 - 120 %).

Para las AgNPs de 80 y 200 nm, es posible diferenciar completamente las distribuciones de las AgNPs y de fondo, posibilitando la caracterización de las NPs directamente en vinos sin diluir (véase la Figura 7).

- AgNPs 80 y 200 nm

Figura 7: Representación de las distribuciones de AgNPs 80 y 200 nm en vinos sintéticos y sus respectivas diluciones.



En general, se obtuvieron valores de recuperación en número de NPs muy satisfactorios (93,40 - 102,43 %), con valores de diámetro ligeramente menores que los valores esperados (véase la Tabla 7). Se observa que, aunque los valores del diámetro no sean exactamente lo esperado, para el vino sintético sin diluir se obtienen resultados más

próximos al valor de referencia. También se estudiaron las NPs del NIST de 75 nm (véase la Tabla 8), y las conclusiones obtenidas son muy similares.

Tabla 7: Caracterización de AgNPs de 80 y 200 nm con el nebulizador convencional en distintas matrices de vinos sintéticos.

Matriz	80 (79 ± 7) nm		200 (202 ± 30) nm	
	Diámetro (nm)	Recuperación de número de partículas (%)	Diámetro (nm)	Recuperación de número de partículas (%)
Vino sintético	72,63 ± 1,33	102,40 ± 5,20	166,57 ± 3,80	102,43 ± 3,31
Vino sintético diluido 5X	70,67 ± 0,31	101,43 ± 3,29	156,80 ± 0,78	97,34 ± 1,12
Vino sintético diluido 10X	69,10 ± 0,30	98,57 ± 3,38	157,33 ± 1,33	93,40 ± 6,78

Tabla 8: Caracterización de AgNPs de NIST 75 nm con el nebulizador convencional en distintas matrices de vinos sintéticos.

Matriz	NIST 75 (74,6 ± 4) nm	
	Diámetro (nm)	Recuperación de número de partículas (%)
Vino sintético	67,30 ± 0,61	95,65 ± 2,46
Vino sintético diluido 5X	66,50 ± 0,78	99,14 ± 0,64
Vino sintético diluido 10X	64,20 ± 0,10	102,00 ± 1,18

En resumen, de acuerdo con los datos obtenidos se puede observar que las interferencias de matriz no se eliminan del todo al diluir las muestras de vino, pero hay una mejora y son parcialmente mitigadas, ya que el aumento de la sensibilidad que permitió se puede observar las NPs de 50 nm solo en las muestras diluidas.

Respecto a la Tabla 6, 7 y 8, la incertidumbre en los valores calculados de tamaño de partícula y porcentaje de recuperación se expresan como la desviación estándar de 3 réplicas.

6.4 Aplicación del método para muestras de vinos reales.

A continuación, se aplicó el método para vinos reales sin dilución, evitando por tanto cualquier tratamiento de muestra. Como se ha comentado anteriormente, al no aplicar diluciones a las muestras de vino real, no se han podido observar las NPs de 50 nm. Las siguientes NPs que medimos se pueden observar en la Tabla 9.

Tabla 9: Caracterización de AgNPs 80 nm con el nebulizador convencional en distintas matrices de vinos reales.

Matriz	80 (79 ± 7) nm		200 (202 ± 30) nm	
	Diámetro (nm)	Recuperación de número de partículas (%)	Diámetro (nm)	Recuperación de número de partículas (%)
Vino tinto	76,77 ± 0,15	91,67 ± 2,80	179,40 ± 0,46	106,48 ± 2,95
Vino blanco	72,20 ± 0,26	103,51 ± 2,11	130,20 ± 0,82	101,62 ± 5,15
Vino rosado	69,13 ± 0,75	109,54 ± 2,85	166,43 ± 0,55	109,49 ± 1,71

Tabla 10: Caracterización de AgNPs NIST 75 nm con el nebulizador convencional en distintas matrices de vinos reales.

Matriz	NIST 75 (74,6 ± 4) nm	
	Diámetro (nm)	Recuperación de número de partículas (%)
Vino tinto	66,10 ± 0,26	87,72 ± 1,94
Vino blanco	67,67 ± 0,25	114,20 ± 1,66
Vino rosado	62,83 ± 0,40	125,41 ± 3,61

De acuerdo con las dos anteriores tablas, se observa que la recuperación del número de NPs es siempre adecuada. Los diámetros siempre tienden a ser algo más bajos que los esperados. Este hecho se podría explicar por una oxidación parcial de las NPs en el vino, de manera que el número de NPs se mantiene pero el número de átomos de cada una sea menor, o bien porque, a pesar del esfuerzo realizado para calibrar con una matriz similar a la real, esto no es posible al 100% y los efectos de matriz persisten en cierta medida.

Respecto a la Tabla 9 y 10, la incertidumbre en los valores calculados de tamaño de partícula y porcentaje de recuperación se expresan como la desviación estándar de 3 réplicas.

7. Conclusiones.

Se ha desarrollado un método prometedor para caracterizar AgNPs en vinos. Hasta el momento, se ha comprobado que existen interferencias de matriz en el vino debido a su contenido alcohólico y proteico. Incluso diluyendo la muestra de vino, estas interferencias no se consiguen mitigar completamente, lo cual afecta sobre todo al tamaño estimado de las NPs, que es algo menor al esperado (10 - 20 %), aunque la estimación de la concentración de nanopartículas si es correcta.

Comparando el vino sintético con etanol se pudo comprobar que la eficacia de transporte es mayor cuanto más alto sea el contenido de etanol de la muestra. En relación a la sensibilidad, se comprueba que esta es mayor conforme la dilución aumenta, ya que disminuye el efecto de la matriz.

A la hora de la elección del nebulizador, se corroboró que el nebulizador convencional proporciona valores de diámetro de las NPs más próximos al valor esperado, así como, valores más satisfactorios de recuperación del número de nanopartículas. Por lo tanto, el empleo de micro nebulizadores no es deseable a no ser que el volumen disponible sea muy pequeño, si bien es cierto que su empleo podría mejorar realizando una mayor optimización específica.

Una vez que se eligió el nebulizador convencional, el método se aplicó a las muestras de vino y se observó que sin diluir no se pueden observar las NPs de tamaños de 50 nm o inferiores. Sin embargo, en tamaños de 75, 80 y 200 nm si se pueden observar con un tamaño de diámetro próximo al real, aunque como se ha comentado sea un 10 - 20 % menor del esperado, junto con una buena recuperación del número de partículas.

Por lo que podemos concluir que esta técnica es adecuada para caracterizar NPs de tamaños de 75 nm o superiores y en muestras de vino sin necesidad de realizar ningún tratamiento de muestra, si bien para obtener la mejor exactitud en cuanto al tamaño de partícula es preciso seguir investigando estrategias alternativas de calibrado y/o factores de dilución superiores.

8. Conclusions.

A promising method has been developed to characterize AgNPs in wines. So far, it has been proven that there are matrix interferences in wine due to its alcoholic and protein content. Even when diluting the wine sample ten times, these interferences are not completely mitigated, which mainly affects the estimated size of the NPs that is somewhat lower than expected (10 - 20 %), although the estimate of the nanoparticle concentration is correct.

Comparing the synthetic wine with ethanol it was found that the higher the ethanol transport, the higher the transport efficiency. This can be explained since matrix effects diminish as dilution increases.

At the time of choosing the nebulizer, it was corroborated that the conventional nebulizer provides diameter values of the NPs closer to the expected value, as well as more satisfactory values of recovery of the number of nanoparticles. Therefore, the use of micro nebulizers is not desirable unless the available volume is very small, although it is true that its use could be improved by carrying out a greater specific optimization.

Once the conventional nebulizer was chosen, the method was applied to real wine samples and it was observed that, without dilution, NPs with sizes of 50 nm or less cannot be observed. However, in sizes of 75, 80 and 200 nm, they can be observed and characterized, with a diameter size close to the expected value (although 10 - 20 % lower) and a good recovery in terms of the number of nanoparticles.

So we can conclude that this technique is adequate to characterize NPs of 75 nm diameter size or more in wine samples without the need for sample treatment, although to obtain the best accuracy in terms of particle size it is necessary to continue investigating alternative calibration strategies and / or higher dilution factors.

9. Valoración personal.

A pesar de las muchas horas invertidas, de los análisis erróneos y de la dificultad de enfrentarte a un proyecto en el que tú eres la principal responsable, el TFG, en la última etapa del Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, es un proyecto que me ha supuesto un desarrollo en la autonomía a la hora de realizar un trabajo experimental, un aprendizaje de aspectos nuevos que no se habían enseñado en el Grado y sobretodo, una aplicación práctica de los conocimientos adquiridos a lo largo de estos años.

En primer lugar, he aprendido a desarrollar un trabajo de laboratorio con metodología científica, a realizar una búsqueda de información precisa de artículos científicos con fuentes fiables y a redactar informes. También, a utilizar el modo de trabajo SP-ICP-MS, a analizar y a representar gráficamente los resultados obtenidos y a saber elaborar las diferentes conclusiones.

Así pues, el desarrollo de este trabajo me ha permitido conocer de una manera más profunda la Química Analítica, ya que este TFG se ha orientado hacia esa rama, pero aplicada a los alimentos. Esta asignatura la había cursado en primero de carrera, por lo que he recordado esos conocimientos y además, los he ampliado. También, he aprendido a gestionar mejor el tiempo y saber adaptarme a los problemas que se pueden ir generando a lo largo del experimento.

Y por último, me ha permitido dar una visión global de como en un futuro puedo llegar a desarrollar diferentes trabajos experimentales sabiendo previamente como enfocarlos, desarrollarlos, y afrontarlos.

10. Bibliografía.

Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Gobierno de España (2017). La vid, el vino y el CSIC. Disponible en: <http://www.csic.es/el-vino> [Consultado 22-05-2018].

Alonso, P. M. (2014). *Acenología*. Disponible en: http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/cultura_patrimonio_vino_cienc0214.htm [Consultado: 18-05-2018].

Base De Datos Española de Composición de Alimentos (BEDCA). Spanish Food Composition Database. Disponible en: <http://www.bedca.net/bdpub/index.php> [Consultado 19-05-2018].

ELIKA (2012). ¿Qué son los sulfitos? Disponible en: http://ciudadania.elika.eus/alergia_alimentaria_sulfitos.asp [Consultado: 28-05-2017].

Escobar, V. (2015). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopía de infrarrojos (FT-IR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM)*. Tesis doctoral. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/9933/TESIS%20-%20VANESSA%20ESCOBAR%20FALCON%20C3%8D.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [Consultado 02-09-2018].

España. Ley 24/2003 de 10 de julio, de la Viña y del Vino. Boletín Oficial del Estado, 11 de julio de 2003 (165), 27165-27179.

García, A. (2012). *Efecto de los polifenoles sobre el crecimiento y metabolismos de bacterias lácticas del vino. Potencial uso como alternativa al empleo de los sulfitos durante la vinificación*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Disponible en: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/11359/56599_garcia_ruiz_almudena.pdf?sequence=1 [Consultado 14-09-2018].

Izquierdo, M. P. (2010). *Elaboración de vinos blancos y tintos con plata coloidal como alternativa al uso de SO₂ en enología*. Disponible en: <http://pagina.jccm.es/ivicam/investigacion/finalizados/plata2010.pdf> [Consultado: 11-05-2018].

Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología (2013). LAAE. Disponible en: <http://laae.unizar.es/> [Consultado 9-08-2018].

Laborda, F. Bolea, E. y Jiménez-Lamana, J. (2013). "Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful for Nanoanalysis". *Analytical chemistry*, 86, pp. 2270-2278.

López, R. Garde-Cerdán, T. Santamaría, P. Gutiérrez, A.R. Garijo, P. González-Arenzana, L. López-Alfaro I. (2013). "Elaboración de vinos tintos más saludables". *Zubía*, 25, pp. 47-60. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4681008.pdf> [Consultado 03-09-2018].

Millán, G. (2012). "Las denominaciones de origen y las rutas del vino en España: un estudio de caso". *Revista de Ocio y Turismo*, 5, pp. 41-46. Disponible en: <http://revistas.udc.es/index.php/rotur/article/view/1260/337> [Consultado 16-05-2018].

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2017). Informe del consumo de alimentación en España 2016. Madrid: MAPAMA. Disponible en: [https://www.mapama.gob.es/images/es/informe del consumo de alimentos en espana_2016_web_tcm30-419484.pdf](https://www.mapama.gob.es/images/es/informe_del_consumo_de_alimentos_en_espana_2016_web_tcm30-419484.pdf) [Consultado 17-05-2018].

Nart, E. Andorrà, I. Puxeu, M. Martín, L. Hidalgo, C. Ferrer-Gallego, R. (2017). *Evaluación de alternativas para la elaboración de vinos de alta calidad libres de sulfuroso*. Disponible en: http://vitec.wine/wp-content/uploads/2017/10/Semana-Vtivin%C3%ADcola_Art%C3%ADculo-Sulfuroso-VITEC.pdf [Consultado: 10-05-2018].

Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) (2017). Bases de datos y estadísticas. Disponible en: <http://www.oiv.int/es/bases-de-datos-y-estadisticas/estadisticas> [Consultado 19-05-2018].

Pace, E. H. Rogers, J. N. Jarolimek, C. Coleman A. V. Gray, P. E. Higgins, P. C. Ranville, F. J. (2012). *Single Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: A Performance Evaluation and Method Comparison in the Determination of Nanoparticle Size*. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es301787d> [Consultado: 09-05-2018].

Skoog, D. A., Holler, F. J., Niemann T. A. (2001). *Principios de análisis instrumental*. Madrid: McGraw-Hill.

Unión Europea. Reglamento (CE) nº 606/2009 de la Comisión, de 10 de julio de 2009 , que fija determinadas disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 479/2008 del Consejo en lo relativo a las categorías de productos vitícolas, las prácticas enológicas y las restricciones aplicables. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 24 de julio de 2009 (193), 26.

Universidad Politécnica de Cartagena (2017). Práctica ICP-MS. Disponible en: www.upct.es/~minaees/practica_icpms.doc [Consultado 05-09-2018].