



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Química Física y Analítica

Programa de Doctorado de Análisis Químico Bioquímico y Estructural
y Modelización Computacional

**Potencial tecnológico de los puntos cuánticos de
carbono antioxidantes: el impulso hacia
metodologías verdes y nanotecnología sostenible.**

Tesis Doctoral

Clarissa Murru

Oviedo, 2021



UNIVERSITY OF OVIEDO

Department of Physical and Analytical Chemistry

Ph.D. Program: Chemical, Biochemical and Structural Analysis
and Computational Modelling

**Technological prospects of antioxidant carbon
quantum dots: the push for green methods and
sustainable nanotechnology.**

Ph.D. Thesis

Clarissa Murru

Oviedo, 2021



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma Potencial tecnológico de los puntos cuánticos de carbono antioxidantes: el impulso hacia metodologías verdes y nanotecnología sostenible:	Inglés: Technological prospects of antioxidant carbon quantum dots: the push for green methods and sustainable nanotechnology
2.- Autor	
Nombre: Clarissa Murru	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: PROGRAMA EN ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL Y MODELIZACIÓN COMPUTACIONAL	
Órgano responsable: Centro Internacional de Posgrado de la Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

Debido a la creciente concienciación social sobre el uso de materiales no biocompatibles y la dificultad en su reciclaje, el mundo científico e industrial se ha lanzado recientemente a la búsqueda de nuevas soluciones respetuosas con el medio ambiente. La importancia de un modelo socioeconómico basado en los principios de la economía circular que pueda ser aplicado a los procesos productivos industriales y la importancia de la contribución de la química verde se están consolidando cada vez más como una gran necesidad.

La biomasa, que a menudo se utiliza como fuente de energía, es rica también en compuestos de alto valor añadido que pueden ser de gran interés en distintos procesos y que la convierten en una posible alternativa a las materias primas tradicionalmente empleadas.

La fabricación de nanocompuestos obtenidos a partir de residuos orgánicos está *integrada dentro de la llamada "nanotecnología verde"*, un área de la nanotecnología que implica la adaptación de los conceptos de química verde para la producción y la manipulación sostenible y segura de nanomateriales. El diseño de nanocompuestos siguiendo los principios de la nanotecnología verde implica el empleo de procesos no peligrosos, con bajo impacto ambiental y que elimine o limite la producción de productos secundarios no deseados. Los puntos cuánticos de carbono (CDs) obtenidos a partir de biomasa vegetal son un claro ejemplo de materiales que siguen las pautas de la nanotecnología verde. Estas nanopartículas, constituidas mayoritariamente por átomos de carbono, son conocidas por sus excelentes propiedades ópticas y han sido empleadas ampliamente como elementos de transducción en sensores, transportadores de fármacos, marcas luminiscentes y como agentes en la producción de bioimágenes. Últimamente están ganando interés gracias a sus propiedades inhibitorias de especies radicalarias de oxígeno.

En la presente Tesis Doctoral se han sintetizado, empleando *metodologías verdes*, nanopartículas obtenidas de biomasa vegetal, los CDs. Como materia prima se han empleado no sólo subproductos industriales, como son el bagazo de uva procedente de la producción de vinos con DOP y de manzanas empleadas para la producción de sidra, sino también desechos domiciliarios como los residuos de hojas de té y romero. El objetivo final de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar la aplicabilidad de los CDs sintetizados, haciendo hincapié en sus propiedades antioxidantes, para la fabricación de



materiales activos innovadores que puedan ser utilizados en la industria alimentaria, en el de la lubricación y/o la cosmética.

En el **primer capítulo**, como un primer paso al empleo de bagazo para una *nanotecnología sostenible*, se abordó el estudio de la clasificación varietal de uvas y su grado de madurez que se emplean en la fabricación de vinos con DOP de Cangas, empleando un método de procesado de datos. Este estudio es importante no sólo en el control y calidad del vino obtenido, sino que aporta también información sobre la composición del bagazo resultante. El uso de Redes Neuronales Artificiales (RNA) acopladas con ATR/FTIR ha permitido, a partir de la información contenida en los espectros de infrarrojo de muestras de piel de uvas y de hojas, identificar diferentes clases de uvas y el grado de madurez, observándose que la pectina y la fructosa son los compuestos más importantes a la hora de la clasificación varietal, mientras que los polifenoles y azúcares presentan mayor peso a la hora de establecer el grado de madurez.

En el **segundo capítulo**, se ha llevado a cabo la síntesis y la caracterización de CDs sintetizados a partir de bagazo de uva, desechos de hebras de té y glutatión/ácido cítrico (como material comparativo). Se estudiaron las propiedades antioxidantes de los CDs tanto en medios acuosos como oleosos, donde las nanopartículas exhibieron una buena dispersabilidad. Los resultados demostraron que los CDs de los desechos del té presentan mejores propiedades antioxidantes en medios oleosos en comparación con los CDs de bagazo de uva y que pueden ser materiales competitivos con antioxidantes convencionales como, por ejemplo, el ácido ascórbico y la vitamina E. Se ha demostrado su uso como antioxidantes en aceites base donde también se sabe que actúan como nanolubricantes. Estos resultados, junto con las particulares propiedades ópticas de los CDs, así como su elevado coeficiente de absorción, excelente fotoestabilidad, biocompatibilidad y bajo impacto medio ambiental, pueden abrir un camino para diseñar nuevos CDs luminiscentes con propiedades antioxidantes mejoradas, no solo para su empleo en el campo de los alimentos sino también para aplicaciones biomédicas, químicas e industriales.

En el **tercer capítulo** se describe la fabricación de bio-películas a partir de caseinato de sodio (CAS) y pectina altamente metoxilada (HMP), utilizando glicerol como plastificante, enriquecidas con CDs obtenidos a partir de romero y magaya de manzana. El estudio detallado de las propiedades reológicas de las suspensiones de caseinato y pectina demostró que poseen un comportamiento newtoniano, con valores para el índice de fluidez (n) que se correlacionan con las concentraciones de CDs presente. Por otra parte, todas las bio-películas obtenidas presentaron una naturaleza altamente hidrofílica y, particularmente aquellas enriquecidas con CDs, demostraron una mayor estabilidad térmica y mecánica (en condiciones de humedad relativa $\leq 50\%$ y temperaturas $\leq 25^\circ\text{C}$), características que condicionarán las posibles futuras aplicaciones de las películas.

El **cuarto capítulo** profundiza en el estudio de las propiedades de las bio-películas enriquecidas con CDs y sus potenciales aplicaciones. Los estudios espectroscópicos demostraron que las películas poseen un alto coeficiente de absorción molar y un bajo rendimiento cuántico de luminiscencia en contraposición con las características propias de los CDs. En cuanto a sus propiedades antioxidantes, los CDs sintetizados a partir del romero presentaron mayor actividad que los CDs obtenidos a partir de magaya como inhibidores del radical DPPH, propiedad que se mantiene en las bio-películas donde se potencia la actividad antioxidante inherente de la pectina y de la caseína. Finalmente, se evaluó el comportamiento de las bio-películas sobre el estrés oxidativo de muestras de aceites comestibles y cosméticos, donde se pudo observar que las biopelículas podían disminuir la formación de especies radicales y, por tanto, aumentar



la vida útil de los aceites. Este trabajo pretende ser un primer paso en el estudio de CDs con alta capacidad antioxidante, en particular para la preparación de biomateriales funcionalizados activos de contención, protección y/o mantenimiento con aplicaciones en la industria alimentaria.

Finalmente se exponen de manera resumida y global las conclusiones, otros trabajos llevados a cabo durante la realización de la Tesis y se proponen líneas de investigación derivadas de este estudio.

RESUMEN (en Inglés)

Due to the raising awareness about the use of non-biocompatible materials and the problems posed by their recycling, have pushed scientists and industries to look for new eco-friendly solutions. The key role of a socioeconomic model based on the principles of the Circular Economy, that can be applied to industrial production processes, is becoming a consolidated need, including the leading contribution of Green Chemistry.

The use of residual biomass from different origins is a fundamental principle on which the circular economy is based. Biomass, which is often used to produce new sources of energy and materials, may be also rich in different high value-added chemicals that make it a potential precursor for the fabrication of carbon-based nanomaterials.

Nanomaterials synthesis from organic wastes is an interesting branch of green nanotechnology which includes the use of green chemistry concepts and the materials obtained through them have to be non-hazardous, of low environmental impact and avoiding the production of unwanted secondary compounds.

Carbon dots (CDs) obtained from plant biomass are a clear example of materials that follow the basics of green nanotechnology. CDs, well-known for their excellent optical properties, have been widely used as sensors, drug delivery systems, and as bioimaging agents. Over the last years, CDs are attracting much interest due to their scavenging activity against radical oxygen species.

The present Doctoral Thesis aims to develop and characterize CDs from organic biomass: industrial grape bagasse (from DPO wine production) and apple bagasse (from cider production) as well as from domestic tea and rosemary residues. The final goals of this Thesis were to evaluate the real sample applicability of the synthesised CDs, highlighting their antioxidant properties as raw materials and as additives in the development of new active materials for further use in the food industry, cosmetics and/or in the lubrication field.

The **first chapter** addressed a processing system for identifying grape varieties and ripeness of grapes used in the production of PDO wine, characteristics that are key not only for the PDO control and quality but also to estimate the composition of the grape bagasse. The use of Artificial Neural Networks (ANN) coupled with ATR/FTIR provided important information contained in the infrared spectra of skin grapes thus allowing to identify the different varieties of grapes and their ripeness. Pectin and polysaccharides resulted to be significant in variety and ripeness identification, while polyphenols and fructose provided useful information for ripeness degree classification of grapes.

In the **second chapter**, the synthesis and characterization of CDs synthesized from grape bagasse, tea waste leaves and glutathione/citric acid are described. The antioxidant properties of CDs were studied in both aqueous and oily media: the results showed that the CDs from tea waste had good antioxidant properties in oily media as



compared to the CDs from grape bagasse. These results, together with the excellent CDs photostability and environmental friendliness may open a way to design new luminescent CDs with improved antioxidant properties for biomedical, chemical and industrial applications.

The **third chapter** deals with the fabrication of biofilms from sodium caseinate (CAS) and highly methoxylated pectin (HMP) enriched with CDs obtained from rosemary and apple pomace and using glycerol as the plasticizer. The rheological properties of the CAS/HMP suspensions were demonstrated to have a Newtonian behaviour, with values of the order flow (n) less than one (smaller values in samples with high concentrations of CDs). Besides, it was observed that the CAS/HMP films were highly hydrophilic in nature and were stable at temperatures up to 45°C and at a 10% relative humidity. These characteristics must be considered when considering possible applications of these films.

The **fourth chapter** delves into the study of CDs properties and those of CAS/HMP enriched films. The CDs synthesized from rosemary leaves had high antioxidant properties and the CAS/HMP enriched films exhibited an enhanced antioxidant activity against the DPPH radical, thus improving the inherent antioxidant properties of casein and pectin. The film demonstrated to slow down the oxidative degradation of edible and cosmetic oils. This work is a step forward for the development of active materials and films with antioxidant properties for applications in the food industry.

In a final Sections, Conclusions and Other Works carried out during the development of this Thesis were included.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN Oviedo, 16 de junio 2021

Resumen

Potencial tecnológico de los puntos cuánticos de carbono antioxidantes: el impulso hacia metodologías verdes y nanotecnología sostenible

Debido a la creciente concienciación social sobre el uso de materiales no biocompatibles y la dificultad en su reciclaje, el mundo científico e industrial se ha lanzado recientemente a la búsqueda de nuevas soluciones respetuosas con el medio ambiente. La importancia de un modelo socioeconómico basado en los principios de la economía circular que pueda ser aplicado a los procesos productivos industriales y la importancia de la contribución de la química verde se están consolidando cada vez más como una gran necesidad.

La biomasa, que a menudo se utiliza como fuente de energía, es rica también en compuestos de alto valor añadido que pueden ser de gran interés en distintos procesos y que la convierten en una posible alternativa a las materias primas tradicionalmente empleadas.

La fabricación de nanocompuestos obtenidos a partir de residuos orgánicos está integrada dentro de la llamada “nanotecnología verde”, un área de la nanotecnología que implica la adaptación de los conceptos de química verde para la producción y la manipulación sostenible y segura de nanomateriales. El diseño de nanocompuestos siguiendo los principios de la nanotecnología verde implica el empleo de procesos no peligrosos, con bajo impacto ambiental y que elimine o limite la producción de productos secundarios no deseados.

Los puntos cuánticos de carbono (CDs) obtenidos a partir de biomasa vegetal son un claro ejemplo de materiales que siguen las pautas de la nanotecnología verde. Estas nanopartículas, constituidas mayoritariamente por átomos de carbono, son conocidas por sus excelentes propiedades ópticas y han sido empleadas ampliamente como elementos de transducción en sensores, transportadores de fármacos, marcas luminiscentes y como agentes en la producción de bioimágenes. Últimamente están ganando interés gracias a sus propiedades inhibitorias de especies radicalarias de oxígeno.

En la presente Tesis Doctoral se han sintetizado, empleando metodologías verdes, nanopartículas obtenidas de biomasa vegetal, los CDs. Como materia prima se han empleado no sólo subproductos industriales, como son el bagazo de uva procedente de la producción de vinos con DOP y de manzanas empleadas para la producción de sidra, sino también desechos domiciliarios como los residuos de hojas de té y romero. El objetivo final de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar la aplicabilidad de los CDs sintetizados, haciendo hincapié en sus propiedades antioxidantes, para la fabricación de materiales activos innovadores que puedan ser utilizados en la industria alimentaria, en el de la lubricación y/o la cosmética.

En el *primer capítulo*, como un primer paso al empleo de bagazo para una nanotecnología sostenible, se abordó el estudio de la clasificación varietal de uvas y su grado de madurez que se emplean en la fabricación de vinos con DOP de Cangas, empleando un método de procesado de datos. Este estudio es importante no sólo en el control y calidad del vino obtenido, sino que aporta también información sobre la composición del bagazo resultante. El uso de Redes Neuronales Artificiales (RNA) acopladas con ATR/FTIR ha permitido, a partir de la información contenida en los espectros de infrarrojo de muestras de piel de uvas y de hojas, identificar diferentes clases de uvas y el grado de madurez, observándose que la pectina y la fructosa son los compuestos más

importantes a la hora de la clasificación varietal, mientras que los polifenoles y azúcares presentan mayor peso a la hora de establecer el grado de madurez.

En el *segundo capítulo*, se ha llevado a cabo la síntesis y la caracterización de CDs sintetizados a partir de bagazo de uva, desechos de hebras de té y glutatión/ácido cítrico (como material comparativo). Se estudiaron las propiedades antioxidantes de los CDs tanto en medios acuosos como oleosos, donde las nanopartículas exhibieron una buena dispersabilidad. Los resultados demostraron que los CDs de los desechos del té presentan mejores propiedades antioxidantes en medios oleosos en comparación con los CDs de bagazo de uva y que pueden ser materiales competitivos con antioxidantes convencionales como, por ejemplo, el ácido ascórbico y la vitamina E. Se ha demostrado su uso como antioxidantes en aceites base donde también se sabe que actúan como nanolubricantes. Estos resultados, junto con las particulares propiedades ópticas de los CDs, así como su elevado coeficiente de absortividad, excelente fotoestabilidad, biocompatibilidad y bajo impacto medio ambiental, pueden abrir un camino para diseñar nuevos CDs luminiscentes con propiedades antioxidantes mejoradas, no solo para su empleo en el campo de los alimentos sino también para aplicaciones biomédicas, químicas e industriales.

En el *tercer capítulo* se describe la fabricación de bio-películas a partir de caseinato de sodio (CAS) y pectina altamente metoxilada (HMP), utilizando glicerol como plastificante, enriquecidas con CDs obtenidos a partir de romero y magaya de manzana. El estudio detallado de las propiedades reológicas de las suspensiones de caseinato y pectina demostró que poseen un comportamiento newtoniano, con valores para el índice de fluidez (n) que se correlacionan con las concentraciones de CDs presente. Por otra parte, todas las bio-películas obtenidas presentaron una naturaleza altamente hidrofílica y, particularmente aquellas enriquecidas con CDs, demostraron una mayor

estabilidad térmica y mecánica (en condiciones de humedad relativa $\leq 50\%$ y temperaturas $\leq 25^{\circ}\text{C}$), características que condicionarán las posibles futuras aplicaciones de las películas.

El *cuarto capítulo* profundiza en el estudio de las propiedades de las bio-películas enriquecidas con CDs y sus potenciales aplicaciones. Los estudios espectroscópicos demostraron que las películas poseen un alto coeficiente de absorptividad molar y un bajo rendimiento cuántico de luminiscencia en contraposición con las características propias de los CDs. En cuanto a sus propiedades antioxidantes, los CDs sintetizados a partir del romero presentaron mayor actividad que los CDs obtenidos a partir de magaya como inhibidores del radical DPPH, propiedad que se mantiene en las bio-películas donde se potencia la actividad antioxidante inherente de la pectina y de la caseína. Finalmente, se evaluó el comportamiento de las bio-películas sobre el estrés oxidativo de muestras de aceites comestibles y cosméticos, donde se pudo observar que las biopelículas podían disminuir la formación de especies radicales y, por tanto, aumentar la vida útil de los aceites. Este trabajo pretende ser un primer paso en el estudio de CDs con alta capacidad antioxidante, en particular para la preparación de biomateriales funcionalizados activos de contención, protección y/o mantenimiento con aplicaciones en la industria alimentaria.

Finalmente se exponen de manera resumida y global las conclusiones, otros trabajos llevados a cabo durante la realización de la Tesis y se proponen líneas de investigación derivadas de este estudio.

Summary

Technological prospects of antioxidant carbon quantum dots: the push for green methods and sustainable nanotechnology.

Due to the raising awareness about the use of non-biocompatible materials and the problems posed by their recycling, have pushed scientists and industries to look for new eco-friendly solutions. The key role of a socioeconomic model based on the principles of the Circular Economy, that can be applied to industrial production processes, is becoming a consolidated need, including the leading contribution of Green Chemistry.

The use of residual biomass from different origins is a fundamental principle on which the circular economy is based. Biomass, which is often used to produce new sources of energy and materials, may be also rich in different high value-added chemicals that make it a potential precursor for the fabrication of carbon-based nanomaterials.

Nanomaterials synthesis from organic wastes is an interesting branch of green nanotechnology which includes the use of green chemistry concepts and the materials obtained through them have to be non-hazardous, of low environmental impact and avoiding the production of unwanted secondary compounds.

Carbon dots (CDs) obtained from plant biomass are a clear example of materials that follow the basics of green nanotechnology. CDs, well-known for their excellent optical properties, have been widely used as sensors, drug

delivery systems, and as bioimaging agents. Over the last years, CDs are attracting much interest due to their scavenging activity against radical oxygen species.

The present Doctoral Thesis aims to develop and characterize CDs from organic biomass: industrial grape bagasse (from DPO wine production) and apple bagasse (from cider production) as well as from domestic tea and rosemary residues. The final goals of this Thesis were to evaluate the real sample applicability of the synthesised CDs, highlighting their antioxidant properties as raw materials and as additives in the development of new active materials for further use in the food industry, cosmetics and/or in the lubrication field.

The *first chapter* addressed a processing system for identifying grape varieties and ripeness of grapes used in the production of PDO wine, characteristics that are key not only for the PDO control and quality but also to estimate the composition of the grape bagasse. The use of Artificial Neural Networks (ANN) coupled with ATR/FTIR provided important information contained in the infrared spectra of skin grapes thus allowing to identify the different varieties of grapes and their ripeness. Pectin and polysaccharides resulted to be significant in variety and ripeness identification, while polyphenols and fructose provided useful information for ripeness degree classification of grapes.

In the *second chapter*, the synthesis and characterization of CDs synthesized from grape bagasse, tea waste leaves and glutathione/citric acid are described. The antioxidant properties of CDs were studied in both aqueous and oily media: the results showed that the CDs from tea waste had good antioxidant properties in oily media as compared to the CDs from grape bagasse. These results, together with the excellent CDs photostability and environmental friendliness may open a way to design new luminescent CDs

with improved antioxidant properties for biomedical, chemical and industrial applications.

The *third chapter* deals with the fabrication of biofilms from sodium caseinate (CAS) and highly methoxylated pectin (HMP) enriched with CDs obtained from rosemary and apple pomace and using glycerol as the plasticizer. The rheological properties of the CAS/HMP suspensions were demonstrated to have a Newtonian behaviour, with values of the order flow (n) less than one (smaller values in samples with high concentrations of CDs). Besides, it was observed that the CAS/HMP films were highly hydrophilic in nature and were stable at temperatures up to 45°C and at a 10% relative humidity. These characteristics must be considered when considering possible applications of these films.

The *fourth chapter* delves into the study of CDs properties and those of CAS/HMP enriched films. The CDs synthesized from rosemary leaves had high antioxidant properties and the CAS/HMP enriched films exhibited an enhanced antioxidant activity against the DPPH radical, thus improving the inherent antioxidant properties of casein and pectin. The film demonstrated to slow down the oxidative degradation of edible and cosmetic oils. This work is a step forward for the development of active materials and films with antioxidant properties for applications in the food industry.

In a final Section, Conclusions and Other Works carried out during the development of this Thesis were included.

ÍNDICE

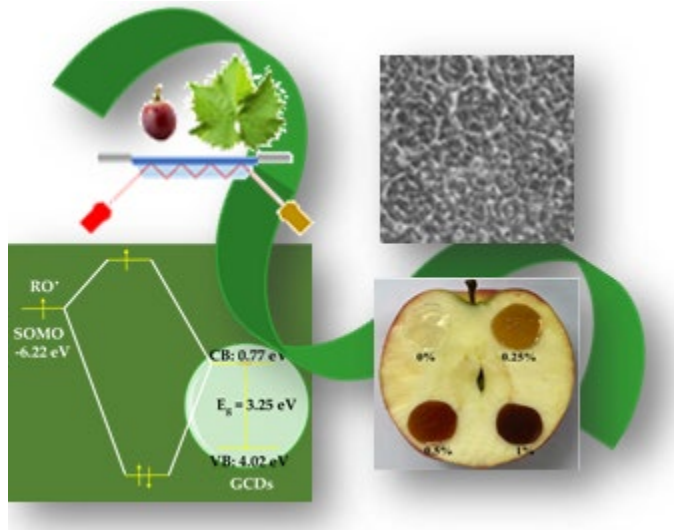
1 INTRODUCCIÓN.....	21
1.1. Utilización de biomasa orgánica en la economía circular	22
1.1.1. Biomasa procedente de residuos industriales y domésticos.	25
1.2. Síntesis de nanopartículas a partir de biomasa vegetal.	29
1.3. Aceites vegetales: procesos de oxidación y medidas para atajarlos.	33
1.3.1. Degradación de los aceites vegetales.	35
1.3.2. Actuaciones para mejorar la estabilidad oxidativa de los aceites vegetales.....	39
1.4. Los CDs antioxidantes como aditivos en la preparación de materiales activos para el envasado.	42
2 BIBLIOGRAFÍA.....	47
1. OBJETIVOS.....	59
CAPÍTULO 1.....	61
1 INTRODUCCIÓN.....	63
1.1. Redes Neuronales Artificiales.....	66
2 PARTE EXPERIMENTAL.....	69
2.1. Plan de muestreo y medida.....	69
2.2. Entrenamiento de las Redes Neuronales Artificiales	72

3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
3.1.	Muestras de hollejo de uvas	74
3.1.1.	Caracterización de las muestras por ATR-FTIR	74
3.1.2.	Entrenamiento y aplicación de RNA.....	77
3.1.3.	Determinación de las variables experimentales con mayor peso en las RNA.....	80
3.1.4.	Matrices de confusión	85
3.2.	Muestras de hojas de vid.	87
3.2.1.	Caracterización de las muestras por ATR-FTIR	88
3.2.2.	Entrenamiento y aplicación de RNA.....	89
4	CONCLUSIONES.....	92
5	BIBLIOGRAFÍA.....	94
	CAPÍTULO 2.....	101
1	INTRODUCCIÓN.....	103
2	PARTE EXPERIMENTAL.....	106
2.1.	Protocolos de síntesis.	106
2.1.1.	Síntesis de CDs a partir de glutatión y ácido cítrico (GCDs).	106
2.1.2.	Síntesis de CDs a partir residuos de hojas de té verde (TCDs).	107
2.1.3.	Síntesis de CDs a partir de bagazo de uva (P1CDs y P2CDs).	107
2.2.	Medida de la capacidad reductora total.....	108
2.2.1.	Método de Folin-Ciocalteu.....	108

2.2.2.	Determinación de la actividad antioxidante (DPPH).	109
2.2.3.	Determinación de índice de peróxidos del aceite lubricante.	109
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	110
3.1.	Caracterización morfológica y estructural de los CDs.	110
3.2.	Caracterización óptica y electrónica de los CDs.	114
3.3.	Propiedades luminiscentes de los CDs.	118
3.4.	Influencia del pH de los estados superficiales en las propiedades luminiscentes de los CDs.	121
3.5.	Estudio espectrofotométrico de la actividad antioxidante de los CDs y mecanismo de desactivación radicalaria.	123
3.6.	Los CDs como nano-aditivos antioxidantes en medio no-acuoso: prueba de concepto.....	128
3.7.	Mecanismo de solubilización de los CDs en aceite lubricante y acción antioxidante en la interfase.	131
4	CONCLUSIONES.....	134
5	BIBLIOGRAFÍA.....	136
CAPÍTULO 3.....		145
1	INTRODUCCIÓN.....	147
2	PARTE EXPERIMENTAL.....	153
2.1.	Protocolos de síntesis.	153
2.1.1.	Preparación de la suspensión caseinato sódico/pectina...	153
2.1.2.	Síntesis de CDs a partir de magaya de manzana y hojas de romero.	153

2.2. Determinación del índice de peróxido en aceites comestibles y cosméticos en presencia de bio-películas CAS/HMP reforzadas con CDs.	190
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	191
3.1. Caracterización óptica de los CDs y de las bio-películas.....	191
3.2. Actividad antioxidante de las bio-películas.....	196
3.3. Estudio del lixiviado en aceites de RCDs ocluidos en películas CAS/HMP+1RCD.....	199
3.4. Influencia de las bio-películas CAS/HMP+CDs en el índice de peróxidos de aceites comestibles y cosméticos.....	201
3.5. Posibles aplicaciones de las bio-películas en muestras de alimentos no grasos.	203
4 CONCLUSIONES.....	205
5 BIBLIOGRAFÍA.....	206
CONCLUSIONES.....	211
CONCLUSIONS	215
Trabajos relacionados con la presente Tesis Doctoral.....	221
Sugerencias para trabajos futuros.....	229
ANEXO I.....	233
ANEXO II.....	259
ANEXO III.....	265
ANEXO IV.....	267
Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral	267

INTRODUCCIÓN



1 INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, retos como el deterioro del planeta por la contaminación, la merma de los recursos naturales y el cambio climático hacen necesario desarrollar tácticas para abordarlos eficazmente. Entre esos compromisos destacan los 17 objetivos de desarrollo sostenible propuestos por la ONU [1], entre los cuales el objetivo 9 “*Construir infraestructuras resilientes, promover la industrialización sostenible y fomentar la innovación*”, está directamente relacionado con la temática general de esta Tesis Doctoral y con nuestro compromiso con la economía circular, en la que se incluyen varios principios de la Química Verde, como son el empleo de materias primas renovables, diseño de productos biodegradables y desarrollo de tecnologías analíticas para la monitorización a tiempo real.

En este escenario, el sector químico se enfrenta al gran desafío de alcanzar procesos de fabricación más ecológicos, a través de un consumo eficiente de materias primas y la eliminación o reducción de residuos. Para alcanzar la sostenibilidad es imprescindible un complejo equilibrio entre la utilización de recursos, el crecimiento económico y el impacto ambiental [2]. La Química Verde, al cubrir una variedad de campos, incluidos la energía, los alimentos, el clima y la población, tiene como objetivo guiar a los químicos e ingenieros para sintetizar compuestos y/o productos a través de reacciones respetuosas con el medio ambiente y altamente eficientes [3]. La economía circular aboga por utilizar la mayor parte de materiales biodegradables posibles en la fabricación de bienes de consumo, para que éstos puedan volver a la naturaleza sin causar daños medioambientales al agotarse su vida útil (Figura1). En los

casos donde no sea posible utilizar materiales respetuosos con el medio ambiente, el objetivo será implementar vías sencillas para darles una nueva vida, reincorporándolos al ciclo de producción y componer un nuevo producto [4].



Figura 1. La economía circular, EC.

1.1. Utilización de biomasa orgánica en la economía circular

Uno de los pilares sobre los que se asienta un sistema de economía circular es el de los bio-productos. Con el fin de encontrar alternativas a los productos derivados del petróleo y demás formas de energía tradicionales, esta opción parece una de las más sostenibles. Una economía circular se basa en que el valor de los recursos se maximice indefinidamente, lo que requiere que prácticamente no se produzcan residuos irrecuperables. Esta es la razón por la cual, en una economía circular, la biomasa juega un papel fundamental en términos de productos materiales y de provisión de energía [5]. Con el término biomasa nos referimos a una materia orgánica que tiene un origen vegetal o

animal, incluyendo sus residuos y desechos orgánicos, y que puede ser aprovechada como recurso energético renovable. La reutilización de los residuos es un concepto que ha ido ganando interés en tiempos relativamente recientes, y aunque la biomasa ha servido como recurso energético desde hace siglos, está entrando en declive por la normalización de la energía fósil. Según la Directiva 2009/28/CE [6] relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables, la biomasa está constituida por: a) la fracción biodegradable de los productos, desechos y residuos de origen biológico procedentes de actividades agrarias (incluidas las sustancias de origen vegetal y de origen animal), de la silvicultura y de las industrias conexas, incluidas la pesca y la acuicultura, y b) por la fracción biológica degradable de los residuos industriales y municipales. Por tanto, los recursos que ofrece la biomasa provienen de fuentes muy diversas y heterogéneas como se observa en la Figura 2.

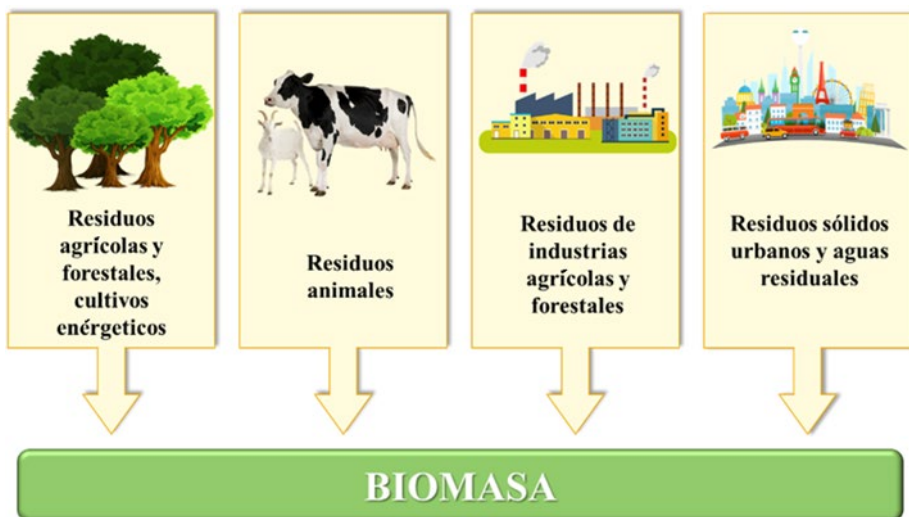


Figura 1. Fuentes diversas de origen de biomasa vegetal.

Debido a las diferencias sustanciales en términos de variedad y cantidad de biomasa, y a sus diferentes características compositivas, no existe una forma unívoca de clasificación de la biomasa, por lo que se pueden agrupar de manera diferente, según su finalidad y objetivo. Según origen, función y productos finales obtenidos, generalmente la biomasa se clasifica de dos formas: basada en tipos de biomasa existente en la naturaleza (según ecología o tipo de vegetación); y basada en el uso y aplicación de la biomasa como materia prima. La primera es la clasificación más utilizada y ordena la biomasa en diferentes grupos: leñosa [7], herbácea [8], acuática [9], desechos humanos y animales [10] y mezcla de biomásas [11]. El origen variado de la biomasa se refleja también en su composición. La Tabla 1 muestra los porcentajes de los diferentes elementos que las componen [12, 13].

Tabla 1. Porcentajes de los principales elementos que componen biomásas procedentes de diversas fuentes.

Biomasa	*C(%)	O(%)	H(%)	N(%)	S(%)
Leñosa	49-57	32-45	5-10	<1-1	<1-1
Herbácea	42-58	34-49	3-9	<1-1	<1-3
Acuática	27-43	34-46	4-6	1-3	1-3
Animal y desechos humanos	57-61	21-25	7-8	1-2	6-12
Mezcla de biomásas	45-71	16-46	6-11	<1-2	1-6

*Abreviaturas: Carbono (C), Oxígeno (O), Hidrógeno (H), Nitrógeno (N), Azufre (S).

1.1.1 Biomasa procedente de residuos industriales y domésticos

En esta Tesis Doctoral se han utilizado dos tipos de biomasa. La procedente de la industria vinícola y la procedente de residuos domésticos como son la magaya de manzana procedente de la producción casera de sidra, los residuos de té y las hojas de romero. Describiremos brevemente las características de cada tipo de material.

Bagazo de uva. A lo largo del proceso necesario para la elaboración del vino existen varios pasos a partir de los cuales se obtienen residuos potencialmente utilizables como combustible: raspones, orujo y lías, aunque de todos ellos, el principal subproducto de la industria vitivinícola es el bagazo, constituido por restos de raspón, piel y semillas de uva. Una vía alternativa de aprovechamiento industrial del mismo consiste en la extracción del aceite contenido en las granillas o semillas de uva. El bagazo consiste principalmente en pieles y semillas de uva, que se separan del mosto en el paso de prensado (durante la obtención de vino blanco) o en el proceso de fermentación y prensado (en la obtención de vino tinto). Los procesos de vinificación se esquematizan en la Figura 3. En la producción del vino, el mosto se convierte en el producto final sólo después de la fermentación. Adicionalmente, se producen las denominadas lías, un material sólido procedente de la floculación de elementos tales como levaduras, partículas que precipitan, semillas y agentes clarificantes, entre otros, depositados en el fondo de los tanques de vino. La fermentación promueve alteraciones en la composición de carbohidratos y puede producir la liberación o degradación de polifenoles. Pese a esto, se comprobó que en el bagazo de uva, se retiene una cantidad significativa de sustancias antioxidantes. Sin embargo, el aprovechamiento de estas sustancias es ineficiente debido a que se producen grandes cantidades de bagazo sólo durante el corto período de cosecha. La incineración o el descarte en el campo pueden ser perjudiciales para el medio ambiente, debido a que los

compuestos fenólicos disminuyen el pH del bagazo con lo que aumenta su resistencia a la degradación biológica. Otros problemas ambientales incluyen: contaminación del agua superficial y subterránea, atracción de mosquitos, moscas y pestes que pueden propagar enfermedades y el agotamiento de oxígeno en el suelo y en aguas subterráneas por taninos y otros compuestos [14]. Cada país tiene su propia política para gestionar los residuos. En España, el gobierno ofrece a las empresas vitivinícolas tres alternativas para la gestión del bagazo: su reciclaje, su revalorización o su eliminación. Para realizar esta última opción es necesario pagar una tasa de eliminación.

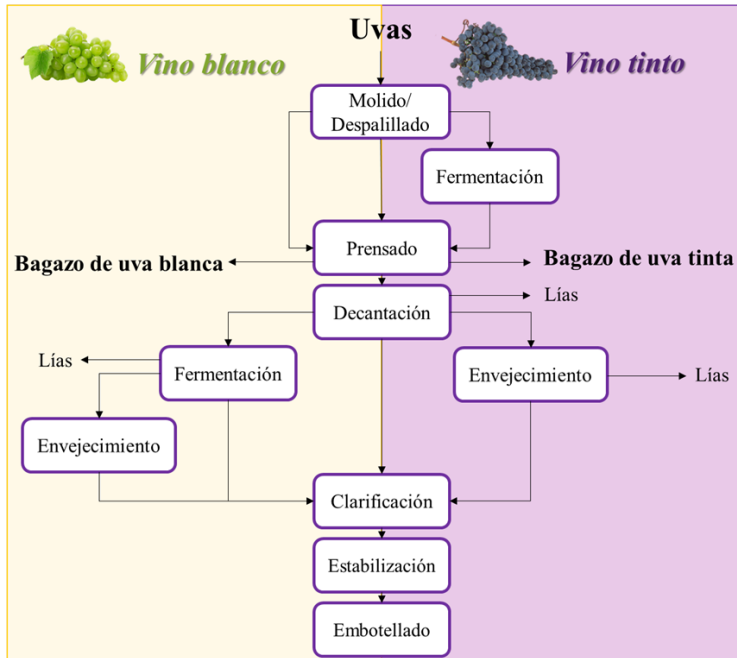


Figura 2. Procesos de vinificación y formación del bagazo de uva tintas y blancas.

La creciente demanda de compuestos naturales sobre compuestos sintéticos, y el foco en las prácticas agrícolas sostenibles favorece el desarrollo

del estudio de la reutilización y aprovechamiento de compuestos con valor añadido. Debido al alto porcentaje de metabolitos contenidos en el bagazo de uva y sus extractos, estos tienen potencial aplicación en diversas áreas como alimentos funcionales, cosméticos, farmacéuticos y suplementos, debido a los principios activos, entre ellos los antioxidantes, que contiene.

Los polifenoles son uno de los componentes más activos que pueden encontrarse en los residuos de la industria agroalimentaria. Son metabolitos secundarios presentes en los vegetales, que pueden influir en la calidad nutricional y sensorial de los mismos y son responsables de muchas de las cualidades antioxidantes y efectos benéficos de las frutas [15]. Muchos residuos del procesamiento de frutas y vegetales, como el bagazo de uva, todavía contienen altos niveles de polifenoles. De hecho, durante la vinificación se extrae sólo el 30-40% de los compuestos fenólicos [16]. Los flavonoides constituyen la mayor parte de los compuestos fenólicos en la piel de las uvas (65-75%), además de ácidos fenólicos como ácido gálico, ferúlico, cafeico y p-cumárico. En las uvas tintas las antocianinas son el grupo más importante de los flavonoides, el resveratrol (uno de los componentes bioactivos más importantes en las uvas), antocianinas y catequinas se concentran en la piel. En contraste, las semillas contienen un grupo único de compuestos fenólicos, las procianidinas (derivados del flavan-3-ol) que se encuentran entre los antioxidantes naturales más potentes [17]. Dado que las pieles y las semillas de las uvas son los constituyentes predominantes del bagazo, esta biomasa es una fuente rica en antioxidantes fenólicos.

Magaya de manzana. Se denomina así al residuo obtenido tras extraer el mosto de las manzanas y, debido a su especial composición, tiene un enorme potencial como componente en alimentos dietéticos [18]. La magaya se obtiene tras extraer el mosto de manzana (Figura 4) y está constituida fundamentalmente por tejidos de piel y pulpa ricos en polisacáridos (pectina, celulosa, hemicelulosa, lignina y gomas) así como en compuestos fenólicos (dihidrocalconas, flavonoles, flavanoles y ácidos fenólicos). Posee

propiedades antioxidantes importantes debido a la presencia de compuestos como la epicatequina, su dímero, glicósidos de quercetina, ácido clorogénico, floridizina, y 3-hidroxi-floridizina [19].

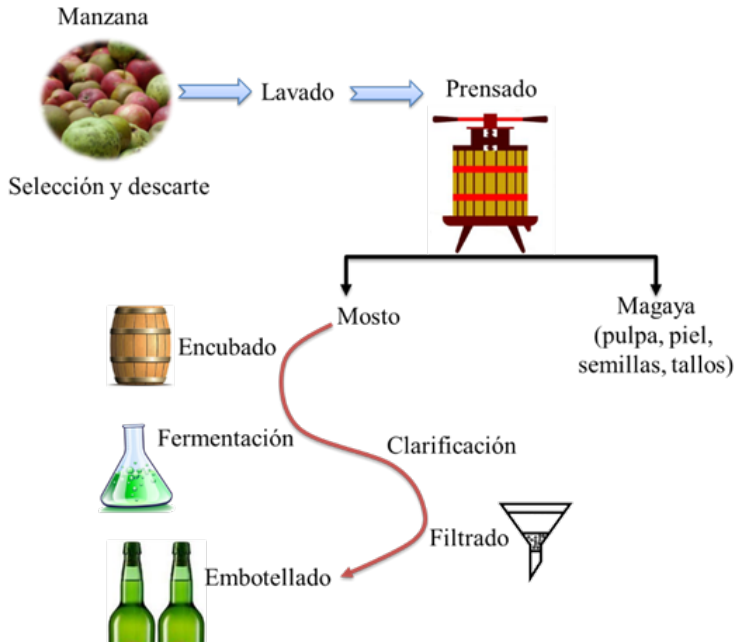


Figura 4. Proceso de elaboración de sidra y recuperación de la magaya.

Residuos de té verde y hojas de romero. En este trabajo hemos utilizado los residuos procedentes de bolsitas de té verde desechadas tras realizar la infusión. El té verde posee una composición compleja constituida por aminoácidos, compuestos volátiles, proteínas, minerales y elementos traza, siendo los polifenoles los componentes más activos biológicamente y con importantes efectos antioxidantes, antimutagénicos y anticarcinogénicos, siendo flavonoles (catequinas) y flavanoles la principal clase de polifenoles presentes [20]. Por otra parte, el romero (*Rosmarinus officinalis* L.) es una fuente rica en compuestos antioxidantes y antimicrobianos por lo que ha

encontrado amplia aplicación en la conservación de alimentos. El romero contiene importantes compuestos antioxidantes: ácidos fenólicos, flavonoides y diterpenoides como el carnosol y ácido carnósico, principales responsables de la actividad antioxidante de la planta y sus extractos [21].

1.2. Síntesis de nanopartículas a partir de biomasa vegetal

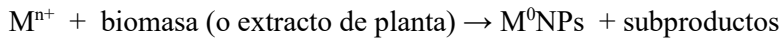
Las plantas poseen la capacidad de producir una gran variedad de estructuras ordenadas jerárquicamente, en gran cantidad y de diferentes tamaños que tratan de ser imitadas en los campos de la ingeniería de materiales y sistemas. Existen varios métodos que permiten transformar esos materiales altamente estructurados en materiales funcionales que permiten explotar su morfología natural. Por ejemplo, en el empleo de materiales híbridos para: la liberación de drogas y/o fármacos, la recuperación medioambiental, la generación de energía o la fabricación de nanomateriales bio-impresos. Además, las plantas son, per se, nano-factorías naturales. Las proteínas de soja, las de trigo (gluten, gliadina y glutenina), las de maíz (zeína), son ejemplos de biomoléculas a partir de las cuales se pueden obtener nanopartículas uniformes y que tienen amplias aplicaciones en el campo médico y farmacéutico. Por ejemplo, la zeína está aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) como un excipiente seguro para el recubrimiento de fármacos y se ha utilizado también en la liberación controlada de drogas. Asimismo, la celulosa, materiales lignocelulósicos y el almidón son compuestos que forman nanopartículas y poseen aplicaciones diversas. R.S. Varma y col. han recogido en una excelente revisión los diferentes tipos de nanoestructuras derivadas de las plantas y sus principales aplicaciones [22]. En la Tabla 2, se han seleccionado algunos ejemplos representativos.

Tabla 2. Aplicaciones de nanoestructuras derivadas de plantas [*Adaptado de Ref, 22*]

Nanoestructuras derivadas de plantas	Aplicaciones
NPs basadas en proteínas	<ul style="list-style-type: none"> - Liberación controlada de fármacos - Liberación de compuestos bioactivos - Ingeniería de tejidos - Industria alimentaria - Enlace con fármacos para aplicaciones medicas - Optimización de la biodisponibilidad de fármacos
NPs basadas en polisacáridos	<ul style="list-style-type: none"> - Sistemas de liberación de fármacos basados en celulosa - Transporte de fármacos - Reemplazo de vasos sanguíneos - Reemplazo de ligamentos de tejido blando, menisco y cartílago - Reemplazo de núcleo pulposo - Reparación de tejidos, regeneración y sanación
Nanoestructuras basadas en Carbono	<ul style="list-style-type: none"> - Bioimagen - Sensores - Optoelectrónica - Fotocatálisis - Electrodo para la conservación de energía - Celdas orgánicas fotovoltaicas - Detección de iones fluorescentes - Inhibición de especies radicales del oxígeno (ROS)
NPs adhesivas	<ul style="list-style-type: none"> - Ingeniería de tejidos y aplicaciones biomédicas - Agregación plaquetaria para la coagulación y la descamación de heridas - Cosmética
NPs de sílice	<ul style="list-style-type: none"> - Baterías de iones-Litio - Nanoelectrónica - Fotónica - Aditivos alimentarios - Almacenamiento de energía - Transporte de fármacos - Ingeniería de tejidos - Agentes antiaglomerantes en la industria alimentaria
NPs basadas en Lípidos	<ul style="list-style-type: none"> - Fabricación de nanomateriales blandos como nanotubos, nanofibras, geles y surfactantes - Aplicaciones biomédicas

Es importante, también, reseñar que aprovechando las propiedades quelantes y antioxidantes (reductoras) de los ácidos fenólicos, flavonoides,

alcaloides y terpenoides presentes en las plantas y en la biomasa procedente de las mismas, se ha descrito la bio-síntesis de diferentes nanopartículas metálicas por transformación de los correspondientes iones en disolución:



Ejemplos típicos de este tipo de síntesis han sido reportados para preparar nanopartículas metálicas de Ag, Au, Pd o Cu o de óxidos metálicos como ZnO, CuO, TiO₂, In₂O₃, entre otros [23, 24].

Los nanomateriales con base de carbono tienen hoy día un gran futuro y ya se están aplicando en diversos campos de la ciencia y la tecnología (Figura 5).

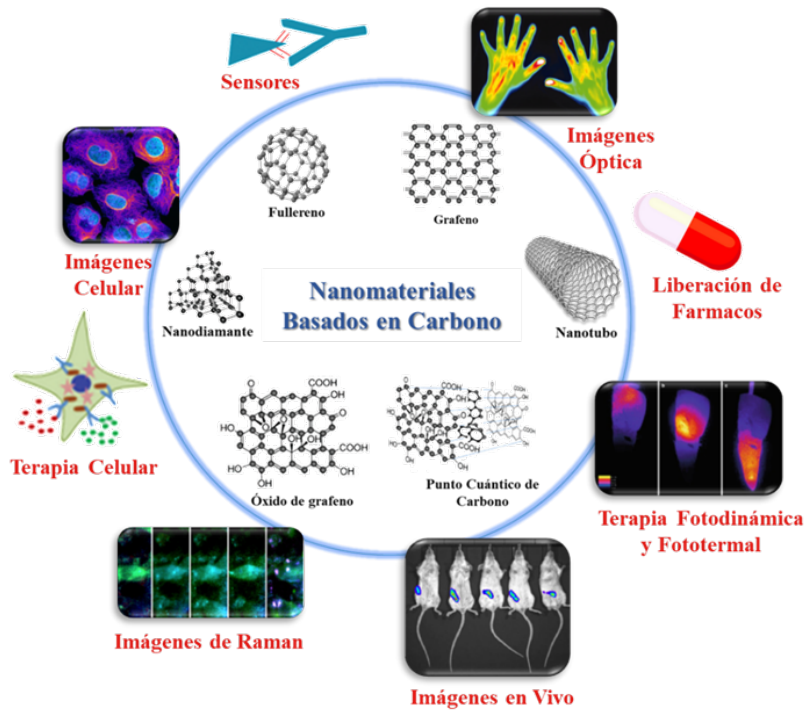


Figura 5. Diversidad de los nanomateriales con base de carbono y campos de aplicación.

La síntesis de nanomateriales con base de carbono (nanotubos, nanoesferas, nanofibras, fullerenos, etc), y en particular la de puntos cuánticos de carbono

(CDs, nanopartículas con diámetros inferiores a 10 nm), se ha venido realizando empleando estrategias “*top-down*”; es decir, partiendo de materiales carbonosos “macro” obtener los CDs y estas técnicas incluyen la descarga en arco, la ablación láser y la oxidación electroquímica. Estos métodos se desarrollan en condiciones duras (p.e. ácidos fuertes, descargas), con etapas tediosas, elevado costo energético y con instrumentación de alto costo, que limitan su aplicación práctica. Como contrapartida, las técnicas “*bottom-up*” convierten moléculas pequeñas en CDs por carbonización mediante procesos hidrotérmicos, pirolisis, ultrasonidos o microondas. Esta estrategia es más económica, sencilla, no requiere de equipos o instrumentos sofisticados y permite la modificación de la composición y la superficie de los CDs. Además, los materiales de partida son económicos, abundantes y renovables: productos naturales y biomasa. Una de las ventajas de utilizar este tipo de materiales renovables es que los CDs obtenidos retienen algunas características químicas del material de partida, como es la capacidad antioxidante y antimicrobiana de la biomasa, así como los grupos funcionales y la composición elemental (S, N, C, O), lo que permite obtener CDs que poseen no sólo excepcionales características fotoluminiscentes, fotoestabilidad y baja toxicidad, sino que, además, poseen la cualidad de que son “bioactivos”. Este hecho es muy interesante con vistas a las aplicaciones de los CDs en el desarrollo de nuevos materiales activos para la protección y seguridad de diferentes productos (alimentos, cosméticos, lubricantes, etc.). Por tanto, en este sentido se aúna la Nanotecnología con la Química Verde, la sostenibilidad y la economía circular (Figura 6).



1.3. Aceites vegetales: procesos de oxidación y medidas para atajarlos

Los lípidos son un componente importante de los alimentos, constituyentes clave de las células en los sistemas biológicos y una fuente de energía primaria para los organismos vivos. Comúnmente son definidos como sustancias insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos [25]. Los lípidos son pequeñas moléculas, hidrófobas o anfífilas, que puede originarse total o parcialmente por condensaciones de tioésteres y/o unidades de isopreno, definición que permite catalogar a los lípidos en ocho categorías: ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, lípidos de esteroles, lípidos de prenol (derivados de condensación de subunidades de isopreno),

sacrolípidos y policétidos (derivados de condensación de unidades de ceoacil), cada uno de los cuales contiene, a su vez, distintas clases y subclases de moléculas. Los ácidos grasos (AGs), son ácidos carboxílicos que tienen una cadena alifática saturada o insaturada. Los AGs se pueden clasificar según el número de dobles enlaces presentes en la cadena de carbono: AGs saturados (AGSs) con la fórmula general R-COOH, monoinsaturados (MUFAs, con un doble enlace) y poliinsaturados (PUFAs, con dos o hasta seis doble enlaces). La degradación de lípidos puede afectar a una gran variedad de productos incluyendo alimentos y productos industriales como lubricantes y cosméticos. Los lípidos alimentarios se dividen comúnmente en grasas y aceites dependiendo del origen del lípido y su estado físico a temperatura ambiente. Las grasas suelen ser sólidas a temperatura ambiente si son de origen animal debido a su alto contenido de AGSs; aunque la mayoría de los lípidos vegetales se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente, algunos se pueden encontrar también como sólidos (aceites de palma y coco) debido a su alto contenido de AGS o AGs *trans*.

Otra tipología de aceites largamente utilizados en la industria es la de los Aceites Lubricantes, cuya función principal es la de reducir la fricción, el desgaste y el calor entre las superficies que interactúan en los sistemas industriales. Los aceites lubricantes industriales tradicionales son bastante diversos:

- a) los lubricantes a base de petróleo como los aceites minerales y las mezclas complejas de hidrocarburos C₂₀-C₃₀ y otros compuestos se utilizan en aproximadamente el 90% -95% de las aplicaciones industriales, pero presentan algunos inconvenientes, como diferente composición dependiendo de la fuente de petróleo, volatilización de moléculas de bajo peso molecular, baja biodegradabilidad, riesgo de contaminación ambiental (los óxidos de C, N y S pueden ser emitidos en la atmósfera) y eliminación de desechos peligrosos; y
- b) los lubricantes sintéticos que se pueden desarrollar para aplicaciones específicas mediante reacciones químicas bien definidas, aunque debido a su

composición, son menos susceptibles a la oxidación y a descomposición bajo el calor [26].

En los últimos 30 años la preocupación por el medio ambiente ha dado lugar a la integración de esta inquietud en el campo de los lubricantes mediante la innovación y desarrollo de lubricantes de base biológica, considerados no tóxicos, abundantes y fácilmente biodegradables. Ya existen algunos lubricantes biodegradables en el mercado basados en aceites vegetales altamente insaturados o con alto contenido de ácido oleico, polialquilenglicoles, poli- α -olefinas de baja viscosidad, poli-ésteres y ésteres de ácidos dibásicos. Estos biolubricantes resultan ser más caros que los minerales pero, en contraste, exhiben características únicas como un índice de viscosidad más alto, propiedades anticorrosivas superiores, punto de inflamación más alto, buena lubricidad, mayor bio-degradabilidad y menor toxicidad [27]. Por lo tanto, los biolubricantes a base de aceite vegetal aparecen como una alternativa prometedora para los lubricantes tradicionales a base de aceites sintéticos y minerales.

Los lubricantes ecológicos, así como los aditivos utilizados en ellos, deben de cumplir con los estándares de biodegradación, baja toxicidad y seguridad. A pesar de sus atributos funcionales únicos, los aceites vegetales poseen ciertas limitaciones para su uso como bio-lubricantes tales como escasa estabilidad térmica y oxidativa, es decir, baja resistencia a aquellos procesos de degradación que pueden cambiar sus propiedades y su desempeño tribológico. En lo que sigue, describiremos brevemente los procesos de degradación de los aceites vegetales, sea para su empleo como aceites lubricantes, comestibles, cosméticos u otros usos.

1.3.1. Degradación de los aceites vegetales

Auto-oxidación. Este es el talón de Aquiles de los aceites vegetales. La mayoría de los aceites vegetales consisten principalmente en triacilgliceroles (TAGs) (~98%), [28] siendo la composición específica para cada aceite según

su origen. La composición de los aceites es particularmente importante en relación a su degradación: los ácidos grasos y los ácidos grasos libres (AGLs) en los triglicéridos tienen la capacidad de abstraer el hidrógeno como resultado de la presencia de regiones de baja energía como son los grupos metileno y/o hidrógenos bis-alílicos (Figura 7A). Por otro lado, en los aceites vegetales, los ácidos grasos tienen en su mayoría conformaciones cis y un contenido de ácidos grasos trans menor del 4% [29]. La configuración trans es termodinámicamente más estable que la cis y, además, los diferentes enlaces polares en los TAGs son sitios activos fácilmente atacables por la humedad, el oxígeno y otros productos químicos y agentes físicos (Figura 7B). En particular, una de las principales debilidades es el grado de insaturación de los dobles enlaces que funcionan como puntos activos para muchas reacciones, siendo la autooxidación común a los TAGs y AGLs.

El mecanismo de autooxidación de aceites vegetales es una reacción en cadena de radicales libres e incluye tres pasos: iniciación, propagación y terminación. El proceso se inicia mediante la formación de radicales de TAGs o AGs y la forma más común del oxígeno atmosférico, $^3\text{O}_2$, un radical triplete con dos orbitales no apareados en la molécula. No obstante, la interacción es termodinámicamente desfavorable debido a los diferentes estados de “spin” a menos que el oxígeno esté activado y convertido en oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) o en especies reactivas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\bullet), o el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Un aporte de energía (calor, luz, radiación radiactiva) o la presencia de sensibilizadores presentes en el aceite pueden mediar la activación del $^3\text{O}_2$. El paso de iniciación de la autooxidación tiene lugar con la abstracción de átomos de hidrógeno de TAGs y AGs (Figura 7A), lo que ocurre preferentemente en hidrógenos alílicos, que poseen las energías de disociación del enlace C-H más débiles. La abstracción de hidrógeno deja un radical lípidico (R^\bullet) que se estabiliza mediante un reordenamiento molecular (Figura 7B). El (R^\bullet) así formado reacciona luego con $^3\text{O}_2$ para formar nuevos radicales reactivos

alquilperoxi ($R-O-O^{\bullet}$), capaces de abstraer hidrógeno de otros TAGs y AGs para formar hidroperóxidos ($R-O-OH$) y nuevos radicales libres (R^{\bullet}). Los hidroperóxidos también pueden romperse para producir más radicales libres, extendiendo el proceso de la oxidación. Esta segunda etapa del proceso de autooxidación es el paso de propagación, y la sucesión de reacciones puede repetirse varias veces debido a la proliferación de radicales.

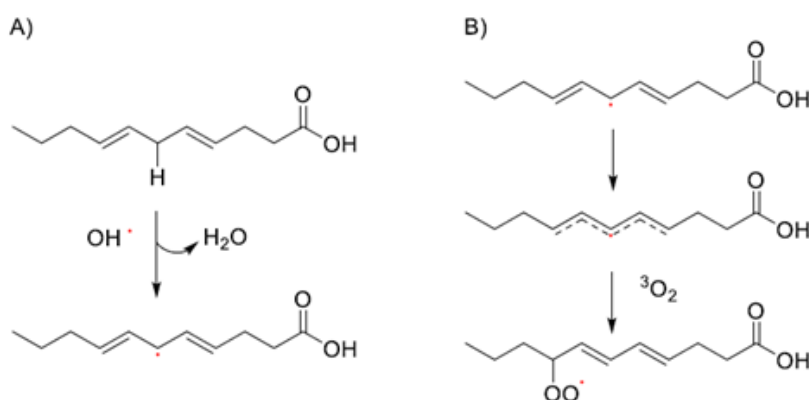


Figura 7. (A) Inicio de la oxidación de lípidos con el radical reactivo hidroxilo. (B) Sistema de resonancia con la formación de dienos conjugados y adición de oxígeno con la producción de radicales hidroperóxido.

Degradación foto-oxidativa. La radiación ultravioleta es otro importante factor que favorece la oxidación (foto-oxidación) y puede potenciar la reacción de auto-oxidación. En la fotooxidación participan las clorofilas que actúan como fotosensibilizadores, mientras que en ausencia de luz actúan como compuestos antioxidantes. Tras la absorción de la energía luminosa, las clorofilas pasan a un estado singlete excitado a partir del cual se puede poblar el estado triplete a través de un proceso no radiacional de cruce de sistemas. Las clorofilas en estado triplete reaccionan con 3O_2 , produciéndose oxígeno singlete por transferencia de energía, regresando así las clorofilas a su estado

fundamental singlete. El oxígeno singlete reacciona rápidamente con dobles enlaces ricos en electrones dando lugar a hidroperóxidos, que se descomponen como se describió en el proceso de auto-oxidación.

Degradación termo-oxidativa. La estabilidad térmica es una característica de los aceites de importancia crítica, en particular en aceites lubricantes. Durante el proceso de lubricación, la energía mecánica se transforma en calor, lo que resulta en el aumento de la temperatura de los cuerpos deslizantes, especialmente en la zona de contacto donde la temperatura es más alta [30]. La mayoría de los lubricantes de base vegetal (sin aditivos) solo se pueden utilizar en condiciones de bajo rendimiento, con bajo estrés térmico y a una temperatura máxima de 70°C. Aunque el efecto de la temperatura sobre la estabilidad oxidativa de los aceites vegetales se ha estudiado durante muchos años, el verdadero mecanismo de reacción de la descomposición térmica de los TAGs no está claro debido a su complejidad. En los trabajos realizados por Nawar [31, 32] los grupos de AGLs se forman térmicamente tanto en presencia como en ausencia de humedad, con liberación de cadenas más cortas y AGs insaturados dando como resultado un aceite más ácido. Las escisiones de los enlaces pueden ocurrir en cualquier punto de la estructura de los TAGs, produciendo una gran variedad de productos secundarios (lactonas, metil cetonas, hidrocarburos y muchos otros compuestos) y radicales libres que pueden iniciar reacciones de oxidación en cadena. A altas temperaturas, como resultado de la degradación, el aceite pierde sus propiedades (ya sean lubricantes, nutricionales, hidratantes, etc) y los productos finales de la degradación térmica, entre los que pueden existir radicales libres, pueden combinarse eventualmente entre sí para formar materiales poliméricos insolubles en el aceite (lodos y lacas) [33,34 35].

Degradación mediada por iones metálicos. Los aceites vegetales sin refinar pueden contener metales de transición como el cobre o el hierro en forma de quelatos [36]. Estos metales reducen la energía de activación del proceso de auto-oxidación y pueden iniciar y/o catalizar el primer paso de la degradación

que conduce a especies reactivas de $^1\text{O}_2$ a partir de $^3\text{O}_2$ y radicales hidroxilo a partir peróxido de hidrógeno (reacción Haber-Weiss), mientras que el H_2O_2 también puede formar radicales hidroxilo (reacción de Fenton) en presencia de Fe^{2+} [37, 38]. Algunos iones metálicos (Cu^{2+} o Fe^{3+}) pueden catalizar la reacción de descomposición de hidroperóxidos a radicales alcoxi, que pueden amplificar y/o iniciar nuevamente la peroxidación lipídica.

Contaminación por humedad. A diferencia de los aceites minerales, los aceites vegetales solubilizan agua en mayor proporción. El agua puede entrar en contacto con el aceite en diferentes formas, tales como absorción, condensación, combustión/oxidación/neutralización y como agua libre, y puede estar presente en los aceites en diferentes formas como son: agua disuelta, emulsionada o libre. La humedad del aire ambiental en constante contacto con el aceite representa el nivel más bajo de contaminación por humedad, la humedad disuelta. La humedad relativa del aire puede llegar a tener valores muy altos, hasta del 100%, en estas condiciones las moléculas de agua se dispersan en los aceites, no se condensan y el agua no es visible a simple vista. Si la temperatura desciende a un punto que las moléculas de agua se condensan, entonces el aceite se vuelve similar a la leche (agua emulsionada), mientras que en el caso de entrada de agua libre, ésta queda como una fase líquida acuosa separada del aceite. Los efectos directos de la contaminación del agua en aceites lubricantes causa muchos problemas para la vida útil de la maquinaria, así como en los aceites comestibles favoreciendo la degradación oxidativa y térmica de los mismos [39-41].

1.3.2 Actuaciones para mejorar la estabilidad oxidativa de los aceites vegetales

Todos los procesos descritos de oxidación y contaminación de los aceites vegetales provocan un bajo rendimiento en el campo de la lubricación y daños en los equipos industriales donde se utilizan, así como efectos no deseables cuando los aceites se utilizan para consumo humano o para cosméticos (aceite

de coco, de aguacate, de argán, etc). Por tanto, en bio-lubricantes basados en aceites vegetales, en aceites comestibles o en aceites cosméticos, es necesario buscar soluciones para lograr la estabilización oxidativa de los mismos. En ese sentido, se pueden considerar varias actuaciones: a) mezcla de diferentes tipos de aceites, b) modificación genética las plantas de origen, c) modificación química de los aceites y d) empleo de aditivos estabilizantes. A continuación, haremos una breve reseña de cada una de estas opciones.

a) Mezcla de aceites.

La mezcla de aceites con diferente composición en ácidos grasos permite conseguir la estabilidad oxidativa que no poseen los aceites por separado. Así, por ejemplo, mezclas de aceite de soja con aceite de arroz, mejoran la estabilidad térmica del aceite de soja notablemente en condiciones extremas de temperatura (12h a 170°C) gracias al elevado contenido en tocotrienol, tocoferol y fitoesteroles contenidos en el aceite de arroz, además de contener más AGs y MUFAs que el aceite de soja [42]

b) Modificación genética.

Esta es una herramienta de la ingeniería genética para mejorar la estabilidad oxidativa y térmica de los aceites vegetales alterando las propiedades genéticas de las plantas, a través de la modificación de la expresión de determinados genes que controlan la producción de MUFAs para enriquecer el aceite en los mismos [43]. Ya existe en el mercado Plenish[®] un aceite de soja alto oleico como lubricante biodegradable, producido por modificación genética por DuPont Pioneer [44].

c) Modificaciones químicas.

Esta es una forma ventajosa de mitigar algunas de las limitaciones de los aceites vegetales con uso industrial y mejorar algunas características físicas y químicas. Las modificaciones se pueden realizar en diferentes formas: (a) reacciones en los dobles enlaces de la cadena de AGs (hidrogenación selectiva, epoxidación, dimerización / oligomerización) y (b) reacciones en el grupo carboxilo de AGs/TAGs/ésteres (incluyen esterificación/ transesterificación y

formación de estóolidos). Con el fin de no extender en exceso esta Introducción, una descripción de cada una de estas reacciones se recogen en una revisión recientemente publicada [45].

Aditivos estabilizantes

Absorbentes de radiación. En este grupo se encuentran compuestos que absorben radiación UV como son los carotenoides, como el licopeno, la luteína y la zeaxantina.

Desactivantes de peróxidos. Destruyen los peróxidos e hidroperóxidos a través de una ruta no radicalaria, interrumpiendo la propagación. Ejemplos de este tipo de compuestos incluyen trialquilfosfitos y compuestos aromáticos de azufre.

Inhibidores de la cadena de propagación. Son el grupo más importante y eficaz de antioxidantes que inhiben o retardan la cadena de propagación y eliminan los primeros radicales libres mediante dos mecanismos: como aceptores de electrones (agentes oxidantes) y donantes de electrones (agentes reductores). Los compuestos estables finales son radicales fenoxilo que no propagan la cadena de peroxidación. Ejemplos de estos antioxidantes son el α -tocoferol (vitamina E) y los flavonoides [46].

Secuestrantes de metales. Este tipo de inhibidores de la oxidación convierten los iones metálicos en quelatos catalíticamente inactivos. Los ejemplos típicos incluyen bases de Schiff, tiadiazoles, oxamidas, curcumina, ácido fítico y quercetina.

Trabajos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral (como se verá más adelante), han demostrado que los aceites lubricantes pueden mejorar su estabilidad oxidativa gracias a aditivos respetuosos con el medio ambiente, no tóxicos y biodegradables, como son los CDs obtenidos a partir de biomasa vegetal y, por tanto, se podrían incluir en la lista anterior como un (potencial) quinto grupo de aditivos antioxidantes que cumplen varios de los requisitos de bio-compatibilidad, degradabilidad y baja toxicidad, para aceites vegetales con usos industriales (lubricantes, combustibles, surfactantes, etc).

1.4. Los CDs antioxidantes como aditivos en la preparación de materiales activos para el envasado

Como hemos visto, la oxidación es la principal causa de deterioro de aceites vegetales y limita considerablemente la vida útil de los productos que los contienen como son los alimentos, los lubricantes, los cosméticos, fármacos, etc. Por ello, y para proteger los productos y minimizar los efectos de esos procesos de degradación desde hace varios años se ha venido desarrollando un nuevo concepto de envase, el envase activo que además de las funciones del envasado pasivo tiene la capacidad de interaccionar con producto y/o con su entorno para mejorar la calidad del mismo y/o su seguridad [47]. Según la legislación de la Unión Europea para poder definir un envasado activo en el campo de los alimentos [48], este tiene que estar diseñado para incorporar componentes "activos" destinados a ser liberados en los productos o para absorber sustancias hacia o desde los productos o el entorno circundante. Entre los diferentes tipos de envases activos que son objeto de diferentes estudios a nivel tecnológico están los envases activos antioxidantes. Estos envases se pueden clasificar en dos grandes grupos: los envases absorbentes de oxígeno y los envases liberadores de antioxidantes. Entre los envases absorbentes de oxígeno se encuentran los basados en reacciones químicas y los basados en reacciones enzimáticas (Figura 8). Comercialmente, los envases activos antioxidantes basados en reacciones químicas más utilizados son los basados en polvo de hierro, ácido ascórbico, ascorbato/sulfito, polímeros fotosensibles, entre otro.

El de polvo de hierro es uno de los más utilizado siendo su mecanismo de acción complejo, así como el del ácido ascórbico, el mecanismo también es complejo y lento, por lo que se suele acelerar el proceso por acción de la luz o por acción de un metal de transición como el cobre. En general, dentro del envase se incluyen pequeñas bolsas conteniendo el antioxidante o en forma de etiqueta (Figura 9).

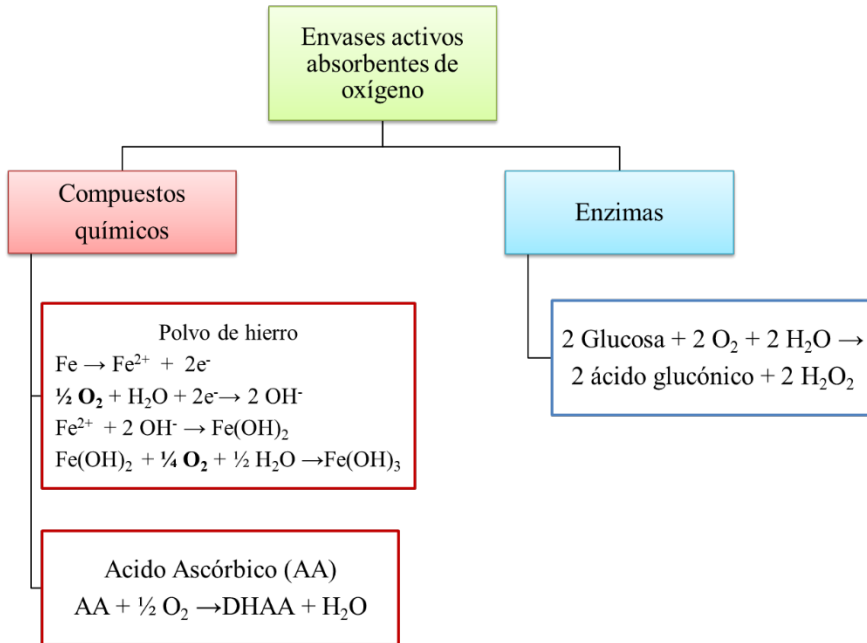


Figura 8. Envases activos basados en el empleo de compuestos y enzimas “consumidores” de oxígeno.

Los antioxidantes pueden también incorporarse directamente en el material empleado para envasar y ser liberados por un mecanismo de difusión desde el envase a la superficie del alimento y disolución en superficie, en el interior del producto o mediante la captación de radicales. Se han utilizado con este propósito antioxidantes sintéticos (compuestos fenólicos como los ya comentados), que además también poseen actividad antimicrobiana [49]. Sin embargo, estos compuestos son sospechosos de tener efectos tóxicos y carcinogénicos, por lo que actualmente la investigación se está enfocando al empleo de antioxidantes naturales [50].

Los materiales con liberación controlada de antioxidantes (y/o antimicrobianos) es una nueva generación de materiales activos que mejoran

la seguridad de los alimentos, mantienen su calidad y alargan la vida del mismo. La aplicación de materiales con liberación controlada de agentes activos ha sido amplia y exitosamente aplicada en el campo de los productos farmacéuticos, pero en el campo de la industria alimentaria está todavía en su infancia. Una excelente revisión sobre el tema se ha publicado recientemente [51].



Figura 9. Algunos absorbentes de oxígeno comerciales

En la Tabla 3 se recogen algunos ejemplos representativos de este tipo de materiales de empaquetado con antioxidantes naturales (aunque las aplicaciones están todavía por llegar).

Tabla 3. Ejemplos de materiales para empaquetado activo con extractos naturales de antioxidantes.

Antioxidante	Polímero	Aplicación	Referencia
Extracto de romero	Almidón de yuca	-	[52]
Extracto de té verde	Polietileno	Carne	[53]
Extracto de própolis	Quitano	-	[54]
Extracto de <i>Allium ursinum</i> L. (ajo salvaje)	Ácido poliláctico	-	[55]
Aceite esencial de mejorana	Pectina	-	[56]
Extracto de tomillo	Ácido poliláctico/polilactona	-	[57]
Extracto de <i>Persicaria minor</i> (pimienta de agua)	Carragenato semi-refinado	Carne	[58]

En los últimos diez años, se ha constatado que diversos nanomateriales poseen una excelente actividad antioxidante. En particular, diferentes nanopartículas (NPs) basadas en metales y en óxidos metálicos obtenidas por reducción con extractos biológicos (síntesis verde) ofrecen un gran potencial debido al contenido en moléculas antioxidantes presentes en estos extractos y que actúan como recubrimiento superficial de las NPs. Por ejemplo, Muthukumar y col. [59] observaron un elevado potencial antioxidante frente a DPPH y ABTS de NPs de hierro obtenidas por reducción con extracto de hojas de *Amaranthus spinosus* debida a la presencia de amarantina y compuestos fenólicos. Asimismo, recientemente se ha reportado una excelente actividad antioxidante y antibacteriana de NPs de cobre obtenidas utilizando el extracto de hoja de *Cissus arnotiana* [60]. En la Tabla 4 se muestran algunos ejemplos de este tipo de NPs obtenidas por síntesis verde.

También han atraído la atención de los investigadores las NPs con base de carbono como son los carbon dots (CDs), las NPs de grafeno, los tubos de carbono, los fullerenos, por la actividad antioxidante que presentan. Entre este

tipo de NPs, los CDs pueden obtenerse a partir de varias fuentes naturales tanto de origen vegetal (pieles y pulpa de frutas, hojas y tallos de plantas, semillas, etc) como animal (carne, pescado, albumina de suero bovino, yema de huevo) así como de diferentes tipos de biomasa [61].

Tabla 4. Nanopartículas metálicas obtenidas por síntesis verde

Nanopartículas	Extracto biológico de	Actividad antioxidante	Referencia
Ag	<i>Bergenia ciliate</i> (planta)	59,31% frente a DPPH	[62]
Ag	<i>Citrullus lanatus</i> (planta)	60,97% frente a DPPH y 55,26% frente a ABTS	[63]
Au	<i>Vitex negundo</i> (planta)	84,64% frente a DPPH	[64]
Au	Células libres de <i>Enterococcus</i> (bacteria)	33,24-51,47% frente a DPPH	[65]
ZnO	Células libres de <i>Pichia kudriavzevii</i> (hongo)	51,14% frente a H ₂ O ₂	[66]
CuO	<i>Dioscorea bulbifera</i> (tubérculo)	40,81% frente a DPPH y 79,06% frente a óxido nítrico	[67]

El empleo de los CDs como aditivos antioxidantes está todavía en sus inicios, aunque varios ejemplos muestran que los precursores utilizados para producir CDs con propiedades antioxidantes son materiales de origen vegetal con componentes antioxidantes como son: ajo [68], hojas de cilantro [69] y hojas de té [70]. Solo algunos de estos CDs se han aplicado a muestras reales, especialmente para evaluar la viabilidad de células *in vitro* y su protección bajo estrés oxidativo. La baja toxicidad de los CDs, la facilidad de síntesis y el bajo coste de la materia prima, los perfilan como posibles candidatos para el desarrollo de envases activos para productos no sólo alimentarios [71], sino también industriales como cosméticos, fármacos y lubricantes. Es preciso ahondar en este campo con el fin de rellenar el vacío entre los resultados de la investigación en los laboratorios y la transferencia de los mismos al mercado.

2 BIBLIOGRAFÍA

- [1] <https://sustainabledevelopment.un.org/index.html>. Última consulta 19 de junio de 2021
- [2] C. Silvestri, L. Silvestri, A. Forcina, G. Di Bona, D. Falcone. Green chemistry contribution towards more equitable global sustainability and greater circular economy: A systematic literature review, *Journal of Cleaner Production* 2021, **294**, 126137 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126137>
- [3] K. Voigt, H. Scherb, R. Bruggemann, K. Schramm. Science of the Total Environment Discrete mathematical data analysis approach : a valuable assessment method for sustainable chemistry. *Sci. Total Environ.* 2013, **454 (455)**, 149e153. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.098>
- [4] T.-L. Chen, H. Kim, S.-Y. Pan, P.-C. Tseng, Y.-P. Lin, P.-C. Chiang. Implementation of green chemistry principles in circular economy system towards sustainable development goals: Challenges and perspectives. *Science of The Total Environment*, 2020, **716**, 136998. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136998>
- [5] J. Sherwood. The significance of biomass in a circular economy. *Bioresource Technology*, 2020, **300**, 122755. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122755>
- [6] DIRECTIVA 2009/28/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 23 de abril de 2009 relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables y por la que se modifican y se derogan las Directivas 2001/77/CE y 2003/30/CE

- [7] A.C. Gonçalves, I. Malico, A.Sousa; Solid Biomass from Forest Trees to Energy: A Review; en *Renewable Resources and Biorefineries*, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79303>
- [8] D.K. Lee, E. Aberle, E.K. Anderson, W. Anderson y otros. Biomass production of herbaceous energy crops in the United States: Field trial maps from the multiyear regional feedstock partnership; *GCB Bioenergy*, 2018, 10, 698-716. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12493>
- [9] A. Abomohra, W. Jin, R. Tu, S. Han, M. Eid, H. Eladel; Microalgal Biomass Production as a Sustainable Feedstock for Biodiesel: Current Status and Perspectives, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, **64**, 596-606 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.056>
- [10] D.M. Berendes, P.J. Yang, A. Lai, y otros. Estimation of global recoverable human and animal faecal biomass. *Nat Sustain* 2018, **1**, 679–685. <https://doi.org/10.1038/s41893-018-0167-0>
- [11] R. Sirous, F.J. Neto da Silva, L.A. da Cruz Tarelho, N.A. Dias Martins. Mixed biomass pelleting potential for Portugal, step forward to circular use of biomass residues; *Energy Reports*; 2020, **5**, 940-945. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2020.01.002>
- [12] S.V. Vassilev , D. Baxter, L.K. Andersen , C.G. Vassileva. An overview of the chemical composition of biomass, *Fuel* 2010, **89(5)**, 913-933. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.10.022>
- [13] K.L. Christ, R.L. Burritt. Critical environmental concerns in wine production: an integrative review; *J. Clean. Prod.*, 2013, **53 C**, 232-242. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.04.007>
- [15] I. Ignat, I. Volf, V.I. Popa. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chem.*, 2011, **126 (4)**, 1821–1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>

- [16] I.K.B. Lorrain, N. Kolbas, A. Crozier, P.-L. Teissedre. Wine by-products: phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties, *Molecules*, 2014, **19** (1), 482–506. <https://doi.org/0.3390/molecules19010482>
- [17] K. Zhou, J.J. Raffoul; Potential Anticancer Properties of Grape Antioxidants; *J. of Oncology*, 2012, Artículo 803294; <http://dx.doi.org/10.1155/2012/803294>
- [18] K. Kołodziejczyk, J. Markowski, M. Kosmala, B. Krol, W. Płocharski, Apple pomace as a potential source of nutraceutical products, *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 57 (2007) 291–295
- [19] S. Rana, S. Gupta, A. Rana, S. Bhushan; Functional properties, phenolic constituents and antioxidant properties of industrial apple pomace for utilization as active food ingredient; *Food Science and Human Wellness*, 2015, **4**, 180-187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2015.10.001>
- [20] S.M. Chako, P.T. Thambi, R.Kuttan, I. Nishigaki; Beneficial effects of green tea: a literatura review; *Chin. Med.*, 2010, **5**, 13. <http://www.cmjournal.org/content/5/1/13>
- [21] J.A. Barreto Peixoto, G. Alvarez-Rivera, R.C. Alves, A.S.G. Costa y otros. Comprehensive Phenolic and Free Amino Acid Analysis of Rosemary Infusions: Influence on the Antioxidant Potential; *Antioxidants*, 2021, **10**, 500. <https://doi.org/10.3390/antiox10030500>
- [22] R. Mohammadinejad, S. Karimi, S. Iravani, R.S. Varma. Plant-derived nanostructures: types and applications, *Green Chem.*, 2016, **18**, 20-52. <http://dx.doi.org/10.1039/c5gc01403d>
- [23] M. Shah, D. Fawcett, S. Sharma, S.K. Tripathy, G.E.J. Poinern; Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities; *Materials*, 2015, **8**, 7278-7308. <http://dx.doi.org/10.3390/ma8115377>

[24] D. Sharma, S. Kenchi, K. Bisetty. Biogenic synthesis of nanoparticles: A review; *Arabian J.Chem.*, 2019, **12**, 3576-3600. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.002>

[25] R. Cammack, T. Atwood, P. Campbell, H. Parish, A. Smith, F. Vella, J. Stirling, Eds.; *Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed.; Oxford University Press, Oxford, UK, 2006.

[26] J.C.J. Bart, E. Gucciardi, S. Cavallaro. *Science and Technology. In Biolubricants*, 1st ed.; Woodhead Publishing Series in Energy; Woodhead Publishing; Chapter 7, 2013

[27] J.A. Cecilia, D. Ballesteros Plata, R.M. Alves Saboya, F.M. Tavares de Luna, C.L. Cavalcante, E. Rodriguez-Castellon. An Overview of the Biolubricant Process: Challenges and Future Perspectives. *Processes* 2020, 8, 257. <https://doi.org/10.3390/pr8030257>

)

[28] C. Scrimgeour, C. Chemistry of Fatty Acids. In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 6th ed.; Six Volume Set; F. Shahidi, Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2005.

[29] J. Song, J. Park, J. Jung, C. Lee, S.Y. Gim, H. Ka, B.R. Yi, M.J. Kim, B. Kim, J.H. Lee. Analysis of Trans Fat in Edible Oils with Cooking Process. *Toxicol. Res.* 2015, **31**, 307–312. <https://doi.org/10.5487/TR.2015.31.3.307>

[30] F.E. Kennedy. Frictional Heating and Contact Temperatures; In *Modern Tribology Handbook*; Bhushan, B., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, Vol 2, Chapter 6, 2001.

[31] W.W. Nawar. Thermal degradation of lipids. *J. Agric. Food Chem.* 1969, **17**, 18–21. <https://doi.org/10.1021/jf60161a012>

[32] E.D. Crnjar, A. Witchwoot, W.W. Nawar. Thermal oxidation of a series of saturated triacylglycerols. *J. Agric. Food Chem.* 1981, **29**, 39–42. <https://doi.org/10.1021/jf00103a011>

- [33] V.Gatto, W. Moehle, T. Cobb, E. Schneller. Oxidation Fundamentals and Its Application to Turbine Oil Testing. *J. ASTM Int.* 2006, **3**, 13498. <https://doi.org/10.1520/JAI13498>
- [34] L.R. Rudnick, *Lubricant Additives: Chemistry and Application*; Marcel Dekker, Inc, New York, 2003.
- [35] A.O. Falade, G. Oboh, A.I. Okoh. Potential Health Implications of the Consumption of Thermally-Oxidized Cooking Oils:a Review; *Pol. J .Food Nutr.Sci.*, 2017, **67**, 95-105. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2016-0028>
- [36] E.A. Decker. Antioxidant Mechanism. In *Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 2nd ed.; Akoh, C. C.; Min, D. B., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2002.
- [37] E. Choe, D.B. Min. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2006, **5**, 169–186. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x>
- [38] M.T. Costello, *Lubricant Additives: Chemistry and Application*, 2nd ed.; L.R. Rudnik, Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, Chapter 17, 2009
- [39] A.C. Eachus. The trouble with water. *Tribol. Lubr. Technol.* 2005, **61**, 32–39.
- [40] P.M. Cyriac, R. Lugt, R. Bosman. Impact of Water on the Rheology of Lubricating Greases. *Tribol. Trans.* 2016, **59**, 679–689. <https://doi.org/10.1080/10402004.2015.1107929>
- [41] K.Kittipongpittaya, A. Panya, A., E.A. Decker. Role of Water and Selected Minor Components on Association Colloid Formation and Lipid Oxidation in Bulk Oil. *J Am Oil Chem Soc.* 2016, **93**, 83-91. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2752-y>
- [42] M.A. Ali, M.A. Islam, N.H. Othman, A.M. Noor, M. Ibrahim; Effect of rice bran oil addition on the oxidative degradation and fatty acid composition

of soybean oil during heating. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 2019, **18**, 427-438. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2019.0694>

[43] T. Buhr, S. Sato, F. Ebrahim, A. Xing, Y. Zhou, M. Mathiesen, B. Schweiger, A. Kinney, P. Staswick. Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. *Plant J.* 2002, **30**, 155–163. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01283.x>

[44] <https://www.pioneer.com/us/products/soybeans/plenish.html>. Última consulta 19 de junio de 2021.

[45] Murru, C.; Badía-Laíño, R.; Díaz García, M. E. Synthesis and Characterization of Green Carbon Dots for Scavenging Radical Oxygen Species in Aqueous and Oil Samples. *Antioxidants* 2020, **9**, 1147. <https://doi.org/10.3390/antiox9111147>

[46] K.S. Sonam, S. Guleria. Synergistic Antioxidant Activity of Natural Products. *Ann. Pharmacol Pharm.* 2017, **2**, 1086.

[47] A. Ozcan, New approaches in smart packaging technologies; Invited Lecture. 10th International Symposium on Graphic Engineering and Design GRID 2020 at Serbia. <https://doi.org/10.24867/GRID-2020-p1>

[48] Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/10/oj>. Última consulta 14 de junio de 2021.

[49] I. Ahmed, H. Lin, L. Zou, A.L. Brody, Z. Li, L.M. Qazi, T.R. Pavase, L. Lv. A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control* 2017, **82**, 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.009>

[50] C. Vilela, M. Kurek, Z. Hayouka, B. Röcker, S. Yildirim, M.D.C. Antunes, J. Nilsen-Nygaard, M.K. Pettersen, C.S.R. Freire. A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* 2018, **80**, 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.006>

- [51] Vasile, M. Baican. Progresses in Food Packaging, Food Quality, and Safety-Controlled-Release Antioxidant and/or Antimicrobial Packaging; *Molecules*, 2021, **26**, 1263. <https://doi.org/10.3390/molecules26051263>
- [52] D. Piñeros-Hernandez, C. Medina-Jaramillo, A. López-Córdoba, S. Goyanes. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocoll.* 2017, **63**, 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.034>
- [53] M. Wrona, C. Nerín, M.J. Alfonso, M.A. Caballero. Antioxidant packaging with encapsulated green tea for fresh minced meat. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2017, **41**, 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.001>
- [54] U. Siripatrawan, W. Vitchayakitti. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocoll.* 2016, **61**, 695–702. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001>
- [55] T. Radusin, S. Torres-Giner, A. Stupar, I. Ristic, A. Miletic, A. Novakovic, J.M. Lagaron. Preparation, characterization and antimicrobial properties of electrospun polylactide films containing *Allium ursinum* L. extract. *Food Packag. Shelf Life* 2019, **21**, 100357. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100357>
- [56] H. Almasi, S. Azizi, S. Amjadi. Development and characterization of pectin films activated by nanoemulsion and Pickering emulsion stabilized marjoram (*Origanum majorana* L.) essential oil. *Food Hydrocoll.* 2020, **99**, 105338. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105338>
- [57] S. Milovanovic, G. Hollermann, C. Errenst, J. Pajnik, S. Frerich, S. Kroll, K. Rezwani, J. Ivanovic, Supercritical CO₂ impregnation of PLA/PCL films with natural substances for bacterial growth control in food packaging. *Food Res. Int.* 2018, **107**, 486–495. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.065>
- [58] W.A.W. Yahaya, M.P. Almajano, N.A. Yazid, N.A.M. Azman. Antioxidant activities and total phenolic content of Malaysian herbs as components of active packaging film in beef patties. *Antioxidants* 2019, **8**. <https://doi.org/10.3390/antiox8070204>

- [59] H. Muthukumar, M. Manickam. Amaranthus spinosus leaf extract mediated FeO nanoparticles: Physicochemical traits, photocatalytic and antioxidant activity. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2015, **3**, 3149–3156. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00722>
- [60] S. Rajeshkumar, S. Menon, S.V. Kumar, M.M. Tambuwala, H.A. Bakshi, M. Mehta, S. Satija G. Gupta, D.K. Chellappan, L. Thangavelu, et al. Antibacterial and antioxidant potential of biosynthesized copper nanoparticles mediated through Cissus arnotiana plant extract. *J. Photochem. Photobiol.* 2019, **197**, 111531. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111531>
- [61] W. Meng, X. Bai, B. Wang, Z. Liu, S. Lu, B. Yang; Biomass-derived carbon dots and their applications. *Energy Environ. Mater.* 2019, **2**, 172–192. <https://doi.org/10.1002/eem2.12038>
- [62] A.R. Phull, Q. Abbas, A. Ali, H. Raza, S.J. Kim, M. Zia, I.U. Haq. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from crude extract of *Bergenia ciliata*. *Future J. Pharm. Sci.* 2016, **2**, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2016.03.001>
- [63] J.K. Patra, G. Das, K.H. Baek. Phyto-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using the rind extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) under photo-catalyzed condition and investigation of its antibacterial, anticandidal and antioxidant efficacy. *J. Photochem. Photobiol. B* 2016, **161**, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.05.021>
- [64] S. Veena, T. Devasena, S.S.M. Sathak, M. Yasasve, L.A. Vishal. Green synthesis of gold nanoparticles from *Vitex negundo* leaf extract: Characterization and in vitro evaluation of antioxidant-antibacterial activity. *J. Clust. Sci.* 2019, **30**, 1591–1597. <https://doi.org/10.1007/s10876-019-01601-z>
- [65] I.C. Oladipo, A. Lateef, J.A. Elegbede, M.A. Azeez, T.M. Asafa, T.A. Yekeen, A. Akinboro, E.B. Gueguim-Kana, L.S. Beukes, T.O. Oluyide, et al. Enterococcus species for the one-pot biofabrication of gold nanoparticles: Characterization and nanobiotechnological applications. *J. Photochem.*

Photobiol. B 2017, **173**, 250–257.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.06.003>

[66] V.R, Netala, M.S. Bethu, B. Pushpalatha, V.B. Baki, S. Aishwarya, J.V. Rao, V. Tartte. Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. *Int. J. Nanomed.* 2016, **11**, 5683–5696.
<https://doi.org/10.2147/ijn.s112857>

[67] S. Ghosh, P. More, R. Nitnavare, S. Jagtap, R. Chippalkatti, A. Derle, R. Kitture, A. Asok, S. Kale, S. Singh, et al. Antidiabetic and antioxidant properties of copper nanoparticles synthesized by medicinal plant *Dioscorea bulbifera*. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 2015, **S6**, 007.
<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7439.S6-007>

[68] A. Sachdeva, P. Gopinath. Green synthesis of multifunctional carbon dots from coriander leaves and their potential application as antioxidants, sensors and bioimaging agents. *Analyst*, 2015, **140**, 4260–4269.
<https://doi.org/10.1039/C5AN00454C>

[69] L.A. Chunduri, A. Kurdekar, S. Patnaik, B.V. Dev, T.M. Rattan, V. Kamiseti. Carbon Quantum Dots from Coconut Husk: Evaluation for Antioxidant and Cytotoxic Activity; *Mater. Focus*, 2016, **5**, 55–61.
<https://doi.org/10.1166/mat.2016.1289>

[70] J.S. Lin, Y.W. Tsai, K. Dehvari, C.C. Huang, J.Y. Chang. A carbon dot based theranostic platform for dual modal imaging and free radical scavenging; *Nanoscale*, 2019, **11**, 20917. <https://doi.org/10.1039/C9NR05746C>

[71] E. Drago, R. Campardelli, M. Pettinato, P. Perego. Innovations in Smart Packaging Concepts for Food: An Extensive Review. *Foods* 2020, **9**, 1628.
<https://doi.org/10.3390/foods9111628>

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS

El objetivo global de esta Tesis Doctoral es evaluar la aplicabilidad de puntos cuánticos de carbono obtenidos a partir de biomasa rica en compuestos antioxidantes, bagazo de uva y magaya de manzana, así como de desechos domésticos (hebras de té y romero), para su empleo como aditivos en el desarrollo de materiales activos innovadores que puedan ser utilizados en la industria alimentaria, de la lubricación y/o cosmética.

Este objetivo global puede desglosarse en los siguientes objetivos parciales:

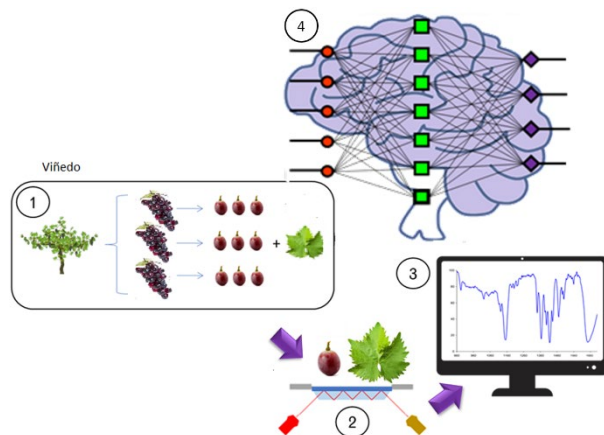
:

- Desarrollo de metodologías para el reconocimiento de variables químicas relacionadas con el grado de madurez y la clasificación varietal de uvas utilizadas en la elaboración de vino DPO Cangas, a partir de la piel de diferentes variedades de uva y de las hojas de las vides, empleando técnicas quimiométricas acopladas con ATR-FTIR. Evaluación de su posible correlación con el contenido de compuestos antioxidantes en el bagazo.
- Síntesis y caracterización de puntos de carbono con propiedades antioxidantes, obtenidos a partir de biomasa vegetal, bagazo de uva, magaya de manzana y hebras de té.

- Evaluación de la actividad antioxidante de los puntos cuánticos de carbono sintetizados cuando se emplean como aditivos en aceites comestibles y cosméticos para ralentizar su proceso de degradación oxidativa.
- Fabricación de películas biocompatibles a partir de caseinato sódico y pectina altamente metoxilada enriquecidas con puntos cuánticos de carbono con actividad antioxidante.
- Evaluación de las características reológicas y de las propiedades mecánicas de las bio-películas sintetizadas en el apartado anterior. Estudio de la estabilidad oxidativa de muestras de aceite alimentario y cosmético en presencia de las bio-películas enriquecidas con CDs

CAPÍTULO 1

Estudio de variables químicas en el hollejo de uvas y hojas de vid empleando ATR-FTIR/Redes Neuronales Artificiales: Relación con el grado de madurez y la clasificación varietal



1 INTRODUCCIÓN

España es conocida por ser un país soleado que dedica grandes extensiones de terreno a la vitivinicultura, contando con noventa y siete Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) de vinos y cuarenta de Indicación Geográfica Protegida (IGP). En 2020 se contabilizaron aproximadamente 950.000 hectáreas cultivadas, un 13% del total mundial, y la vendimia del 2020/21 alcanzó la cifra de 6 millones de toneladas de uva recolectada [1]. Entre el 10 y el 30 % de esta cantidad se corresponden con la generación de residuos provenientes de la vinificación. Es, por tanto, innegable el gran impacto medioambiental que genera esta actividad y la necesidad imprescindible de una gestión eficiente de estos subproductos.

Actualmente, para determinar las posibles aplicaciones industriales de estos subproductos, es necesario conocer su composición en cada fase de la vendimia y de la producción del vino. El bagazo de uva, mayoritariamente compuesto de hollejo y hojas, varía su composición en función de la variedad de uva, de la maduración del fruto, de la geografía, y/o del tipo de vino producido.

A la composición de la piel de la uva se le puede aplicar un nuevo concepto, acuñado en los últimos años, y es el de ‘fibra antioxidante’ referido a proteínas y polifenoles presentes en los hollejos en los que se combinan las propiedades saludables de la fibra dietética con la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.

Los polifenoles, compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos y cuyo

contenido en los hollejos varía entre el 4,8% y el 5,4% de la materia seca [2], son sintetizados por las plantas en gran cantidad como producto de su metabolismo secundario (Figura 1). Además de las propiedades antioxidantes intrínsecas, algunos de ellos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales mientras que otros actúan como sistema de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos.

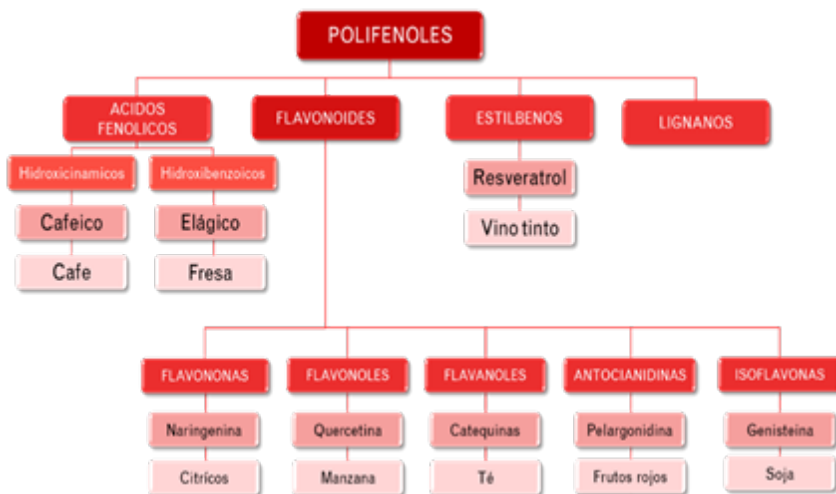


Figura 1. Clasificación de los diferentes polifenoles y ejemplos de productos vegetales en los que se pueden encontrar.

Los compuestos polifenólicos constituyen un aspecto importante en la calidad de uvas y vinos y se pueden encontrar en altas concentraciones en la piel de las frutas, teniendo un papel importante como metabolitos secundarios [3] y se pueden dividir en dos grupos principales: no flavonoides (ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico y estilbenos) y compuestos flavonoides (antocianinas, flavan-3-oles y flavonoles). Entre los compuestos flavonoides, las antocianinas son la familia de polifenoles responsables del color de las uvas y vinos jóvenes, mientras que los flavan-3-oles (catequinas monoméricas y

proantocianidinas) son los principales responsables de la astringencia, el amargor y la estructura de los vinos [4]. Por su parte los flavonoles como quercetina, miricetina, kaempferol, isorhamnetina y sus glucósidos, contribuyen al amargor además de ser los compuestos fenólicos más abundantes en la piel de la uva, mientras que las semillas de la uva son ricas en flavan-3-ol [5]. La concentración de compuestos fenólicos en las uvas cambia dependiendo de la variedad de la vid y está influenciada por diferentes factores ambientales [6].

Los compuestos ubicados en la pared celular de la piel, que aportan gran parte de la fibra, están estrechamente relacionados con las diferentes tipologías de uvas. La pared celular primaria de los frutos está compuesta principalmente por varios polisacáridos (pectinas, hemicelulosas y celulosa) y de cantidades más pequeñas de glicoproteínas estructurales, ésteres fenólicos, minerales y enzimas [7,8]. La pared celular y sus polisacáridos constitutivos son indispensables para aportar propiedades mecánicas a la planta, confiriéndole rigidez y fuerza.

Existen diferentes metodologías de análisis utilizadas para la identificación de estos compuestos. Entre ellas, la técnica de referencia es la cromatografía, que permite, además, determinar el grado de maduración y/o la clasificación varietal de la muestra [9- 11]. También se han empleado otras técnicas menos usuales como la ^1H NMR para la cuantificación de metabolitos en jugo de uva o para discriminar clases de jugos de uva así como de vinos [12,14]. Sin embargo, en todas estas técnicas los pretratamientos de las muestras son destructivos, largos y tediosos, y requieren de instrumental y/o estándares de calibración que las hacen costosas, con tiempos de manipulación y análisis largos [9-14]. La espectroscopia infrarroja (IR) surge como una alternativa válida para este tipo de experimentos con resultados comparables a los obtenidos por HPLC y no requiere prácticamente de pretratamiento de muestra [8,15]. En la región del IR cada grupo funcional tiene una o más bandas de absorción características debidas a vibraciones y rotaciones de los enlaces

moleculares, de manera que el espectro en esta región puede considerarse como la “huella dactilar” de una sustancia química determinada. En numerosos estudios recientes, la técnica FTIR se ha acoplado a procedimientos quimiométricos para extraer de manera más eficientemente información de los espectros IR proporcionando métodos precisos y fiables. Las técnicas quimiométricas acopladas a espectroscopía infrarroja, cercana (NIR), con transformada de Fourier (FTIR) o empleando dispositivos de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), se han aplicado con éxito para identificar hojas de plantas [16], para estudiar la adulteración de aceite de semillas de comino [17, 18] o néctares de uva [19], para determinar el origen geográfico de las uvas Chardonnay [20], para clasificar diferentes marcas de vinos [21], para identificar genotipos de vid [22] o para identificar manzanas utilizadas en la producción de sidra [23].

1.1. Redes Neuronales Artificiales

Las Redes Neuronales Artificiales (RNAs) constituyen una poderosa herramienta de modelación, basadas en los principios de Inteligencia Artificial, adecuadas para el análisis de sistemas complejos. El reconocimiento de patrones mediante RNAs permite la clasificación y ordenación de elementos. Las RNAs están compuestas por unidades de procesamiento de datos, neuronas, interconectadas entre sí con la finalidad de recibir los datos de entrada, procesarlos y emitir nuevos datos de salida. Como se muestra en la Figura 2.a. cada conexión entre neuronas tiene un peso asociado a la información de entrada que se utilizará para la resolución del problema planteado. Esta información puede provenir del conjunto original de datos, o de la salida de otra neurona de la red. Las RNAs tienen características muy similares a las de las neuronas biológicas ya que son capaces de aprender a través de ejemplos, son adaptables y presentan tolerancia a fallos. Entre las aplicaciones más destacadas de las RNA se encuentran la clasificación de

patrones, la capacidad de agrupación por categorías y la aproximación de funciones [24].

Cada neurona funciona siguiendo un esquema como el que se muestra en la Figura 2.a, los datos de entrada ($x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n$) a la neurona j provienen de las neuronas (1, 2, ..., i , ..., n); estas entradas pueden ser datos procesados con anterioridad en otras neuronas o el conjunto de datos inicial. Los pesos ($w_{1j}, w_{2j}, \dots, w_{ij}, \dots, w_{nj}$) son factores que representan la importancia de la conexión sináptica entre las neuronas n y j , y pueden aumentar o inhibir la correspondiente conexión según sea positivo o negativo, respectivamente.

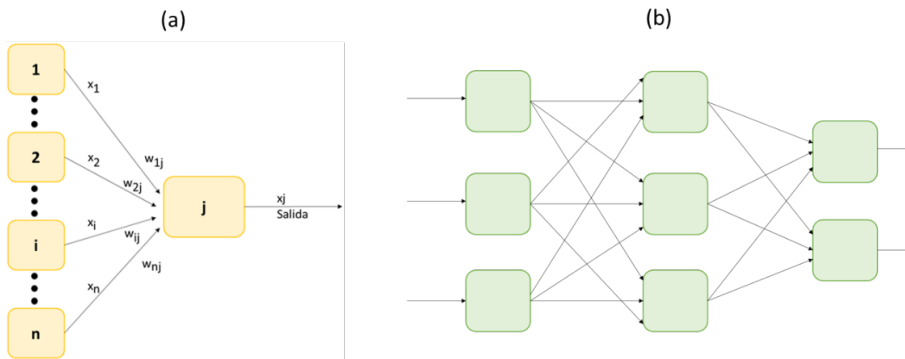


Figura 2. (a) Esquema de entradas y salidas de una neurona artificial (perceptrón); (b) Red neuronal multicapa con una sola capa oculta.

Las neuronas de una red artificial están organizadas por diferentes capas (Figura 2.b) y dependiendo de la tipología de las conexiones, las neuronas pueden ser clasificadas en Feedback (recurrentes) y Feedforward (no recurrentes). El *modelo perceptrón* y el *modelo retropropagación* son los modelos de neuronas utilizados en esta Tesis.

Existen numerosos modelos de neuronas, los primeros fueron planteados por McCulloch y Pitts, pero carecían de aprendizaje [25]. No fue hasta años después cuando se describieron algoritmos de las RNAs donde éstas

comienzan a aprender. El primer modelo de este tipo de neurona fue descrito por Frank Rosenblatt (1957), denominado perceptrón [26]. Un perceptrón está formado por varias neuronas para recibir las entradas de datos en la red y éstas conectadas a una neurona de salida (Figura 2.a). La neurona de salida es capaz de indicar cuando una de las entradas pertenece a una de las dos clases que es capaz de reconocer, como se describe en la Ecuación 1,

$$f(x) = \begin{cases} 1 & \text{si } w \cdot x - u > 0 \\ 0 & \text{en otro caso} \end{cases} \quad \text{Ecuación 1}$$

siendo w el peso, x el valor de entrada y u el umbral que representa la inhibición de la neurona. Se le pueden añadir capas ocultas a un perceptrón dando lugar a un perceptrón multicapa (Figura 2.b). Este modelo permite discriminar patrones sencillos y para patrones más complejos se puede aplicar una red de perceptrones.

El modelo de retropropagación fue descrito por David Rumelhart en 1962 y permitió que las RNA aprendieran las relaciones existentes entre los patrones de entrada y las clases de salida correspondientes [27]. Este modelo solo puede ser aplicado a modelos multicapa ya que el algoritmo permite una reorganización de las capas intermedias para conseguir una correspondencia entre las clases de entrada y salida. Por lo tanto, este modelo permite adaptar los pesos de las conexiones de las neuronas de las capas intermedias, aprendiendo la relación entre los datos de patrones aportados como ejemplos y las salidas correspondientes, como se muestra en la Figura 3. Después, estas relaciones aprendidas permiten la clasificación e identificación de patrones en valores de entrada incompletos.

Uno de los principales problemas en el tratamiento de datos es el “sobre aprendizaje”. Éste puede aparecer cuando no se disponen de los suficientes datos para poder descartar las posibles hipótesis no-válidas hasta poder quedarse con una sola hipótesis. La estrategia para evitar esta situación es contar con un conjunto de entrenamiento mayor permitiendo hacer más robusta y eficiente a la RNA. También se puede ajustar la capacidad del modelo, lo

que nos permite asegurar que la red pueda identificar los valores relevantes de los datos durante el entrenamiento. Y, por último, es preciso asumir que el “sobre aprendizaje” es inevitable e intentar remediarlo combinando múltiples modelos que compensen los errores de unos métodos con los aciertos de los otros.

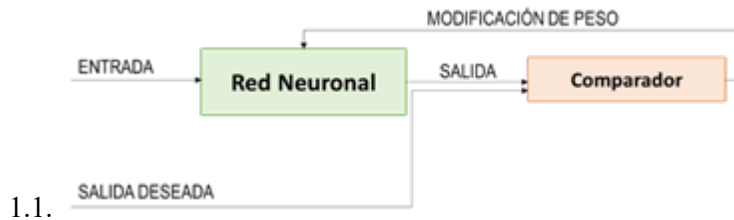


Figura 3. Esquema del modelo de retropropagación.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Plan de muestreo y medida

Para el presente estudio se emplearon muestras de uvas y hojas de cinco variedades recomendadas y autorizadas para la elaboración de vino con Denominación de Origen Protegida Cangas, del Principado de Asturias (Tabla 1). Estas variedades de vinificación fueron: Albarín Blanco (AB), Albarín Negro (AN), Carrasquín (CQ), Mencía (MN) y Verdejo Negro (VN), todas procedentes de los viñedos pertenecientes a *Bodegas Vidas* (Cangas de Narcea). Los viñedos seleccionados para el estudio, además de encontrarse dentro del área de producción establecida en la legislación para poder pertenecer a la DOP Cangas [28], están emplazados en la ladera de la montaña. La gran pendiente del terreno dificulta el mantenimiento y cultivo de las vides, pero permite conseguir una materia prima de primera calidad con

características organolépticas únicas en términos de color, aroma y sabor, aspecto limpio y con un adecuado equilibrio de alcohol/acidez. El Vino de Cangas, junto a las denominaciones de origen Ribeira Sacra y Priorat son las únicas DO de España que poseen la calificación de Viticultura de Montaña o Viticultura Heroica, otorgado por el Centro de Investigación, Estudio, Salvaguarda, Coordinación y Valorización de la Viticultura de Montaña (CERVIM) [29].

Tabla 3: Variedades de uva recomendadas y autorizadas para la elaboración "Vino de Calidad de Cangas". Las variedades utilizadas en el presente estudio aparecen en negrita con sus respectivas siglas [28].

Vino de Calidad de Cangas	
Variedades recomendadas	Variedades autorizadas
Albarín blanco (AB)	Albarín negro (AN)
Albillo	Carrasquín(CQ)
Garnacha tintorera	Godello
Mencia (MN)	Gewurztraminer
Picapoll blanco Extra	Merlot
	Pinot noir

Para poder evaluar el grado de madurez de las uvas se realizó un plan de muestreo teniendo en cuenta una fecha final estimada de vendimia, de manera que se pudiese iniciar la toma de muestra un mes antes de la recolección y tener cuatro bloques, realizando una recolección de muestras por semana. Debido a las condiciones climáticas cambiantes de la región, la maduración de las uvas se aceleró debiendo adelantarse la recolección dos semanas para las variedades AB y VN (2 bloques semanales de cada una) y una semana para el resto de las variedades (tres bloques semanales de AN, CQ y MN).

Para el estudio del hollejo se seleccionaron tres plantas de cada variedad, ubicadas en posiciones lo más distantes dentro del viñedo. En cada una de ellas, se escogieron tres racimos, recogiendo tres uvas de cada uno, totalizando 27 uvas por variedad, haciendo un total de 135 uvas por semana (ver Figura 4). Una vez recolectadas las uvas se mantuvieron en una nevera portátil durante su desplazamiento desde la zona de cultivo hasta el laboratorio donde se procedió a su medida.

Antes del análisis las uvas se lavaron minuciosamente con agua destilada y se secaron en corriente de aire. Con un bisturí se cortó una fina capa de piel, aproximadamente 1 cm^2 , y se puso su cara externa en contacto estrecho con la superficie de diamante del ATR de un espectrómetro Varian 670-IR equipado con un detector DLaTGS.

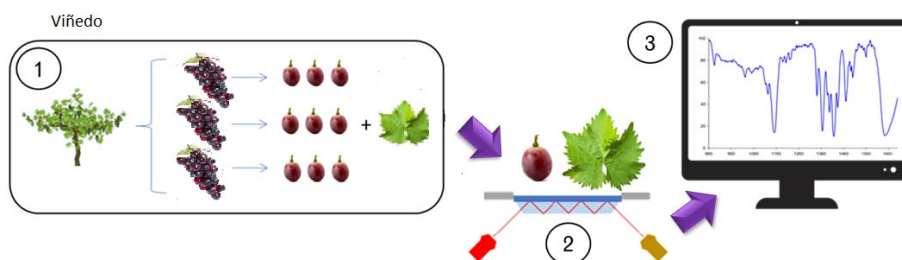


Figura 4. Esquema del protocolo seguido para la adquisición de los espectros ATR-FTIR. (1) Toma de las muestras de piel de uva y hojas. (2) Muestras puestas en contacto directo con el ATR. (3) Registro del espectro FTIR y procesamiento de los datos.

Para cada muestra de hollejo de uva se realizaron tres espectros, cambiando el área expuesta para cada uno. Cada espectro se registró en el intervalo de número de ondas desde los 600 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1}

y resultó del promedio de 16 medidas consecutivas. El número final de espectros obtenidos fue de 1053.

Para el estudio de las hojas, se recolectó 1 hoja de tres plantas distintas para cada variedad, disponiéndose de un total de 15 hojas por semana, tal como se esquematiza en la Figura 4. La reducción del número de muestras recolectadas responde al impacto negativo que puede tener sobre la estructura de la planta la extracción de un número importante de hojas. Las muestras se mantuvieron en nevera durante su desplazamiento y hasta su estudio en el laboratorio. Antes de ser medidas las muestras se lavaron con agua y se secaron en corriente de aire. Por cada muestra se realizaron tres espectros de ATR-FTIR, cambiando el área expuesta a la medida, obteniéndose finalmente un total de 135 espectros en total.

2.2. Entrenamiento de las Redes Neuronales Artificiales

Para proceder al entrenamiento de las RNA, la totalidad de los espectros obtenidos a partir de las distintas muestras fueron sometidos a un análisis adicional: se identificaron las distintas bandas de absorción y se calculó su área empleando el software del espectrómetro Varian 670-IR. Esta información fue la empleada como datos de entrada en las Redes Neuronales Artificiales (RNA) y utilizados para la identificación de las variables químicas.

Del total de espectros, el 85 % se agruparon aleatoriamente como datos de entrenamiento y el 15 % restante se emplearon como datos de ensayo. El rendimiento de las RNA se verificó mediante validación cruzada con un grupo aleatorio integrado por el 15 % de los datos empleados para el entrenamiento. La RNA utilizada es una red de dos capas con neuronas no recurrentes (*feedforward*) con un solo perceptrón de activación sigmoïdal y fue entrenada mediante un gradiente conjugado escalado de retropropagación. En el contexto de este trabajo, el grado de madurez se correlaciona con el número de semanas

transcurridas desde la primera recolección de muestras denotada como “1^{ra} semana”.

Se entrenaron cuatro redes diferentes (Tabla 2): a) dos generadas a partir de datos provenientes de los hollejos de las uvas, la primera para la clasificación varietal denominada CVU-RNA y la segunda para el grado de madurez, MU-RNA y b) dos generadas a partir de los espectros foliares, una para la clasificación varietal y otra para el grado de madurez denominadas CVH-RNA y MH-RNA, respectivamente.

Cada red consistió en una capa de entrada con cuarenta variables, una capa oculta con 10 neuronas y una capa de salida con 5 componentes para CVU-RNA y CVH-RNA y 3 componentes para MU-RNA y MH-RNA.

Tabla 2: Redes Neuronales empleadas en el estudio y su acrónimo

Tipo de muestra	Objetivo	Acrónimo	Capa de salida
Hollejo de uvas	Clasificación Varietal	CVU-RNA	5 componentes
	Madurez	MU-RNA	3 componentes
Hojas	Clasificación Varietal	CVH-RNA	5 componentes
	Madurez	MH-RNA	3 componentes

Las cuarenta variables empleadas en la entrada corresponden a sendas áreas de las distintas bandas de absorción identificadas en los espectros ATR-FTIR y numeradas del 1 al 40, conforme van disminuyendo la importancia de las mismas; es decir, de más a menos intensas. En el Anexo I.1 se relaciona la numeración con el número de onda correspondiente al máximo de absorción. Cada pico se normalizó con la función de MatLab `mapminmax`, por lo que los datos de entrada se encuentran en el intervalo $[-1, 1]$. El uso de las áreas de los picos en lugar de alturas contribuyó a minimizar el efecto del ruido en la señal y, en consecuencia, no hubo que emplear ningún protocolo adicional de

reducción de ruido en los espectros originales que podría ocasionar una sobrecarga en el sistema de cálculos.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Muestras de hollejo de uvas

3.1.1. Caracterización de las muestras por ATR-FTIR

Los espectros de ATR-FTIR proporcionan información precisa sobre los distintos grupos funcionales presentes en los componentes químicos que forman parte tanto de la piel de la uva como de las hojas.

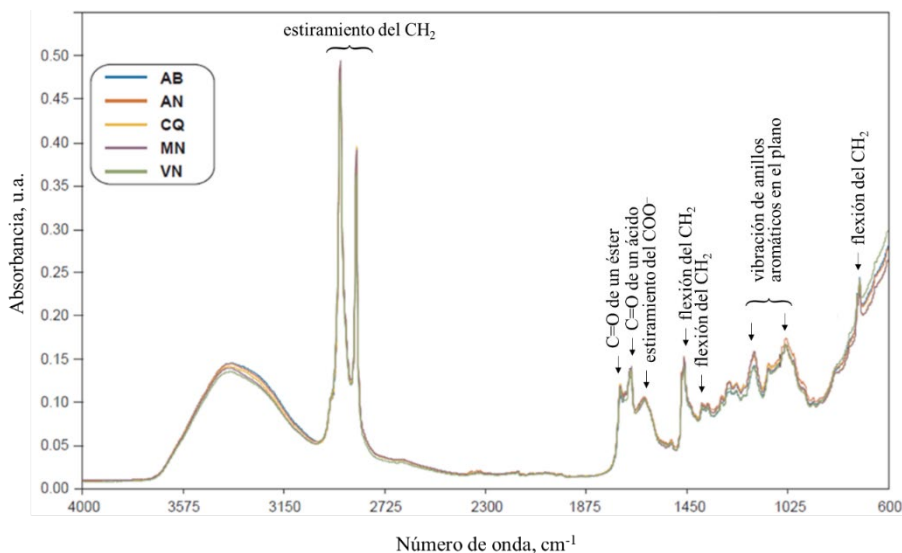


Figura 5. Media de los espectros de ATR-FTIR obtenidos para el hollejo de cada una de las cinco variedades de uva estudiadas en este trabajo: Albarín Blanco (AB), Albarín Negro (AN), Carrasquín (CQ), Mencia (MN) y Verdejo Negro (VN).

En la Figura 5 se han representado las medias de todos los espectros obtenidos para cada una de las variedades en estudio. En los espectros se puede reconocer la presencia de bandas asociadas a transiciones vibracionales debidas a: estiramiento del CH₂ a 2916 cm⁻¹ y 2849 cm⁻¹; estiramiento del C=O de un éster a 1733 cm⁻¹ y de un ácido a 1687 cm⁻¹; estiramiento del COO⁻ a 1629 cm⁻¹; flexión del CH₂ a 1470 cm⁻¹, 1386 cm⁻¹ y 761 cm⁻¹; vibración de anillos aromáticos en el plano a 1210 cm⁻¹ y fuera del plano a 825 cm⁻¹; enlaces glicosídicos C-O-C a 1060 cm⁻¹ y de flexión del C-O a 960 cm⁻¹ [30]. Se puede observar también que los espectros obtenidos para las diferentes variedades de las uvas son prácticamente indistinguibles a simple vista.

Para comprobar si los espectros son significativamente diferentes, se realizó un estudio de los coeficientes de correlación entre pares de espectros con el objeto de evaluar si la diferencia resultaba significativamente diferente de cero.

La correlación entre los espectros podría esperarse si la composición química de las pieles de las uvas utilizadas en este estudio presentase similitudes importantes. Este hecho es observable incluso para AB, que es la única uva blanca empleada y que, en principio, era de esperar que presentase mayores diferencias.

Como primer paso se calculó el coeficiente de correlación (COR) por pares, sugerido por Varmuza et al. [31], según la Ecuación 2:

$$\text{COR}_{a-b} = \frac{Z_a \cdot Z_b}{\|Z_a\| \cdot \|Z_b\|} \quad \text{Ecuación 2}$$

donde Z_a y Z_b son los espectros de absorbancia de los compuestos a y b , centrados en la media y calculados empleando la Ecuación 3:

$$\vec{Z}_a = \vec{X}_a - \vec{1} \cdot \bar{x}_a \quad \text{Ecuación 3}$$

en la que \vec{X}_a es el vector que contiene las absorbancias del compuesto a , $\vec{1}$ es el vector (1, 1, 1, ...) y \bar{x}_a el valor medio de las absorbancias del compuesto a .

Utilizando el enfoque de Li et al [32], y empleando la hipótesis nula “los espectros no están correlacionados”, esta hipótesis se descarta si el valor de la

t de Student asociado es mayor que un valor crítico, t_c , para una determinada probabilidad, p .

Tabla 3. Similitud de los espectros infrarrojos de las diferentes variedades de uva de acuerdo con los coeficientes de correlación (COR) y los valores de t de Student.

COR t	AN	CQ	MN	VN
AB	0.9973 <i>13.5841</i>	0.9984 <i>17.4448</i>	0.9983 <i>17.2682</i>	0.9959 <i>11.0407</i>
AN		0.9985 <i>18.2114</i>	0.9985 <i>18.3300</i>	0.9964 <i>11.7384</i>
CQ			0.9996 <i>35.3545</i>	0.9933 <i>8.6135</i>
MN				0.9941 <i>9.1972</i>

En la Tabla 3 se muestran en cursiva los valores t de Student asociados a cada valor de COR. El valor de t_c considerando 1765 grados de libertad, número de frecuencias medidas, y un p de 0,05 es de 1,96. En todos los casos los valores de t son mucho mayores que el valor crítico y, en consecuencia, es posible descartar la hipótesis nula de que “los espectros no están correlacionados”.

Una vez confirmado que las diferentes variedades están correlacionadas, el siguiente paso fue determinar si los espectros podrían considerarse estadísticamente indistinguible o no. Para ello, se realizó un estudio estadístico de las diferencias espectrales dentro cada posible variedad. Si dos espectros son similares, el valor medio de las diferencias de absorbancia, como se define en la Ecuación 4, debe ser 0 para una población normal.

$$\text{Dif}_{a-b} = \overline{(\vec{a} - \vec{b})} \qquad \text{Ecuación 4}$$

Sin embargo, se observó que las diferencias espectrales no siguieron una distribución normal y según la prueba de Kolmogorov-Smirnov la t de Student no era aplicable [33]. Por esta razón se decidió aplicar la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon [34] para comprobar si la diferencia para todos los pares de variedades posibles, evitando las autocomparaciones, se correspondía al valor de 0. Para cada combinación posible el valor de p resultó ser menor de 10^{-5} , excepto para el par MN-VN, con un valor de p igual a 0,476. Esto significa que, a pesar de la similitud visual, las diferencias espectrales de cada par de variedades tenían una mediana significativamente diferente de cero, con la excepción del par MN-VN.

3.1.2. Entrenamiento y aplicación de RNA

Si se tiene en cuenta la correlación entre espectros y las diferencias significativamente distintas de cero entre ellos, es de esperar obtener buenos resultados al aplicar las Redes Neuronales Artificiales para diferenciar entre las variedades de uvas estudiadas, CVU-RNA. Siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.2., se entrenaron cuatro diferentes redes, una para cada estado de madurez de las muestras correspondientes a la 1^{ra}, 2^{da} o 3^{ra} semana, y se ensayó finalmente una cuarta que agrupaba todos los datos, independientemente del momento de recolección. Los resultados obtenidos aplicando la CVU-RNA se encuentran recogidos en la Tabla 4 donde se tabulan los porcentajes de uvas clasificadas correctamente, *aciertos*, y los porcentajes de uvas clasificadas en una variedad a la que realmente pertenece que es equivalente al 100 % (menos el porcentaje de falsos positivos), *fiabilidad*, para la clasificación del conjunto de datos de prueba en tres etapas diferentes de maduración. Como ya se ha mencionado, la falta de datos correspondientes a la tercera semana para las uvas AB o VN se debió a una vendimia temprana de las mismas.

La curva de ROC, acrónimo de *Receiver Operating Characteristics*, es la representación de la proporción de verdaderos positivos frente a la proporción

de falsos positivos según se varía el umbral de discriminación; es decir, el valor a partir del cual se decide que es positivo [35]. En la Tabla 4 también se muestran los datos correspondientes al área bajo la curva de ROC (AUC, *Area Under the Curve*) y las gráficas para cada uno de ellos se muestran en el Anexo I.2.a. En general, ROC es la curva de probabilidad y AUC representa el grado de separación, la capacidad del modelo para distinguir entre clases. Así, pues un AUC entre 0,7 y 0,8 se considera aceptable, entre 0,8 y 0,9 muy bueno y mayor de 0,9 excelente [36].

Tabla 4: Resultados de la clasificación del conjunto de datos de entrenamiento para cada variedad en diferentes estados de madurez. Los aciertos representan el porcentaje de uvas clasificadas correctamente y la fiabilidad el porcentaje de uvas clasificadas en la clase que realmente le pertenece.

CVU-RNA		AB	AN	CQ	MN	VN	Media
		%	%	%	%	%	%
1 ^{ra} semana	Aciertos	76,9	100,0	100,0	91,7	84,6	90,6
	Fiabilidad	83,3	90,9	86,7	91,7	100,0	90,5
	AUC	0,9979	0,9980	0,9917	0,9993	0,9994	
2 ^{da} semana	Aciertos	100,0	77,8	75,0	85,7	100,0	87,7
	Fiabilidad	94,4	63,6	90,0	92,3	100,0	88,1
	AUC	0,9997	0,9625	0,9739	0,9690	0,9997	
3 ^{ra} semana	Aciertos	---	92,9	100,0	92,9	---	95,2
	Fiabilidad	---	100,0	80,0	100,0	---	93,3
	AUC	---	0,9816	0,9798	0,9840	---	
Todo el conjunto	Aciertos	95,5	70,3	81,0	77,4	92,3	83,3
	Fiabilidad	87,5	81,3	81,0	66,7	100,0	83,3
	AUC	0,9981	0,9585	0,9456	0,9591	0,9971	

En todos los casos, el valor AUC fue superior a 0,94, lo que indica un buen desempeño de la CVU-RNA en la clasificación varietal. El porcentaje medio de aciertos en las distintas semanas fue del 90,6%, 87,7% y 95,2%. Cabe señalar que se observó una disminución del rendimiento global de la red

cuando no se tuvo en cuenta el grado de madurez de la uva; es decir, sin agruparlas por semanas, con un promedio del 83,3% de coincidencias. Para identificar el origen de esta disminución, se entrenó una segunda red neuronal artificial, MU-RNA para evaluar el grado de madurez independientemente de la variedad de uva, cuyos resultados se resumen en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Resultados de la clasificación del conjunto de datos de entrenamiento sin tener en cuenta las variedades.

MU-RNA		1 ^{ra} semana %	2 ^{da} semana %	3 ^{ra} semana %
Entrenamiento	Aciertos	93,8	88,4	80,7
	Fiabilidad	94,1	84,7	86,3
Validación	Aciertos	88,7	83,1	80,0
	Fiabilidad	85,5	83,1	84,2

Tabla 6. Aciertos y fiabilidad en la identificación del grado de madurez sin tener en cuenta las variedades.

MU-RNA		1 ^{ra} semana %	2 ^{da} semana %	3 ^{ra} semana %
Mezcla de variedades	Aciertos	88,7	83,1	80,0
	Fiabilidad	85,5	83,1	84,2
	AUC	0,9844	0,9562	0,9758

Las tasas generales de éxito obtenidas en la clasificación de uvas discriminando por semanas presentaron una media del 91,2 % o del 83,3% sin tener en cuenta el factor madurez (Tabla 4), y una tasa de éxito del 83,9 % para identificar el grado de madurez (Tabla 6, Anexo I.3.a). Estos valores son mejores que las tasas de éxito reportadas por Gambetta et al. [20] para identificar el origen geográfico de las uvas Chardonnay que se encuentran el

intervalo del 81-83%. Los autores Arana [37] y Cozzolino [38] han publicado también sendos trabajos con tasas de éxito del 97,2% y 86 %, respectivamente, aunque estos valores no son directamente comparables con los resultados reportados en esta Tesis ya que la clasificación realizada por dichos autores se llevó a cabo para dos variedades, Viura y Chardonnay en el primer caso y Chardonnay y Riesling en el segundo, en lugar de cinco como en el presente trabajo. La menor tasa de éxito del trabajo de Cozzolino podría atribuirse al empleo de jugo de uvas en lugar de la piel.

La mayor tasa de éxito de las Redes Neuronales CVU-RNA frente a las MU-RNA sugiere una mayor dependencia de los espectros de ATR-FTIR con la variedad de uva, más que de los cambios químicos asociados a los procesos de maduración que pudieran producirse en el hollejo durante el corto periodo de tiempo de tres semanas antes de la vendimia. Por otra parte, para los ensayos con las redes CVU-RNA y MU-RNA se emplearon las cuarenta variables obtenidas para cada espectro, pudiendo existir la posibilidad de enmascaramiento de las variables con mayor influencia en el grado de madurez sobre aquellas relacionadas con la clasificación varietal y viceversa.

3.1.3. Determinación de las variables experimentales con mayor peso en las RNA

Se han descrito diferentes algoritmos con el propósito de determinar que variables experimentales ejercen mayor influencia en las capacidades discriminatoria de las Redes Neuronales Artificiales. El Algoritmo de Peso de Conexión propuesto por Olden et al. [39], es uno de los más precisos. Este algoritmo calcula la importancia de la variable como el producto de los pesos sin procesar de las conexiones de las neuronas de entrada y salida ocultas entre cada neurona de entrada y salida, a lo que suma el producto entre todas las neuronas ocultas. Las ventajas de este enfoque son, por una parte, que la contribución relativa del peso de cada conexión se mantiene en términos de magnitud y signo y, por otra, que es capaz de evaluar redes neuronales con

múltiples capas ocultas. Los valores relativos de importancia obtenidos para las variables experimentales deben interpretarse en función de su signo y magnitud entre las propias variables y no deben realizarse comparaciones entre diferentes modelos.

En el presente trabajo el Algoritmo de Peso de Conexión se implementó de forma independiente para cada neurona de salida, es decir, para cada variedad de uva (Los cálculos se realizaron empleando con el programa Matlab R2020a).

La Tabla 7 recoge las cinco variables experimentales más influyentes en el análisis por CVU-RNA para cada variedad, indicando el número que se ha asignado a la banda de absorción del espectro de ART-FTIR (ver sección 3.2) y ordenadas según el número de veces que aparece al emplear la red neuronal. En negrita se han destacado aquellas que han sido seleccionadas por ser las que más representación porcentual tienen, y que se resumen en la columna indicada como “Total” donde, entre paréntesis, se indica el porcentaje de aparición. Por ejemplo, la variable **#35**, asociada con el área de la banda de ART-FTIR con máximo a 825 cm^{-1} , es una de las variables experimentales más influyentes durante la primera semana de maduración en las variedades AB, MN y VN, apareciendo en la tercera, quinta y segunda posición, respectivamente. Al encontrarse 3 veces dentro de las cinco primeras de las 25 variables experimentales recogidas para todas las variedades durante la primera semana, representa el 12 % del total.

Como se puede apreciar en los análisis de las tres CVU-RNA entrenadas con las variables teniendo en cuenta el grado de madurez las variables críticas resultaron ser las **#35**, **#33**, **#27**, **#24**, **#16**, **#5** y **#3** mientras que en el caso de las CVU-RNA_G entrenada con todas las muestras de hollejo uva independientemente del grado de madurez las variables identificadas fueron las **#35**, **#3**, **#36**, **#33**, **#5** y **#2**. Las variables **#35**, **#33**, **#5** y **#3** son comunes en ambas listas, lo que sugiere que son las que tienen el mayor peso en la identificación varietal.

Tabla 7. Variables experimentales más influyentes en CVU-RNA. Las variables están ordenadas conforme al número de apariciones en la RNA. En negrita se indican las variables seleccionadas.

RED		Variables más influyentes						Total
		Variable, #						
CVU-RNA 1 ^{ra} semana	AB	33	4	35	14	7	#35, #27	
	AN	6	33	16	24	30	(12% c/u)	
	CQ	5	23	12	3	27	#33, #23, #16,	
	MN	6	27	18	16	35	#6, #5, #3	
	VN	27	35	5	23	3	(8% c/u)	
CVU-RNA 2 ^{da} semana	AB	3	36	4	14	33	#35	
	AN	29	24	36	16	40	(12%)	
	CQ	35	24	3	5	38		
	MN	35	26	17	4	12	#36, #24, #4, #3	
	VN	35	28	2	32	9	(8% c/u)	
CVU-RNA 3 ^{ra} semana	AN	33	27	25	24	36	#33, #27, #25	
	CQ	33	16	5	27	25	(13.3% c/u)	
	MN	7	40	11	32	28		
# SELECCIONADAS		35 (9,2%), 33 y 27 (7,7% c/u), 24, 16, 5 y 3 (6,2% c/u)						
CU-RNA _G Todo el conjunto	AB	3	36	4	33	17	#35, #3	
	AN	33	2	35	16	36	(12%)	
	CQ	3	11	5	26	18	#36, #33, #5, #2	
	MN	6	3	12	35	13	(8%)	
	VN	35	28	2	5	29		
# SELECCIONADAS		35 y 3 (12%), 36, 33, 5 y 2 (8%)						
SELECCION GLOBAL		#35 (9%), #33 y #3 (7.8% c/u), #5 (6.7%), #36, #27 y #16 (5.6% c/u)						

Del mismo modo, en la Tabla 8 se encuentran recogidas las cinco variables experimentales más influyentes tras la aplicación del algoritmo de Olden en el análisis por MU-RNA para cada semana independiente de la clasificación varietal, siendo las variables **#6**, **#30**, **#19** y **#9** las que presentan una mayor influencia en relación con la madurez de las uvas.

Tabla 8. Variables experimentales más influyentes en MU-RNA. Las variables están ordenadas conforme al número de apariciones en la RNA. En negrita se indican las variables seleccionadas.

RED		Variables más influyentes					Total
		Variable, #					
MU-RNA	1 ^{ra} semana	6	30	3	19	7	# 6 (20%)
	2 ^{da} semana	6	11	1	9	19	# 30 , # 19 , # 9
	3 ^{ra} semana	6	30	9	27	31	(13.3%)
# SELECCION GLOBAL		# 6 (20 %), # 30 , # 19 y # 9 (13,3 % c/u)					

Una vez establecido el conjunto de variables experimentales se procedió a asignar las bandas a grupos funcionales asociados a compuesto o estructuras típicas presentes en el hollejo de las uvas, información que se resume en la Tabla 9 [21,40-43].

El máximo de la banda de IR situado en 1210 cm^{-1} , correspondiente a la variable #**16**, no fue fácil de asignar. Analizando los espectros FTIR accesibles desde la base de datos SDBS para compuestos orgánicos [41], la pectina de manzana exhibe una absorción intensa en 1250 cm^{-1} y la pectina cítrica a 1210 cm^{-1} , por tanto, es posible que dicha banda se deba a la absorción de la pectina presente en el hollejo de las uvas, aunque otros autores han asignado esta banda a los compuestos fenólicos [38]. El máximo de la banda de IR situado 761 cm^{-1} , correspondiente a la variable #**27**, también tendría una asignación dual según la bibliografía ya que se encuentra en la zona del espectro correspondiente a la vibración de balanceo δ del CH_2 debido a la cutina y las ceras [4342], aunque también se puede asignar al agua [38].

La fructosa, con un pico de absorción a 1070 cm^{-1} , se ha descrito como el compuesto que más contribuye a la identificación del origen geográfico de las uvas Chardonnay [20], mientras que la fructosa junto con el agua, a 780 cm^{-1} , y los compuestos fenólicos a 1256 cm^{-1} , también juegan un papel importante

en la identificación entre las variedades de uvas Chardonnay y Riesling [38]. Estos números de onda son consistentes con las variables que se muestran en la Tabla 9. Por lo tanto, parece claro que de los datos analizados en el presente trabajo las bandas de absorción asociadas con la pectina, variables experimentales #3, #6, #16, #33 y #35, tienen una fuerte influencia tanto en la identificación varietal como en el grado de madurez mientras que los polifenoles y el azúcar (fructosa), están más estrechamente relacionados con el grado de madurez, como ya se ha descrito.

Tabla 9. Asignación de variables experimentales con mayor influencia en la clasificación de compuestos presentes en el hollejo de las uvas [21,43, 44]

Variable #	Asociada a	Número de onda	Compuesto
#3	Variedad	1733 cm ⁻¹	Poliésteres, pectina y cutina
#5	Variedad	1687 cm ⁻¹	Ácidos hidroxycinámicos
#6	Madurez	1629 cm ⁻¹	Pectina
#9	Madurez	1386 cm ⁻¹	Celulosa, xiloglucano
#16	Variedad	1210 cm ⁻¹	Posiblemente pectina o compuestos fenólicos
#19	Madurez	1063 cm ⁻¹	Fructosa
#27	Variedad	761 cm ⁻¹	Probable cutina y ceras Posible agua
#30	Madurez	1470 cm ⁻¹	Ceras, cutina y lípidos
#33	Variedad	1417 cm ⁻¹	Carboxilatos (grupo éster de pectina)
#35	Variedad	825 cm ⁻¹	Pectina
#36	Variedad	1433 cm ⁻¹	Celulosa

Una vez identificadas las variables más representativas, la red fue entrenada nuevamente utilizando solo estas variables, #35, #33, #3, #5, #36, #27 y #16 para CVU-RNA y #6, #30, #19 y #9 para MU-RNA, pero los resultados

obtenidos fueron menos satisfactorios. Para la CVU-RNA la mejor tasa de acierto fue del 74,4 %, y la mejor fiabilidad del 79,2%. En cuanto a la MU-RNA la mejor tasa de coincidencia fue del 82,5% situándose la fiabilidad por debajo del 64,4%. Esta notable disminución en la capacidad de clasificación de la red se debe fundamentalmente a la drástica reducción del número de datos, a pesar de haberse empleado las variables más representativas. Esto indica que aquellas variables menos significativas contienen todavía información de relevancia para asegurar la calidad de los resultados.

3.1.4. Matrices de confusión

Una vez encontradas las variables más representativas involucradas en la clasificación, se procedió a elaborar e interpretar las matrices de confusión de las redes CVU-RNA y MU-RNA (Anexo I. 2-7.b). Una matriz de confusión constituye una herramienta fundamental que permite evaluar el funcionamiento de clasificación de la RNA, basada en los aciertos y errores conseguidos para cada una de las clases a clasificar; es decir, permite visualizar si el algoritmo no está clasificando correctamente las clases y en qué medida. Las matrices de confusión fueron preparadas utilizando todos los datos de entrenamiento, validación y ensayo y se muestran en las Figuras 6 y 7.

		Datos de entrada					Fiabilidad
		AB	AN	CQ	MN	VN	%
Datos de salida	AB	156	2	1	4	2	94,5
	AN	0	187	23	12	2	83,5
	CQ	3	21	190	20	1	80,9
	MN	2	32	26	207	0	77,5
	VN	1	0	3	0	157	97,5
Aciertos, %		96,3	77,3	78,2	85,2	96,9	85,3

Figura 6. Matriz de confusión para CVU-RNA.

En la diagonal de la matriz se representa el número de predicciones correctas, destacadas en color verde. El resto de las posiciones indican el número de predicción incorrectas, errores de confusión, donde la fila (salida) indica la variedad en la que la red clasifica y la columna (entrada) la variedad real a la que pertenece. En este caso se ha utilizado una escala monocromática en rojo para denotar aquellas clasificaciones en la que la red presenta mayor confusión (a mayor intensidad mayor grado de confusión).

Tabla 10. Variables experimentales compartidas entre las diferentes variedades

Variedad	Compartidas	Detalles
AB	3 variables con 3 variedades	AN (#33 y #36), CQ (#3), MN (#3)
AN	4 variables con 3 variedades	AB (#33 y #36), MN (#35), VN (#2 y #35)
CQ	2 variables con 3 variedades	AB (#3), MN (#3) y VN (#5)
MN	2 variables con 4 variedades	AB (#3), AN (#35), CQ (#3) y VN (#35)
VN	3 variables con 3 variedades	AN (#2 and #35), CQ (#5) y MN (#35)

La matriz de confusión para la CVU-RNA (Figura 6) muestra que los errores más significativos se produjeron para las variedades AN, CQ y MN que son mal clasificadas con mucha más frecuencia que las variedades VN y AB. Es importante destacar que AN es la variedad que presentó una identificación más deficiente, con el número de aciertos más bajos (187 correctos de 242 ensayados), y MN fue la variedad que fue elegida el mayor número de veces de manera errónea (60 incorrectos 267 ensayados); esto es, con la fiabilidad

más baja. Estos resultados se pueden explicar si se considera que según la Tabla 10: a) la variedad AN es la que comparte más variables experimentales (cuatro) con las otras tipologías de uva y b) la variedad MN es la única que posee al menos una variable común con todas las otras variedades.

Con respecto a la matriz de confusión para MU-RNA (Figura 7), se puede observar que todas las semanas consecutivas se confunden entre sí en un grado similar, obteniéndose un bajo número de errores entre la primera y la tercera semana. Esto puede explicarse fácilmente observando en la Tabla 8 que cada variedad comparte entre sí solo dos variables: la 1^{ra} y la 2^{da} semana comparten las variables #6 y #19, y la 2^{da} y la 3^{ra} semana la #6 y #9 y la 1^{ra} y 3^{ra} semana comparten las variables #6 y #30. Sin embargo, como se muestra en la misma Tabla, las variables #6 y #30 son las dos con más peso en sus respectivas semanas.

		Datos de entrada			Fiabilidad
		1 ^{ra} semana	2 ^{da} semana	3 ^{ra} semana	%
Datos de salida	1 ^{ra} semana	376	26	6	92,2
	2 ^{da} semana	23	354	41	84,7
	3 ^{ra} semana	6	25	195	86,3
Aciertos, %		92,8	87,4	80,6	87,9

Figura 7. Matriz de confusión para MU-RNA.

3.2. Muestras de hojas de vid

Para evaluar la posibilidad de obtener información complementaria a la obtenida a partir del hollejo de la uva se decidió emplear las mismas redes

neuronales utilizando los espectros ATR-FTIR de otro futuro componente del bagazo como son las hojas.

3.2.1. Caracterización de las muestras por ATR-FTIR

Los espectros infrarrojos de las hojas de los cinco tipos de vides en estudio se muestran en la Figura 8. De manera similar, al análisis estadístico realizado para los espectros ATR-FTIR del hollejo de las uvas, los espectros de las hojas mostraron un alto grado de correlación. Como se detalla en la Tabla 11 los valores de t de Student están todos por encima del valor crítico de 1,96 para un p de 0,05 lo que permite descartar la hipótesis nula de no estar correlacionados.

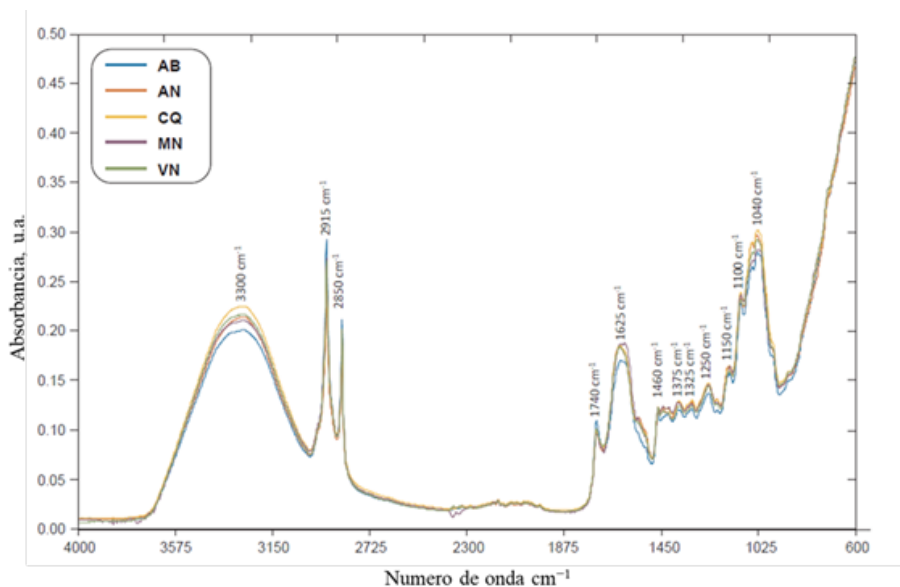


Figura 8. Media de los espectros de ATR-FTIR obtenidos para las hojas de cada una de las cinco variedades estudiadas en este trabajo: Albarín Blanco (AB), Albarín Negro (AN), Carrasquín (CQ), Mencía (MN) y Verdejo Negro (VN).

La diferencia entre los posibles pares de espectros medios, considerando las cinco variedades, condujo nuevamente a distribuciones anormales de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, por lo que se realizó una prueba de Wilcoxon Signed Rank. La mayoría de las combinaciones posibles mostraron un valor de p por debajo de 10^{-3} con excepción de los pares AN-VN, CQ-VN y MN-VN con valores de p de 0,0569, 0,7033 y 0,1400, respectivamente. Estos valores de p mayores que el p_c de 0,05 indican que para estos pares los espectros pueden considerarse similares sin una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 11. Similitud entre los espectros de ATR-FTIR de las hojas de las diferentes variedades de uva de acuerdo con los coeficientes (COR) y el valor de la t de Student.

COR (t)	AN _{hoja}	CQ _{hoja}	MN _{hoja}	VN _{hoja}
AB _{hoja}	0.9970 12.8809	0.9974 13.8404	0.9990 22.3439	0.9989 21.3025
AN _{hoja}		0.9995 31.6109	0.9984 17.6564	0.9990 22.3439
CQ _{hoja}			0.9987 19.5925	0.9994 28.8545
MN _{hoja}				0.9994 28.8545

3.2.2. Entrenamiento y aplicación de RNA

En las Tablas 12 y 13 se recogen los resultados de los *aciertos*, porcentajes de hojas correctamente clasificadas, y la *fiabilidad*, porcentaje de hojas clasificado en una variedad y que realmente pertenecen a esa variedad, para el entrenamiento y la aplicación de la red neuronal CVH-RNA utilizada para la

clasificación varietal del conjunto de datos sin considerar el grado de madurez, así como el área bajo la curva ROC (Anexo I.9).

Tabla 12. Resultados de las clasificaciones para el entrenamiento de CV-RNA sin distinción varietal.

	CVH-RNA	AB	AN	CQ	MN	VN
Hojas	Aciertos, %	50,0	75,0	41,7	50,0	40,0
	Fiabilidad, %	25,0	54,5	44,5	66,7	66,7
	AUC	0,8677	0,8588	0,8198	0,9021	0,7875

A pesar de que los valores de AUC obtenidos pueden considerarse aceptables (entre 0,7 y 0,8) o muy buenos (0,8 y 0,9) [36] está claro que los porcentajes de aciertos y fiabilidades son deficientes y muy distantes de aquellos obtenidos para los estudios realizados sobre los hollejos. Esta baja calidad en la clasificación también se observa al emplear la red para la validación y los ensayos (Tabla 13) y puede tener su origen en la baja diferenciación de los espectros en estudio, donde el 30 % de los pares de espectros que se compararon no presentaban diferencias estadísticas significativas.

Finalmente se entrenó una nueva red, MH-RNA, con los datos de ATR-FTIR obtenidos de las hojas recogidas en las distintas semanas para evaluar la posibilidad de que los cambios producidos durante ese período de tiempo fuesen lo suficientemente relevantes para correlacionarlos con el grado de madurez de la uva. Los resultados obtenidos para el entrenamiento, validación y ensayos se han resumido en las Tablas 14 y 15 (Anexo I.10).

Tabla 13. Aciertos y fiabilidad en la clasificación varietal sin tener en cuenta el grado de madurez.

CVH-RNA		AB	AN	CQ	MN	VN
Entrenamiento	Acertos, %	70,8	54,1	59,2	54,7	33,3
	Fiabilidad, %	57,1	51,1	73,6	45,4	48,7
Validación	Acertos, %	64,0	58,3	48,4	71,8	44,4
	Fiabilidad, %	64,0	52,5	71,4	59,6	48,0
Ensayos	Acertos, %	70,8	52,9	57,6	74,4	54,2
	Fiabilidad, %	60,7	51,4	79,2	60,4	72,2

Tabla 14. Resultados del entrenamiento de la red MH-RNA para la identificación del grado de madurez sin distinción varietal.

MH-ANN		1 ^{ra} semana	2 ^{da} semana	3 ^{ra} semana
Hojas	Acertos, %	80,0	54,4	22,2
	Fiabilidad, %	63,2	42,9	100,0
AUC		0,8891	0,7955	0,8510

Tabla 15. Resultado de la identificación de la madurez de las uvas con MH-RNA independientemente de la variedad de vid.

HR-RNA		1 ^{ra} semana	2 ^{da} semana	3 ^{ra} semana
Entrenamiento	Acertos, %	75,8	70,3	18,6
	Fiabilidad, %	68,8	55,1	48,5
Validación	Acertos, %	71,4	69,8	21,9
	Fiabilidad, %	66,2	56,4	58,3
Ensayos	Acertos, %	82,5	71,4	15,8
	Fiabilidad, %	64,4	60,8	54,5

Nuevamente la red muestra una baja capacidad para la identificación del grado de madurez independientemente de la clasificación varietal.

Los bajos resultados alcanzados con ambas redes cuando se emplean espectros ATR-FTIR obtenidos de las hojas de la vid, sobre todo comparados con la buena capacidad demostrada por las redes CVU-RNA y MU-RNA entrenadas a partir de los espectros del hollejo de la uva, demuestran que su empleo no es una vía adecuada de clasificación varietal o para un seguimiento del grado de madurez de las uvas.

4 CONCLUSIONES

Pese a la similitud estadística de los espectros de ATR-FTIR, de los hollejos de las uvas de distintas variedades y con distinto grado de madurez, estos poseen suficiente información para permitir a las Redes Neuronales Artificiales la identificación de las diferentes clases de uvas utilizadas en este estudio. En particular, las RNA resultaron ser una opción válida para la identificación de las variedades de uva utilizadas en la producción del vino DPO Vino de Calidad de Cangas, así como para la clasificación de las muestras en función de la semana en que fueron recogidas.

El empleo del algoritmo de los pesos de conexión de Olden ha permitido identificar las longitudes de ondas y los compuestos químicos que más influyen en la clasificación, indicando que la pectina es importante para la identificación varietal y el grado madurez de las muestras, mientras que la fructosa juega un papel importante en la identificación del grado de madurez. Los polifenoles por otra parte estarían relacionados con la clasificación varietal indicando que la presencia y calidad de los antioxidantes presentes en el hollejo dependerá marcadamente del tipo de uva empleada para la producción del vino.

Los estudios paralelos realizados con las hojas de la vid no dieron resultados relevantes, debido al hecho de que la composición química de las

hojas estudiadas no cambia lo suficiente durante el tiempo elegido para la recogida de las muestras y, por tanto, no presentan diferencias significativas entre las variedades.

Es de destacar que la metodología desarrollada a partir de espectros ATR-FTIR acoplado a herramientas quimiométricas permite la identificación coherente de variedades de uva utilizadas para la elaboración del DOP Vino de calidad de Cangas, ofreciendo un mecanismo para el control de la producción de estos vinos que debe realizarse exclusivamente con las variedades de uvas admitidas y/o autorizadas según se indica en la legislación [28], evitando de esta manera posibles fraudes. Por otra parte, si bien el presente estudio se hizo con un equipo FTIR estándar de laboratorio existen en el mercado equipos portátiles que permitirían las medidas “in situ” sin afectar las vides ni la producción.

5 BIBLIOGRAFÍA

[1] https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/mercados_agricolas_ganaderos.aspx. Último acceso 11 de mayo 2021

[2] J. Yu, J., M. Ahmedna. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications; *International Journal of Food Science & Technology*, 2012 **48(2)**, 221-237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>

[3] Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Editado por Alan Crozier, Mike N. Clifford, Hiroshi Ashihara, Blackwell Publishing, 2006.

[4] V.L. Singleton, P. Essau. Phenolic Substances in Grapes and Wine, and Their Significance, *Advances in Food Research*, 1969, 159-166, <https://ci.nii.ac.jp/naid/10029398236/en/>

[5] R. Rodríguez-Montealegre, R. Romero-Peces, J.L. Chacón-Vozmediano, J. Martínez-Gascuña, E. García-Romero. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Compos. Anal.* 2006, **19**, 687–693. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.05.003>.

[6] F. Brossaud, V. Cheynier, C. Asselin, M. Moutounet, Flavonoid Compositional Differences of Grapes Among Site Test Plantings of Cabernet franc, *American Journal of Enology and Viticulture*, 1999, **50 (3)**, 277-284. <https://www.ajevonline.org/content/50/3/277>

[7] M. Szymanska-Chargot, A. Zdunek, A., 2013. Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables

along a fraction process. *Food Biophys.* 2013, **8**, 29–42. <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9279-7>.

[8] X. Liu, C.M.G.C. Renard, S. Bureau, C. Le Bourvellec. Revisiting the contribution of ATR-FTIR spectroscopy to characterize plant cell wall polysaccharides, *Carbohydrate Polymers*, 2021, **262**, 117935. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117935>.

[9] E.C. Scutarașu, C.E. Luchian, L. Vlase, L.C. Colibaba, A.M. Gheldiu, V.V. Cotea. Evolution of phenolic profile of white wines treated with enzymes, *Food Chemistry*, 2021, **340**, 12791. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127910>.

[10] R.C. Colombo, S.R. Roberto, M.A. da Cruz, D.U. de Carvalho, L.Y. Yamamoto, S.L. Nixdorf, J. Pérez-Navarro, S. Gómez-Alonso, M. Shahab, S. Ahmed, L.S. Azeredo Gonçalves, R.T. de Souza, I. Hermosín-Gutiérrez. Characterization of the phenolic ripening development of ‘BRS Vitoria’ seedless table grapes using HPLC–DAD–ESI-MS/MS, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2021, **95**, 103693. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103693>.

[11] J. Valls, S. Millán, M.P. Martí, E. Borràs, L. Arola. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols, *Journal of Chromatography A*, 2009, **1216** (43), 7143–7172. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.030>.

[12] R. Ragone, S. Todisco, M. Triggiani, S. Pontrelli, M. Latronico, P. Mastrorilli, N. Intini, C. Ferroni, B. Musio, V. Gallo. Development of a food class-discrimination system by non-targeted NMR analyses using different magnetic field strengths, *Food Chemistry*, 2020, **332**, 127339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127339>.

[13] B. Musio, R. Ragone, S. Todisco, A. Rizzuti, M. Latronico y col.. A community-built calibration system: The case study of quantification of metabolites in grape juice by qNMR spectroscopy, *Talanta*, 2020, **214**, 120855. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120855>.

[14] Hong-Seok Son, Geum-Sook Hwang, Hyuk-Jin Ahn, Won-Mok Park, Cherl-Ho Lee, Young-Shick Hong, Characterization of wines from grape varieties through multivariate statistical analysis of ¹H NMR spectroscopic data, *Food Research International*, 2009, **42** (10), 1483-1491, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.08.006>.

[15] R. Jamwal, A.S. Kumari, B. Balan, S. Kelly, A. Cannavan, D. Singh. Rapid and non-destructive approach for the detection of fried mustard oil adulteration in pure mustard oil via ATR-FTIR spectroscopy-chemometrics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, **244**, 118822. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118822>.

[16] B.R. Da Luz. Attenuated total reflectance spectroscopy of plant leaves: a tool for ecological and botanical studies. *New Phytol.* 2006, **172**, 305–318. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01823.x>.

[17] F.N. Arslan, G. Akin, S.N.K. Elmas, I. Yilmaz, H.G. Janssen, A. Kenar. Rapid detection of authenticity and adulteration of cold pressed black cumin seed oil: a comparative study of ATR-FTIR spectroscopy and synchronous fluorescence with multivariate data analysis. *Food Control* 2019, **98**, 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.055>.

[18] R. Jamwal, Amit, S. Kumari, S. Sharma, S. Kelly, A. Cannavan, D.K. Singh. Recent trends in the use of FTIR spectroscopy integrated with chemometrics for the detection of edible oil adulteration, *Vibrational Spectroscopy*, 2021, **113**, 103222. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2021.103222>.

[19] C.S.W. Miaw, M.M. Sena, S.V.C. De Souza, M.P. Callao, I. Ruisánchez, I., 2018. Detection of adulterants in grape nectars by attenuated total reflectance Fourier-transform midinfrared spectroscopy and multivariate classification strategies. *Food Chem.* 2018, **266**, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.006>.

[20] J.M. Gambetta, D. Cozzolino, S.E.P. Bastian, D.W. Jeffery. Classification of chardonnay grapes according to geographical indication and quality grade using attenuated total reflectance mid-infrared spectroscopy.

Food Anal. Methods, 2019, **12** (1), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1355-2>.

[21] K. Kumar, A. Giehl, C.D. Patz. Chemometric assisted Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic analysis of fruit wine samples: optimizing the initialization and convergence criteria in the non-negative factor analysis algorithm for developing a robust classification model. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2019, **209**, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.10.024>.

[22] Á. Álvarez, J. Yáñez, Y. Neira, R. Castillo-Felices, P. Hinrichsen, Simple distinction of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genotypes by direct ATR-FTIR, *Food Chemistry*, 2020, **328**, 127164. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127164>.

[23] A. Fernández-González, J.M. Montejo-Bernardo, H. Rodríguez-Prieto, Z. Castaño-Monllor, R. Badía-Laiño, M.E. Díaz-García. Easy-to-use analytical approach based on ATR–FTIR and chemometrics to identify apple varieties under Protected Designation of Origin (PDO). *Comput. Electron. Agric.* 2014, **108**, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2014.07.009>

[24] S.C. Wang. Chapter 5: Artificial Neural Network. In: *Interdisciplinary Computing in Java Programming*. The Springer International Series in Engineering and Computer Science, 2003, Vol 743. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0377-4_5

[25] W.S. McCulloch, W. Pitts. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bulletin of Mathematical Biophysics* 1943, **5**, 115–133. <https://doi.org/10.1007/BF02478259>

[26] F. Rosenblatt. Perceptron Simulation Experiments, *Proceedings of the IRE*, 1960, **48** (3), 301-309. <https://doi.org/10.1109/JRPROC.1960.287598>.

[27] D.S. Rumelhart, R. Durbin, R. Golden, Y. Chauvin. Chapter 1: Backpropagation: The Basic theory. In *Backpropagation: Theory, Architecture, and Applications*. Hillsdale: N.J. Laurence Erlbaum, 1995, 1-34.

[28] Boletín Oficial del Principado de Asturias, BOPA, N° 287 del viernes 12 de diciembre de 2008

[29] <http://www.cervim.org/es/viticultura-monta-a-forte-pendiente.aspx>.
Último acceso 11 de mayo 2021

[30] G. Socrates. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, 2000.

[31] K. Varmuza, M. Karlovits, W. Demuth, Spectral similarity versus structural similarity: infrared spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, 2003, **490**(1–2), 313-324. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00668-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00668-8).

[32] J. Li, D.B. Hibbert, S. Fuller, G. Vaughn. A comparative study of point-to-point algorithms for matching spectra. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 2006, **82** (1–2), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.05.015>.

[33] J.W. Pratt, J.D. Gibbons. Kolmogorov-Smirnov Two-Sample Tests. In: Concepts of Nonparametric Theory. Springer Series in Statistics. Springer, New York, NY. 1981. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5931-2_7

[34] F. Wilcoxon. Individual Comparisons by Ranking. *Biometrics Bulletin*, 1945, **1**(6), 80-83. <https://doi.org/10.2307/3001968>

[35] C.E. Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med.* 1978, **8**(4), 283-98. [https://doi.org/10.1016/s0001-2998\(78\)80014-2](https://doi.org/10.1016/s0001-2998(78)80014-2).

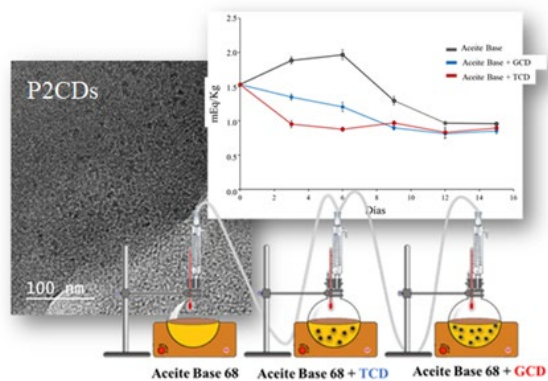
[36] D.W. Hosmer, S. Lemeshow. Applied Logistic Regression, 2nd Ed. Chapter 5, John Wiley and Sons, New York, 2000, 160-164.

[37] I. Arana, C. Jarén, S. Arazuri. Maturity, variety and origin determination in white grapes (*Vitis vinifera* L.) using near infrared reflectance technology. *J. Near Infrared Spectrosc.* 2005, **13**, 349–357. <https://doi.org/10.1255/jnirs.566>.

-
- [38] D. Cozzolino, W. Cynkar, N. Shah, P. Smith. Varietal differentiation of grape juice based on the analysis of near- and mid-infrared spectral data. *Food Anal. Methods*, 2012, **5**, 381–387. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9249-6>.
- [39] J.D. Olden, M.K. Joy, R.G. Death. An accurate comparison of methods for quantifying variable importance in artificial neural networks using simulated data. *Ecol. Model.* 2004, **178**, 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2004.03.013>.
- [40] M. Szymanska-Chargot, A. Zdunek. Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process. *Food Biophys* 2013, **8**, 29–42. <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9279-7>.
- [41] Spectral Database for Organic Compounds, SDBS. by National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan. <https://sdb.sdb.aist.go.jp>. Último acceso 10 de mayo 2021
- [42] J.A. Heredia-Guerrero, J.J. Benítez, E. Domínguez, I.S. Bayer, R. Cingolani, A. Athanassiou, A. Heredia2014. Infrared and raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Front. Plant Sci.* 2014, **5** (305), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00305>.
- [43] C. Medina-Plaza, J.A. de Saja, J.A. Fernández-Escudero, E. Barajas, G. Medrano, M.L. Rodríguez-Méndez. Array of biosensors for discrimination of grapes according to grape variety, vintage and ripeness. *Anal. Chim. Acta*, 2016, **947**, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.10.032>
- [44] J. Nogales-Bueno, B. Baca-Bocanegra, A. Rooney, J.M. Hernández-Hierro, F.J. Heredia, H.J. Byrne. Linking ATR-FTIR and Raman features to phenolic extractability and other attributes in grape skin. *Talanta*, 2017, **167**, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.008>.

CAPÍTULO 2

Síntesis y caracterización de puntos cuánticos de carbono obtenidos a partir de desechos vegetales y su aplicación como antioxidantes frente a especies reactivas de oxígeno en muestras acuosas y de aceite



1 INTRODUCCIÓN

El estudio y la obtención de los puntos de carbono (CDs) ha atraído la atención de la comunidad científica debido a las propiedades únicas de estas nanopartículas, como son fotoluminiscencia modulable, elevado rendimiento cuántico, estabilidad química y fotoquímica, baja toxicidad y biocompatibilidad [1-3].

Los métodos de síntesis de CDs dependen de la fuente de carbono utilizada y, en general, se pueden dividir en dos grandes grupos: métodos “de arriba a abajo” (top-down) que fueron utilizados fundamentalmente durante las primeras investigaciones sobre CDs y los métodos “de abajo a arriba” (bottom-up), más utilizados actualmente. Ejemplos típicos de los métodos “de arriba a abajo” incluyen la descarga en arco, la ablación laser, la oxidación química y métodos electroquímicos de materiales carbonosos (nanotubos de carbono, electrodos de grafito) y ejemplos de métodos “de abajo a arriba” incluyen el empleo de diferentes fuentes de energía (microondas, ultrasonidos e hidrotérmal) para la agregación de moléculas pequeñas o precursores oligoméricos [4]. Los métodos “de abajo a arriba” ofrecen numerosas ventajas como son la conversión de pequeñas moléculas en CDs vía carbonización y pasivación, son fáciles de obtener/manipular y económicos, no requieren un equipamiento sofisticado, ni empleo de reactivos agresivos (p.e. oxidantes fuertes como ácido nítrico, ácido sulfúrico o peróxido de hidrógeno empleados habitualmente en los métodos de oxidación química). El empleo de estas técnicas más sencillas, así como el empleo de fuentes de carbono más ecológicas como pueden ser residuos domésticos e industriales (alimentos,

plásticos, lodos) han venido siendo objeto de varios estudios en los últimos años [5]. En este sentido, los desechos vegetales, tanto domésticos como industriales, constituyen una fuente de carbono de gran disponibilidad, renovable, respetuosa con el medio ambiente e inocua para la producción de CDs. Normalmente, este tipo de desechos se descartan sin otro uso, perdiendo una posible fuente de riqueza y causando en ocasiones problemas medioambientales [6]. Los CDs preparados a partir de desechos biodegradables pueden ser considerados como productos de valor añadido, un importante concepto en el campo de la química verde.

El uso de CDs como nanopartículas antioxidantes es un campo prácticamente inexplorado, en comparación con el empleo de los mismos en sensores para compuestos químicos y biológicos, en bio-imagen, en liberación controlada de drogas y fertilizantes, como agentes de terapia fotodinámica, en fotocatalisis, etc. [7]. Como se puede observar en la Tabla 1, los CDs con propiedades antioxidantes han sido obtenidos fundamentalmente de materiales vegetales empleando síntesis hidrotermal y las aplicaciones se han centrado en el estudio de su viabilidad en varios sistemas celulares.

En este Capítulo se describirá la síntesis hidrotermal de CDs empleando como fuentes de carbono residuos vegetales domésticos (hojas de té) e industriales (bagazo de uva) así como dos moléculas pequeñas, glutatión y ácido cítrico, como sistema comparativo, para su empleo como aditivos antioxidantes en un aceite lubricante y en medio acuoso. Los CDs obtenidos se caracterizaron morfológicamente y se estudiaron sus propiedades ópticas y electrónicas. Asimismo, las propiedades antioxidantes se evaluaron empleando los ensayos de Folin-Coicelteau y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) en medio acuoso. La presencia de micelas inversas explica la solubilidad de los CDs sintetizados en el aceite lubricante y, como prueba de concepto, se evaluó la actividad antioxidante de los mismos en el aceite.

Tabla 1. Puntos cuánticos de carbono con propiedades antioxidantes, precursores y aplicaciones

Precursor	Aditivos	Método de síntesis	Ensayo	Aplicación	Ref
Lutina	Etilen-diamina	HT, 140 °C, 12 h Autoclave	DPPH / ROSUP DCFH-DA	Viabilidad celular de NCI-H1299	[8]
Aceite esencial de tomillo	--	HT, 200 °C, 15 h Autoclave	DPPH	--	[9]
Semillas de comino	--	HT, 250 °C, 6 h Autoclave	DPPH	--	[10]
Acido cítrico	Mercapto-etilamina + selenito sódico	HT 150 °C, 2,5 h	DPPH / Fenton DTNB	--	[11]
Floroglucinol +fenol	--	HT, 260 °C, 5 h Autoclave	Fenton	Viabilidad celular de rADSC	[12]
1,4-fenilen- diamina	Acido fosfórico + Mn(OAc) ₂	HT, 220 °C, 10 min Microondas	DPPH / Fenton NBT / enzimático	Viabilidad celular de B15F1, HeLa	[13]
Desechos de te	Etilendiamina	HT, 150 °C	Fenton / Pirogalol	--	[14]
Albumina de suero bovino	Ce(NO ₃) ₃ •6H ₂ O	Bio-mineralización pH 12, 55 °C, 8 h	Violeta de metilo	Viabilidad celular de VSMC	[15]
Selenocisteina	--	HT, 60 °C, 24 h Autoclave	ESRS / DEMPO	Viabilidad celular de	[16]
Cáscara de coco	--	HT, 200 °C, 3 h Autoclave	DPPH	--	[17]
Fibra de coco	--	HT, 200 °C, 3 h Autoclave	DPPH	--	[18]
Hojas de cilantro	--	HT, 240 °C, 4 h Autoclave	DPPH	--	[19]
Ajo	--	HT, 200 °C, 3 h Autoclave	DPPH / Fenton	--	[20]

DEMPO= N-óxido de 5,5'-dimetilpirrolina; DCFH-DA = 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína; DPPH= 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil; DTNB= ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico); EDTA= ácido etilenediaminotetraacético; ESRS = Espectrometría de resonancia electrónica de espín; HT= hidrotermal; NBT= nitro blue tetrazolium; ROSUP= (ROS reactivo, como control positivo del nivel de ROS para células)

Finalmente, se propuso el posible mecanismo de la actividad antioxidante de los CDs tanto en medio acuoso como en el medio oleoso.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Protocolos de síntesis

2.1.1. Síntesis de CDs a partir de glutatión y ácido cítrico (GCDs)

Los CDs derivados de glutatión y ácido cítrico se sintetizaron siguiendo el método hidrotermal como se describe en Díaz-Faez et al. [21] con algunas modificaciones: 1 g de glutatión (Sigma-Aldrich Co) y 1 g de ácido cítrico (Sigma-Aldrich Co) se mezclaron en un crisol de sílice y se agregaron 10 mL de agua MilliQ (MQW) para formar una disolución transparente que posteriormente se calentó en un horno a 180 °C durante 5 horas. Durante el proceso de calentamiento, se adicionaron varias alícuotas de MQW (1 mL agua cada 30 min) para evitar la calcinación total del producto. Se obtuvo un gel de color naranja conteniendo los GCDs y que una vez enfriado a temperatura ambiente se disolvió en 10 ml de MQW. Los GCDs fueron purificados por diálisis utilizando un tubo de membrana (MWCO, 3,5 kDa) frente a MQW durante 24 h. Terminada la diálisis, la disolución se liofilizó y los GCDs obtenidos se almacenaron a 4 °C para su uso posterior. La síntesis se realizó por triplicado y el rendimiento de la misma resultó ser del 5,4% p/p. Los GCDs se utilizaron como referencia a lo largo de este trabajo por dos razones: i) la presencia de los heteroátomos N y S (proporcionados por el glutatión) que pasivan la superficie de las nanopartículas y mejoran sus propiedades fotoluminiscentes [21,22] y ii) los GCD también poseen actividad antioxidante [23].

2.1.2. Síntesis de CDs a partir residuos de hojas de té verde (TCDs)

Los CDs obtenidos a partir de residuos de té verde se sintetizaron mediante un método de carbonización. Tras preparar tres infusiones de té verde (Hacendado, Mercadona), el contenido de las tres bolsas se secó al aire a temperatura ambiente, tras lo cual fue molido hasta obtener un polvo fino. Se transfirieron 2 g del polvo de té en un vaso de precipitados de teflón y se calentó a 200 °C durante 6 horas en una estufa. Una vez enfriado a temperatura ambiente el residuo obtenido se dispersó en MQW y se agitó suavemente durante la noche. La mezcla se filtró a través de papel de filtro de 100 µm y se centrifugó a 12.000 rpm para eliminar las partículas más grandes. El sobrenadante se filtró nuevamente empleando una membrana de microfiltración de 0,22 µm y la solución se purificó mediante diálisis utilizando un tubo de membrana (MWCO, 3,5 kDa) frente a MQW durante 24 h. Finalmente, la disolución concentrada se liofilizó y los TCDs resultantes se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior. El rendimiento de la síntesis resultó ser del 5% p/p.

2.1.3. Síntesis de CDs a partir de bagazo de uva (P1CDs y P2CDs)

El bagazo utilizado en este estudio fue provisto por Bodegas Vidas (Cangas del Narcea, Asturias). Para la síntesis de CDs a partir de dicho bagazo, se abordaron dos rutas diferentes. En la primera (proceso hidrotermal), se agregaron 2 g de bagazo a 20 mL de una disolución de NaOH 1M. La mezcla agitada se transfirió a un autoclave de acero inoxidable revestido con teflón de 50 mL y se calentó a 180 °C durante 4 horas en estufa. Una vez enfriada la mezcla a temperatura ambiente, el producto de reacción se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min para eliminar cualquier precipitado. El sobrenadante se dializó frente a MQW a través de una bolsa de diálisis durante 4 días.

Finalmente, la solución purificada se liofilizó y los CDs obtenidos, que en lo sucesivo se denominarán como P1CDs, fueron almacenados a 4 °C hasta su uso posterior. El rendimiento de la síntesis resultó ser del 6% p/p. En la segunda ruta (recipiente abierto), se transfirieron 2 g de bagazo a un vaso de precipitados de teflón y se calentaron a 180°C durante 4 horas en estufa. Cada 30 min se añadió 1 mL de MQW para evitar la carbonización completa del producto, el cual finalmente fue suspendido en MQW, centrifugado y dializado como se describió anteriormente. La solución se liofilizó y los CDs obtenidos, que en lo sucesivo denominaremos como P2CDs, se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso. El rendimiento de la síntesis resultó ser del 2,5% p/p. En ambas rutas, las síntesis se realizaron por triplicado.

2.2. Medida de la capacidad reductora total

2.2.1. Método de Folin-Ciocalteu

El método Folin-Ciocalteu (FC) se conoce también como ensayo total de fenoles y permite determinar la capacidad reductora de un material. Esta capacidad reductora se expresa como contenido fenólico total. Las medidas se realizaron en matraces de 10 mL tomando 250 µL de cada una de las disoluciones de trabajo de los diferentes CDs sintetizados y se mezclaron con 100 µL del reactivo de FC (constituido por una mezcla de ácido fosfowolfrámico, $H_3PW_{12}O_{40}$, y ácido fosfomolibdico $H_3PmMo_{12}O_{40}$) y 250 µL de Na_2CO_3 7,5% p/v llevando a volumen con MQW. La mezcla se agita suavemente y tras 30 min de reacción a temperatura ambiente al abrigo de la luz, se mide la absorbancia a 765 nm frente a un blanco de reactivos utilizando un espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer Lambda 900. Las medidas se realizan por triplicado para cada tipo de CDs frente a una línea de calibrado preparada utilizando ácido gálico como patrón. La capacidad reductora se calculó como mg equivalentes de ácido gálico por mL.

2.2.2. Determinación de la actividad antioxidante (DPPH)

La actividad antioxidante de los diferentes CDs sintetizados se realizó empleando el ensayo de captura de radicales libres utilizando el radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo, DPPH. Para ello, se prepararon disoluciones conteniendo 25, 7, 175, 250, 350 y 500 mg/mL de los diferentes CDs. Se adicionó 1 mL de una disolución 100 μ M de DPPH a 1 mL de cada una de las disoluciones y se dejó reaccionar durante 30 min al abrigo de la luz, tras lo cual se midió la absorbancia a 517 nm con objeto de determinar la concentración del radical DPPH libre frente a MQW conteniendo DPPH como blanco (control). Las muestras fueron analizadas por triplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición utilizando la Ecuación 1:

$$\text{Inhibición DPPH \%} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

en la que A_c es la absorbancia de la disolución control y A_s es la absorbancia de la muestra.

2.2.3. Determinación de índice de peróxidos del aceite lubricante

El índice de peróxidos (IP) es una medida del grado de peroxidación (estado de oxidación inicial) de un aceite que permite determinar la cantidad total de peróxidos en la muestra que oxidan el yoduro potásico. El yodo liberado por los peróxidos se determinó volumétricamente empleando una disolución patrón de tiosulfato sódico y detectando el punto final potenciométricamente empleando un electrodo combinado de anillo de Pt-Ag/AgCl 3M KCl, 3M KNO₃ y un pH/mVmetro Crison con una exactitud de medida de ± 0.2 mV. La determinación del IP del aceite en presencia de los diferentes CDs se llevó a cabo según el procedimiento siguiente: se prepararon tres muestras independientes de aceite lubricante a dos de las cuales se adicionaron disoluciones de GCDs y TCDs (0.25% w/v) de modo que la concentración en

CDs fuese la misma en ambas muestras. La tercera muestra de aceite se utilizó como blanco. Las muestras se calentaron durante 15 días, con agitación moderada en atmósfera de oxígeno, elevando la temperatura hasta los 75°C, de modo que se produjese la formación de especies reactivas de oxígeno de forma lenta. Para evaluar el IP de cada muestra de aceite, se pesaron 10 g de cada una y se disolvieron en 50 mL de una mezcla de CHCl₃/ácido acético glacial (3:2 v/v). A continuación, se adicionaron 0,5 mL de una disolución acuosa saturada de KI. La mezcla, constituida por dos fases, se mantuvo en agitación suave hasta finalizar el análisis. Se sumergió el electrodo combinado de Pt-Ag/AgCl en el sistema de dos fases y se midió el potencial redox tras cada adición, desde una micropipeta, de una disolución 0.005M de tiosulfato sódico. La muestra control se sometió a las mismas operaciones. El IP se calculó utilizando la Ecuación 2:

$$IP = \frac{(V-V_0) \cdot C_t \cdot F \cdot 1000}{m} \quad \text{Ecuación 2}$$

en la que V y V_0 son los volúmenes de la disolución patrón de tiosulfato sódico adicionados a las muestras de aceite conteniendo los CDs y a la muestra blanco, respectivamente. F y C_t son el factor de corrección y la concentración molar del patrón de tiosulfato sódico, respectivamente; m es el peso en g de la muestra de aceite lubricante.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización morfológica y estructural de los CDs

Con el fin de caracterizar el tamaño y la forma de los distintos CDs sintetizados se empleó la técnica de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM), las imágenes se obtuvieron en un Microscopio JEOL JEM-2100F, 200Kv. Como puede verse en la Figura 1a, los GCDs son

en su mayoría monodispersos con un diámetro medio de $6 \pm 0,8$ nm, mientras que los TCDs son más pequeños con un diámetro medio de $3,5 \pm 0,6$ nm y como muestra se muestra en el inserto de la Figura 1b se puede apreciar la presencia de una fase amorfa y una fase cristalina con un espaciado interplanar de 0,19 nm, que se corresponde con el espaciado inter-planos del grafito ($d_{100} = 0.213$ nm) [24, 25], lo que evidencia la estructura cristalina de los TCDs. Los P1CDs (Figura 1c.) y P2CDs (Figura 2) son también monodispersos con diámetros de partícula entre 3 y 5 nm, con un tamaño medio de $4 \pm 0,8$ nm.

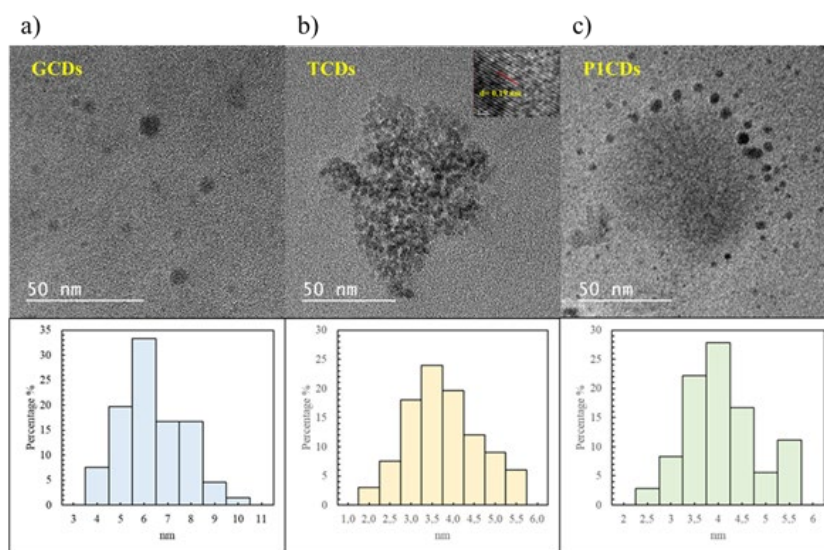


Figura 1. Imágenes HR-TEM: (a) GCDs, (b) TCDs, (c) P1CDs. Los correspondientes histogramas de tamaño se obtuvieron con $N=118$ TCDs, $N=106$ GCDs y $N=144$ P1CDs medidas.

La estructura química de los CDs se caracterizó mediante análisis ATR-FTIR empleando un espectrofotómetro Varian 670-IR con un accesorio Golden Gate ATR. Las bandas anchas observadas a $3150-3400$ cm^{-1} en los espectros de todos los CDs se atribuyeron al estiramiento del grupo -OH y al estiramiento enlaces N-H (Figura 3).

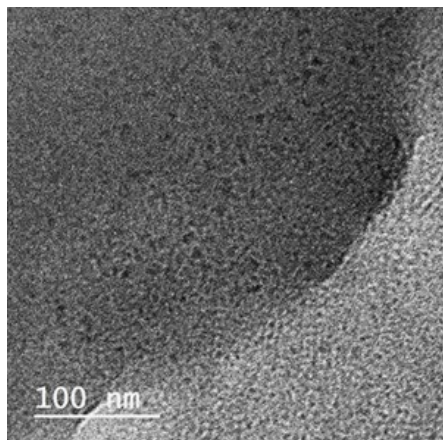


Figura 2. Imagen HRTEM de los P2CDs en la que se observa una dispersión uniforme de los mismos.

En el caso de los GCDs, las transiciones a 1700 , 1165 y 1070 cm^{-1} se asignaron a vibraciones del grupo éster COO^- . Además, se identificaron otros grupos: amida ($-\text{ONH}-$, 1652 cm^{-1}), carbonilo ($-\text{C}=\text{O}$, 1695 y 1322 cm^{-1}), amino (combinación de bandas de estiramiento $\text{C}-\text{N}$ y flexión $\text{N}-\text{H}$ a 1540 cm^{-1}), flexión fuera de plano de CH_3 (1390 cm^{-1}) y de bandas estiramiento debidas a enlaces $\text{S}-\text{H}$ y $\text{C}-\text{S}$ a 2530 cm^{-1} y 771 cm^{-1} , respectivamente. Los espectros de P1CDs y P2CDs muestran un pico amplio de 3600 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} que se relaciona con el estiramiento de los enlaces $\text{O}-\text{H}$ y $\text{N}-\text{H}$ presentes en los componentes ligno-celulósicos del bagazo de uva [26]. Los picos en la zona de 2840 cm^{-1} y 2920 cm^{-1} , también observados en los espectros de TCDs, se atribuyeron a estiramiento simétrico y asimétrico de los enlaces $\text{C}-\text{H}$ en grupos metilo y metileno. La banda a 1560 cm^{-1} atribuida a las vibraciones aromáticas $\text{C}=\text{C}$ también se observaron en los espectros de P1CDs y P2CDs, así como la banda a 1390 cm^{-1} debida a la flexión fuera del plano del CH_3 y atribuida a estructuras de polisacáridos. La banda a 1220 cm^{-1} se asignó a éteres de alquil arilo ($-\text{OCH}_3$) y la banda a 1025 cm^{-1} a vibraciones del $\text{C}-6$ de la celulosa [27].

En el caso de los TCDs, la banda 1600 cm^{-1} se adscribió a la vibración de la amida I (flexión N-H), la banda a 1014 cm^{-1} a los grupos C-O en los polisacáridos y la banda a 1700 cm^{-1} a cetonas simples y grupos carboxílicos. Es importante señalar que algunas las bandas, debido a la composición de los materiales de partida para preparar los diferentes CDs, pueden superponerse con bandas de grafeno/grafito generadas durante las síntesis. Por ejemplo, para el óxido de grafeno la banda centrada en $\sim 3430\text{ cm}^{-1}$ se ha asignado a vibraciones de estiramiento O-H, las que aparecen en la región de 2925 y 2845 cm^{-1} se han atribuido a estiramientos sp^2 y sp^3 del grupo C-H, la observada a 1620 cm^{-1} se ha adscrito a estiramiento aromático C=C, la que aparece a 1400 cm^{-1} a la deformación O-H y la banda a 1260 cm^{-1} a estiramiento del grupo C-OH [28, 29].

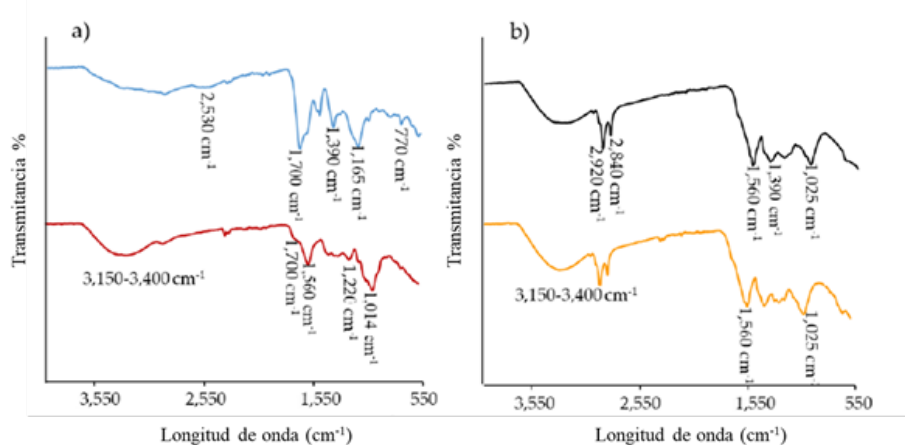


Figura 3. Espectros ATR-FTIR. a) GCDs (—) y TCDs (—); b) PICDs (—) y P2CDs (—).

3.2. Caracterización óptica y electrónica de los CDs

El estudio de las propiedades ópticas se llevó a cabo mediante el análisis de los espectros de absorción de los correspondientes CDs. Como se aprecia en la Figura 4, el espectro UV-Vis de absorción de los GCDs muestra una banda de absorción a 347 nm atribuida a las transiciones $n-\pi^*$ transiciones de grupos -C=O, C-N o C-OH en enlaces con hibridación sp^3 superficiales [30, 31] y un hombro alrededor de 240 nm atribuido a transiciones $\pi-\pi^*$ (enlaces C-C con hibridación sp^2). En los espectros de TCDs, P1CDs y P2CDs se observó un ligero desplazamiento del hombro de absorción a 240 nm hacia el rojo: $\Delta\lambda=18, 25$ y 35 nm para P1CDs, TCDs y P2CDs, respectivamente. Este hecho puede deberse a la diferente calidad estructural y estado de agregación de los diferentes CDs.

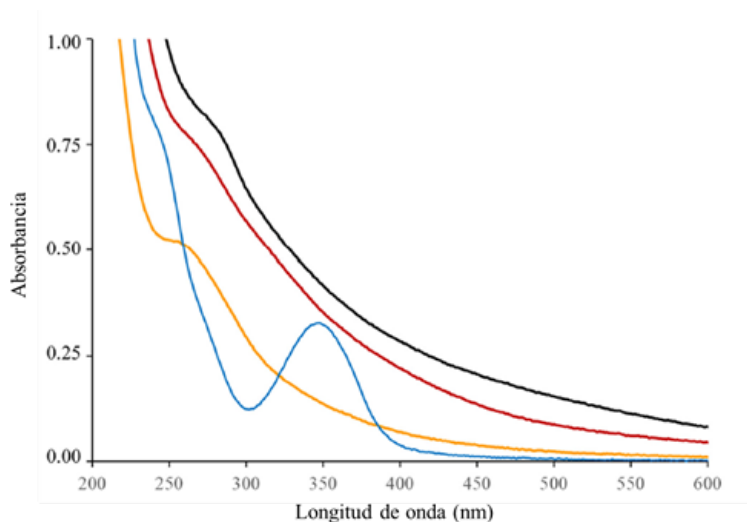


Figura 4. Espectros de absorción de GCDs (—), TCDs (—), P1CDs (—) y P2CDs (—) en disolución acuosa.

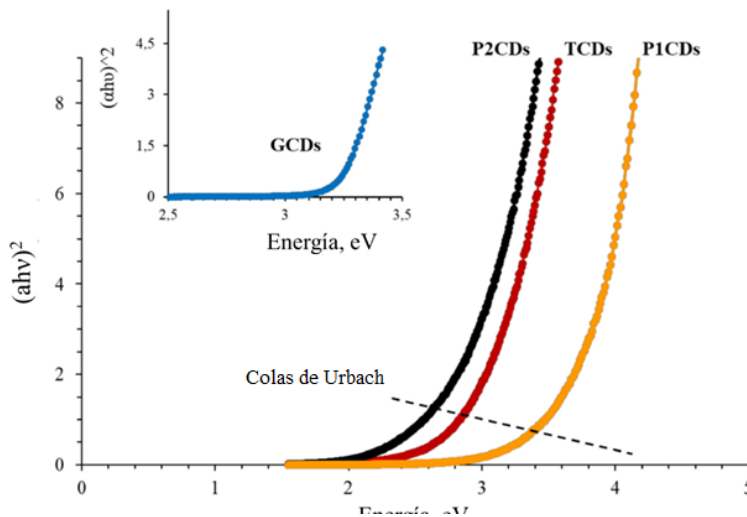
Tabla 2. Propiedades ópticas y electrónicas de los diferentes CDs

Carbon dots	E_g , eV	E_u , meV
GCDs	3,25	337
TCDs	3,50	626
P1CDs	3,90	583
P2CDs	3,10	486

El análisis de los espectros de absorción permite obtener el salto de banda (E_g) de los diferentes CDs haciendo uso de la ley de Tauc para transiciones directas [32] a través de la Ecuación 3:

$$(\alpha hv)^2 = k(hv - E_g) \quad \text{Ecuación 3}$$

donde α es el coeficiente de absorción, hv la energía de la luz incidente y k es una constante. El valor de E_g se estimó a partir de la representación gráfica de $(\alpha hv)^2$ vs hv y extrapolando la línea recta $(\alpha hv)^2 = 0$ (Figura 5). Los valores de E_g obtenidos para los diferentes CDs se recogen en la Tabla 2.

**Figura 5.** Gráficas de Tauc para la estimación del salto de banda de los diferentes CDs.

Como se puede observar en la Figura 5 el borde de absorción de los CDs no es abrupto y es posible apreciar una zona exponencial, llamada cola de Urbach, por debajo del salto de banda.

Estas colas se han atribuido a desórdenes, defectos y vibraciones térmicas en las redes cristalinas del material [33, 34]. Las colas de Urbach están asociadas con bandas de absorción de dominios electrónicos localizados en cristales semiconductores. El coeficiente de absorción $\alpha(h\nu)$ en las proximidades de la banda depende de forma exponencial de la energía del fotón y obedece a la Ecuación 4:

$$(\alpha h\nu) = \alpha_0 \cdot \exp(h\nu - E_u) \quad \text{Ecuación 4}$$

donde α_0 es una constante y E_u es la energía de Urbach, también llamada “anchura de Urbach”.

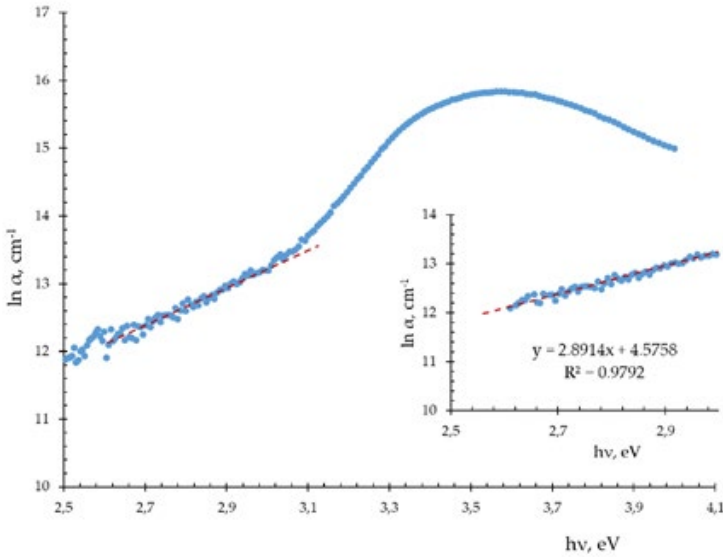


Figura 6. Estimación de la energía de Urbach para los GCDs.

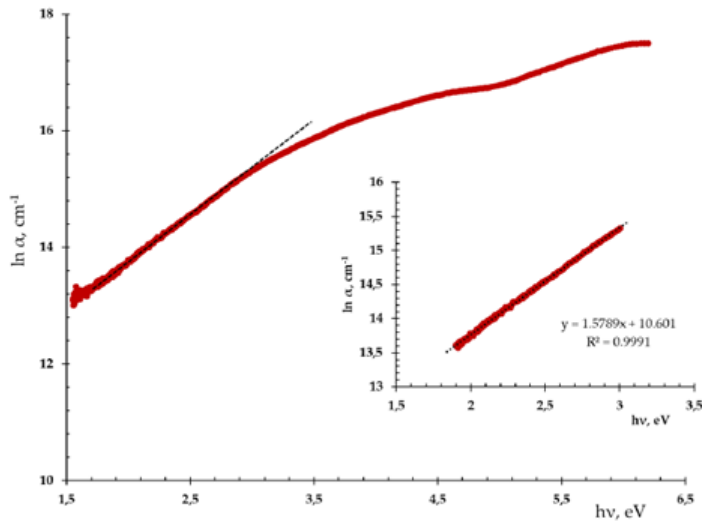


Figura 7. Cálculo de la energía de Urbach para los TCDs.

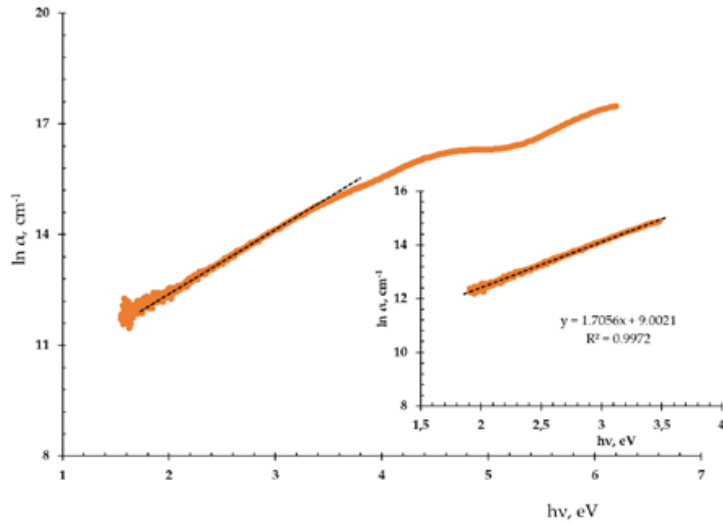


Figura 8. Estimación de la energía de Urbach para los P1CDs.

La representación gráfica de $\ln(\alpha(h\nu))$ frente a $h\nu$ proporciona una región lineal en la zona más baja de energía, de cuya pendiente puede estimarse el valor de

E_u (Figuras 6-9). Los resultados, recogidos en la Tabla 2, muestran que el valor más bajo de E_u corresponde a los GCDs, lo que indica que estas nanopartículas exhiben una nanoestructura con menos defectos que el resto, mientras que los TCDs, con un valor más elevado de E_u , deben poseer una nanoestructura más amorfa y más rica en defectos.

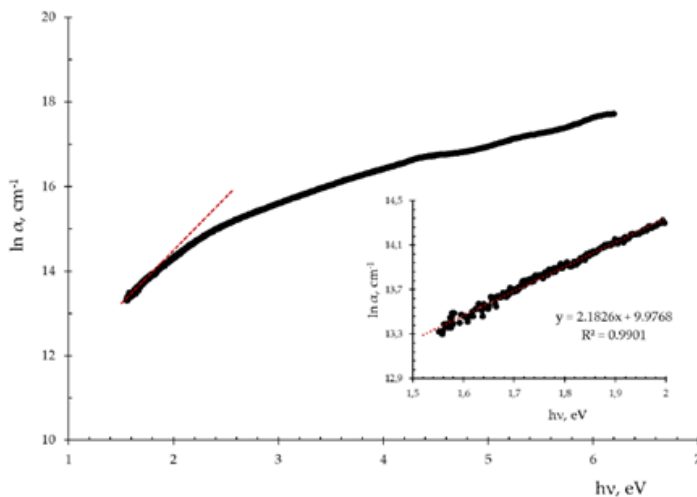


Figura 9. Cálculo de la energía de Urbach para los P2CDs.

3.3. Propiedades luminiscentes de los CDs

Las propiedades luminiscentes de los puntos de carbono se estudiaron mediante la obtención de los espectros de excitación y emisión de las muestras sintetizadas. En la Figura 10 se muestran los espectros de excitación y emisión de los diferentes CDs y como se puede observar los GCDs poseen una banda de emisión intensa en 418 nm cuando se excitan a 350 nm. Estos espectros se tomaron como referencia para el estudio de las características espectrales del resto.

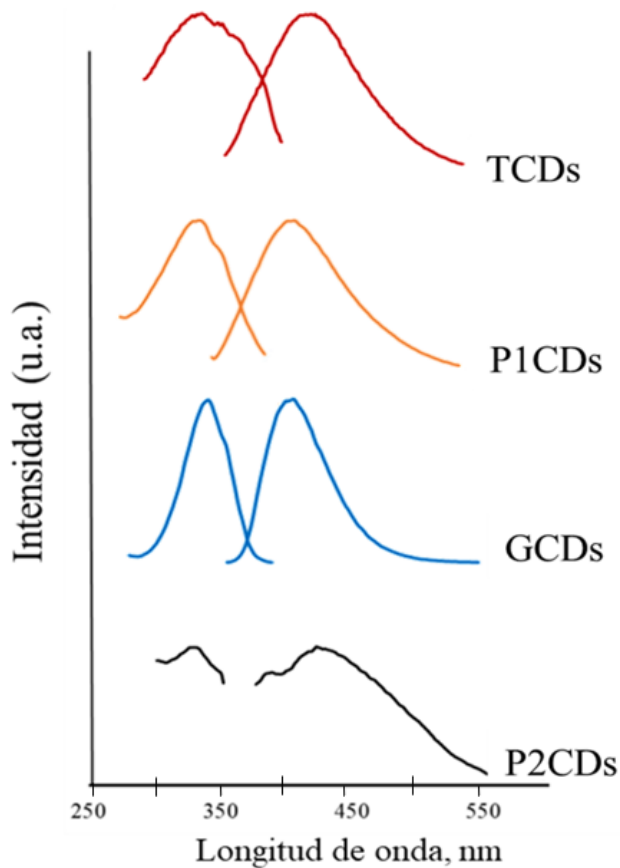


Figura 10. Espectros de excitación y emisión de los CDs sintetizados

Así, se puede comprobar que cuando se excitan a 350 nm, los TCDs presentan una banda de emisión fluorescente a 430 nm y los P1CDs a 423 nm. En el caso de los P2CDs el máximo de la banda de excitación está desplazada hacia el azul, 318 nm, respecto de la de los GCDs y la banda de emisión muestra un máximo de intensidad a 440 nm. Los espectros de excitación y emisión muestran una simetría especular aceptable y en la Tabla 3 están recogidos los desplazamientos observados en las bandas de emisión de los CDs

respecto a la de los GCDs. Asimismo, se recogen los desplazamientos de Stokes para cada uno de los CDs.

Tabla 3. Propiedades luminiscentes de los CDs

Carbon dots	λ_{exc} , nm	λ_{em} , nm	$\Delta \lambda_e$, nm	Desplazamiento Stokes ($\lambda_{em} - \lambda_{ex}$), nm	FWHM, nm	QY, %
GCDs	350	418	--	68	$126 \pm 4,5$	55,7
TCDs	350	430	$\Delta \lambda_{em}=22$	80	$116 \pm 5,4$	4,50
P1CDs	350	423	$\Delta \lambda_{em}=5$	73	157 ± 8	2,76
P2CDs	318	440	$\Delta \lambda_{exc}=32$ $\Delta \lambda_{em}=10$	22	--	0,65

Asimismo, se pudo comprobar que tanto los TCDs como los P1CDs mostraban, respecto a los GCDs, un mayor desplazamiento de Stokes. En general, el desplazamiento de Stokes está asociado con la solvatación de los estados excitados en moléculas fluorescentes. En el caso de los CDs también parece ser ésta la causa de tales desplazamientos junto con la temperatura [35] y, en nuestro caso, dado que todos los experimentos se realizaron en medio acuoso y a temperatura constante, los desplazamientos estarían relacionados con la sensibilidad de cada sistema con el entorno acuoso (solvatocromismo), siendo los TCDs y los P1CDs los más sensibles al mismo. Por otra parte, la anchura en la mitad de la banda de emisión (FWHM, de sus siglas en inglés) puede ser considerada una medida para evaluar la homogeneidad de los CDs y la reproducibilidad de la síntesis [36]. En la Tabla 3 se puede observar que las pequeñas desviaciones estándar, menores del 5 %, del FWHM para los diferentes CDs indican una elevada reproducibilidad del correspondiente método de síntesis. Además de los anteriores parámetros, el rendimiento cuántico (QY) de la fotoluminiscencia de los CDs es también una medida de la calidad de los mismos. El QY absoluto determinado para cada uno de los sistemas se recogen en la Tabla 3, en la que se puede comprobar que los GCDs

exhiben un rendimiento cuántico relativamente elevado, en tanto que el resto de CDs presentan valores marcadamente inferiores, siendo aproximadamente 12, 20 y 86 veces más bajos respectivamente. El elevado rendimiento cuántico de los GCDs, respecto al resto, puede explicarse por la estructura del precursor glutatión, que contiene grupos nitrógeno y azufre (ver espectro FTIR, Fig. 3.a), que actúan como agentes de pasivación superficial efectivos [37]: el desorden es menor (E_u menor) y existen defectos asociados a enlaces S-H y C-S superficiales, dos factores que actúan sinérgicamente para favorecer las transiciones radiacionales [38] y, con ello, un rendimiento cuántico elevado de los GCDs, respecto al resto de materiales.

Por otra parte, los datos correspondientes al resto de CDs se correlacionan con la presencia de grupos C=O, C-OH y grupos nitrogenados (ver análisis por FTIR) que introducen trampas en la superficie y/o el núcleo de los CDs, dando lugar a la formación de enlaces oscilantes y a un creciente desorden (aumento en las energías E_u), todo lo cual reduce las probabilidades de desactivaciones radiacionales (bajos rendimientos cuánticos). Por otra parte, el bajo valor observado para los P2CDs, comparados con los de los P1CDs, podría explicarse por la presencia de un elevado número de grupos -COOH en los límites de dominios- π (conjugación sp^2), los cuales se transformaron en grupos -COONa debido a que la síntesis de los P2CDs se realizó en presencia de NaOH. Este hecho, produce una reducción en los procesos de desactivación radiacional y, por tanto, conduce a un menor rendimiento cuántico [39].

3.4. Influencia del pH de los estados superficiales en las propiedades luminiscentes de los CDs

Para investigar la influencia que tiene el estado de la superficie (grupos funcionales, particularmente amina y carboxílico) sobre las propiedades de fotoluminiscencia de los CDs, se registraron los espectros de emisión en un

intervalo de pH de 1 a 12, utilizando diferentes disoluciones reguladoras: pH 2-4: (glicina 0,1 M en NaCl 0,1 M) + (HCl 0,1 M). pH 5-8: (0.1 M KH₂PO₃) + (0.1 M Na₂HPO₃) y pH 8-12: (0.1 M glicina en 0.1 M NaCl) + (NaOH 0,1 M). La fuerza iónica final de las soluciones medidas osciló entre 0,32 y 0,36 M, de modo que su contribución a la fotoluminiscencia de los CDs se espera que sea marginal. La intensidad de fluorescencia de todos los CDs mostraron un patrón de comportamiento similar con el pH.

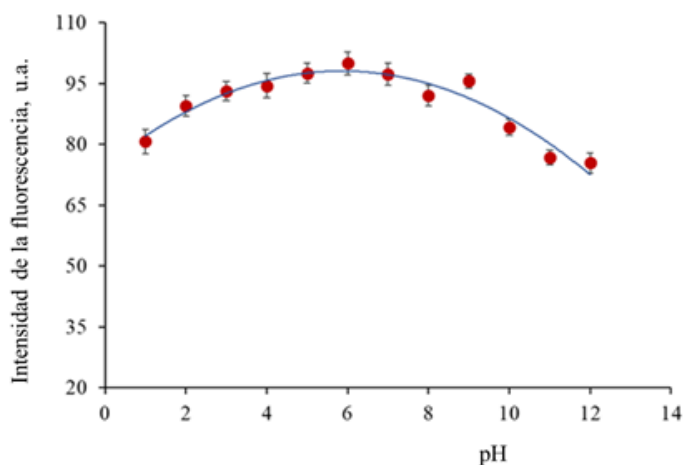


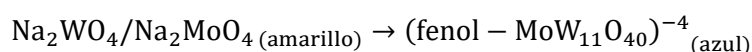
Figura 11. Influencia del pH en la intensidad de la fluorescencia de P1CDs

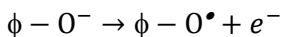
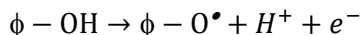
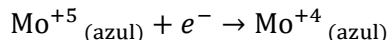
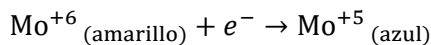
En la Figura 11 se observa que la intensidad de fluorescencia de los P1CDs no mostró cambios significativos en el intervalo de pH 4-8, aunque a pHs superiores disminuyó significativamente, con una pérdida de intensidad del 20 % a pH 12, que fue el máximo medido. Por debajo de pH 4 también se advirtió una disminución menos marcada de la intensidad de fluorescencia debido, probablemente, a la protonación de los grupos amino superficiales [40]. A $\text{pH} > 8$, la disminución de la intensidad de emisión se adscribió a la desprotonación de los grupos superficiales (amino N, C = O). Estas observaciones indican claramente que la intensidad de la fluorescencia

depende del estado de la superficie de los CDs. En el intervalo de pH 4-8, la intensidad de emisión, prácticamente constante, puede atribuirse a una condición isoelectrónica entre los grupos de la superficie. Además, se observó que la posición del máximo de la banda de emisión no cambia con el cambio de pH. En el caso particular de los GCDs, la influencia del pH fue similar a la observada en trabajos previos del grupo [21]: en el intervalo de pH 3-8, la fluorescencia de los GCDs aumenta suavemente y luego disminuye drásticamente como resultado de la ionización de los grupos funcionales superficiales de los GCDs.

3.5. Estudio espectrofotométrico de la actividad antioxidante de los CDs y mecanismo de desactivación radicalaria

Para el estudio de las propiedades antioxidantes de los CDs se utilizaron dos métodos colorimétricos ampliamente descritos en la bibliografía: el ensayo Folin Ciocalteu y el método DPPH. El ensayo Folin-Ciocalteu permite determinar la capacidad antioxidante total expresada como contenido fenólico total (TPC, siglas en inglés), aunque no refleja, necesariamente, la cantidad total de fenoles. Este ensayo es un método colorimétrico de transferencia de electrones en el cual las reacciones redox pueden tener lugar no sólo con compuestos fenólicos sino también con otros compuestos reductores como azúcares o ácido ascórbico [41]. El reactivo de Folin-Ciocalteu consiste en una mezcla de heteropoliácidos, ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico, en los que el molibdeno y el wolframio están en un estado de oxidación +6. Como resultado de la reacción con un reductor, se forman azul de molibdeno y azul de wolframio, con un estado de oxidación medio de los metales entre 5 y 6, según el mecanismo [42]:





en el cual $\phi - \text{OH}$ representa un fenol o reductor. Singleton y Rossi [43], mejoraron la reacción empleando el heteropolianión fosfomolibdowolfrámico, que reduce a los polifenoles con más especificidad, siendo el color azul desarrollado (absorción a 765 nm) directamente proporcional al número de grupos hidroxilo presentes.

Los resultados obtenidos para la determinación de la capacidad antioxidante de los diferentes CDs, siguiendo el procedimiento experimental descrito en la sección 2.2.1, mostraron que los P2CDs poseían la mayor capacidad antioxidante (0,17 mg mL⁻¹ GAE), seguidos de TCDs (0,12 mg mL⁻¹) debido al alto contenido de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavan-3-oles, flavonoles) presentes en los materiales precursores. Por el contrario, los GCDs y P1CDs fueron las muestras con menor capacidad antioxidante con 0,03 y 0,02 mg mL⁻¹ GAE, respectivamente. Los precursores de los GCDs poseen una limitada cantidad de grupos reductores, lo que contrasta con los precursores de los P1CDs. Por ello, la baja capacidad antioxidante de los P1CDs obtenidos a partir de bagazo de vino (como los P2CDs) podría explicarse por el diferente método de síntesis de los mismos. Los P2CDs se sintetizaron utilizando un método hidrotermal suave en ausencia de NaOH y en recipiente abierto autoclave a 180°C, mientras que los P1CDs se sintetizaron en autoclave, en presencia de NaOH 1M, a 180°C, lo que favorecería la destrucción de grupos reductores.

El método DPPH se basa en la medida cuantitativa de la actividad antioxidante empleando el radical estable DPPH[•] en metanol y proporciona información sobre la capacidad de los antioxidantes de donar átomos de

hidrógeno o electrones. Cuando este radical se reduce se forma difenilpicrilhidracina, una molécula estable y se produce un cambio de color de púrpura del DPPH[•] (absorción a 517 nm) a amarillo (de la hidracina) (Figura 12).

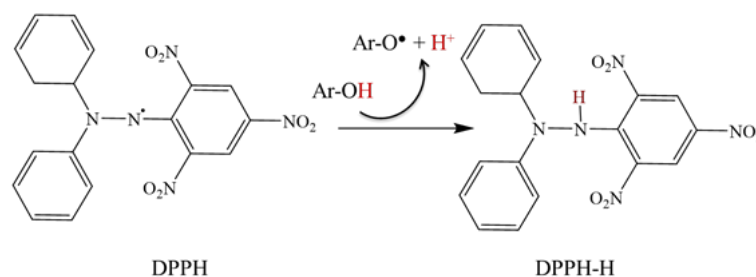


Figura 12. Fundamento del ensayo del método DPPH para antioxidantes

La reducción del radical DPPH[•] en función de la concentración de los diferentes CDs expresada como porcentaje se recoge en la Figura 13, en la que se puede observar que la actividad antioxidante de los CDs depende de su concentración. Así, la actividad antioxidante de los TCDs, GCDs y P1CDs crece paulatinamente desde los 25 mg mL⁻¹ hasta alcanzar, a una concentración de 375 mg mL⁻¹, con valores máximos de 75%, 56% y 46%, respectivamente. La tendencia observada para P2CD fue diferente: se observó un aumento de la actividad antioxidante desde los 25 mg mL⁻¹ P2CDs hasta una concentración de 180 g mL⁻¹ (62%), para luego decrecer lentamente hasta los 500 mg mL⁻¹ P2CDs con una actividad del 49%.

Comparando los datos obtenidos en el ensayo de Folin-Ciocalteu (TPC) con los obtenidos con los del método de desactivación de radicales DPPH[•] se pudo observar que los TCDs y los P2CDs con un alto TPC tenían también una alta actividad de desactivación de radicales DPPH[•] y que los P1CDs presentaban los valores más bajos. Se procedió entonces a determinar la concentración efectiva promedio (EC₅₀) de los diferentes CDs, definida como la concentración de CDs necesaria para reducir al 50% la concentración inicial

de DPPH'. Los valores de EC_{50} se tomaron en la región lineal en la representación gráfica del porcentaje de inhibición DPPH' vs concentración de CDs. Los valores EC_{50} obtenidos resultaron ser: $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para TCDs, $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ para P2CDs, $175 \mu\text{g mL}^{-1}$ para GCDs mientras que P1CDs apenas alcanzó un 45% de inhibición del DPPH. Estos resultados indicaron claramente que los TCDs tienen una mayor actividad antioxidante que los CDs derivados del bagazo de uva o los GCDs obtenidos a partir de glutatión/ácido cítrico.

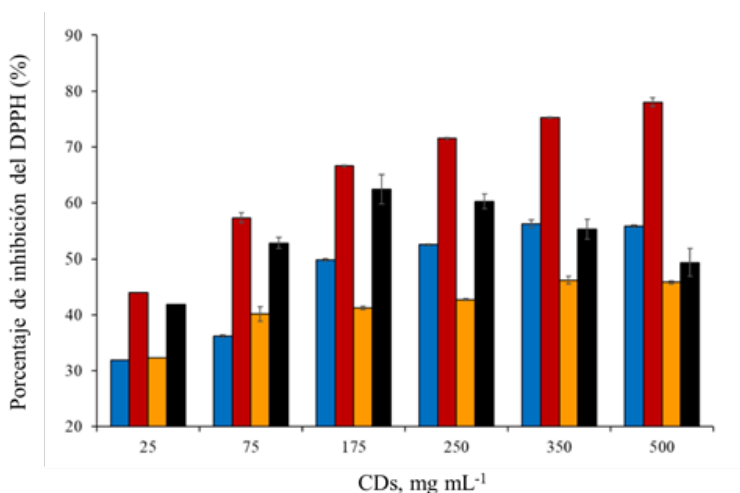


Figura 13. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH' en función de la concentración de los diferentes CDs: TCDs (■), GCDs (■), P1CDs (■) y P2CDs (■)

Aunque existe escasa información sobre la actividad antioxidante de los CDs obtenidos a partir de residuos vegetales industriales y/o domésticos, los valores de EC_{50} de los TCDs y P2CDs son comparables con los de los CDs obtenidos a partir de residuos de coco o de los de aceites esenciales (Tabla 4), mientras que sustancias reductoras típicas como el ácido ascórbico y la vitamina E tienen valores de EC_{50} relativamente más bajos.

Tabla 4. Comparación de los valores de EC_{50} (ensayo DPPH') para los CDs estudiados con los reportados para CDs obtenidos a partir de materiales vegetales.

Material Antioxidante	Metodología de síntesis	EC_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$	Ref.
Residuos de coco	HT 200 °C, 3 h. Autoclave	60	[18]
Cascara de coco	HT 200 °C, 3 h. Autoclave	25	[17]
Ácido Ascórbico	Compuesto puro	15,0	[44]
Vitamina E	Compuesto puro	13,58	[45]
HcEd	Extracción en metanol	16,7	[46]
Aceite esencial <i>Teucrium orientale</i> subsp. <i>taylori</i>	Extracción por hidrodestilación	121,60	[47]
Aceite esencial de gengibre	Extracción por hidrodestilación	11.680	[48]
TCDs	HT 200 °C, 6 h Estufa	50	Este trabajo [49]
P2CDs	HT 180 °C, 4 h Estufa	75	
GCDs	HT 180 °C, 5 h Estufa	175	

* Aceite esencial extraído de *Hyptis crenata* Pohl ex Bentham en metanol.

Todos los resultados anteriores sugieren que la reducción de radicales DPPH' por los CDs podría seguir un mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno desde grupos carboxilo, hidroxilo y/o grupos amino como se describe en la Figura 14, para el caso de los TCDs, P1CDs y P2CDs y para los GCDs, también debe tenerse en cuenta la presencia de grupos -SH. El DPPH' se reduce a DPPH-H aceptando un H donado por cualquiera de los grupos de superficiales y los electrones desapareados resultantes en los CDs se deslocalizarían por resonancia dentro de los dominios aromáticos y/o por reordenamiento de enlaces químicos.

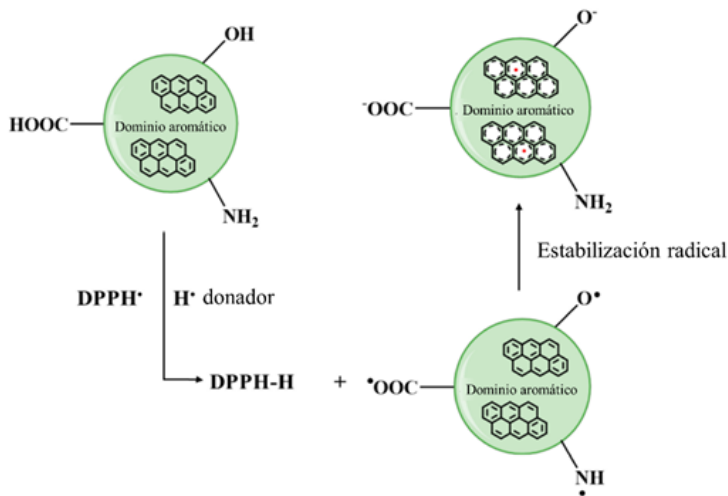


Figura 14. Mecanismo de reducción de DPPH • por CDs antioxidantes en medios acuosos.

3.6. Los CDs como nano-aditivos antioxidantes en medio no-acuoso: prueba de concepto

Los aceites minerales son los lubricantes más utilizados en la industria y se diferencian entre ellos por el origen del aceite crudo o por el proceso de refinación. Las principales diferencias entre los aceites minerales están en su composición química, en el contenido en sulfuro y su viscosidad. La oxidación de los aceites minerales es un proceso no deseable pero inevitable durante su uso y puede llevar a un incremento de la fricción y del calor generado, a una disipación de energía como calor y a una pérdida de eficiencia en el sistema mecánico en el que el aceite lubricante esté siendo utilizado.

La oxidación de los aceites hidrocarbonados es una reacción en cadena de radicales que puede iniciarse por la presencia de oxígeno, humedad, calor y partículas de metales que pueden acelerar el proceso de degradación, en particular si se trata de aceites lubricantes basados en aceites de origen vegetal y/o animal [50, 51]. A lo largo de los años se han venido desarrollado

diferentes métodos para determinar el grado de oxidación de los aceites (y grasas), tanto industriales como para el consumo humano o animal. Entre esos métodos, el índice de peróxidos (IP) es uno de los principales indicadores utilizados para evaluar la formación de hidroperóxidos y existen varios protocolos para su determinación. Dado que los CDs sintetizados en este trabajo son solubles en los aceites, se han seleccionado los TCDs y los GCDs como posibles nano-aditivos antioxidantes (desactivadores de radicales) en el aceite lubricante base ISO 68, determinando el IP siguiendo el protocolo descrito en la parte experimental. En la Tabla 5 se recogen las principales propiedades físicas de este lubricante.

Tabla 5. Algunas propiedades tribológicas del aceite mineral ISO 68 (datos aportados por Repsol)

Propiedad	Método	Iso 68
Viscosidad a 100 °C	ASTM D 445	8,6 cSt
Viscosidad a 40 °C	ASTM D 445	68 cSt
Densidad a 15 °C	--	0,88 g·cm ⁻³
Número de acidez total (TAN)	ASTM D 664	0,38 KOH·g ⁻¹
Punto de inflamabilidad	ASTM D 92	235 °C
Punto de escurrimiento	ASTM D 97	-24 °C

Para llevar a cabo el ensayo se prepararon tres muestras del aceite lubricante, dos muestras independientes que contenían 0,25% p/v de GCDs y TCDs y la tercera sin CDs se utilizó como blanco. Las muestras se calentaron durante 15 días, con agitación suave, en corriente de oxígeno y elevando la temperatura a 75°C para favorecer la oxidación lenta y moderada de las muestras (Figura15).

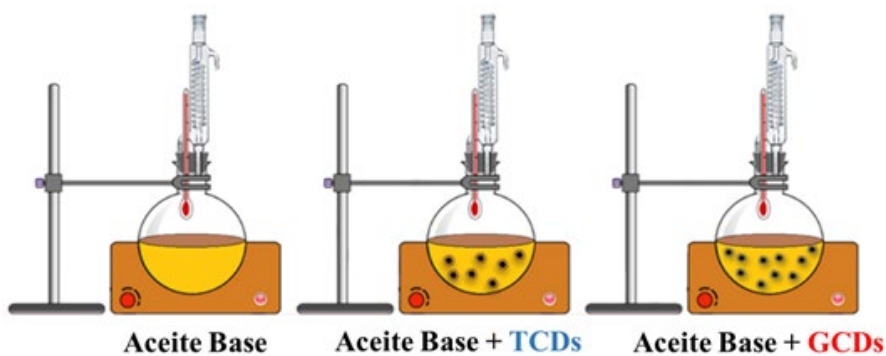


Figura 15. Esquema del dispositivo experimental para oxidar los aceites en corriente de oxígeno y temperatura de 75°C.

De acuerdo al método oficial ISO [52], el tamaño de muestra ha de ser tomado adecuadamente: para muestras en las que se espera que tengan una cantidad de peróxidos entre 1 y 30 mEqO₂ Kg⁻¹ se deben de tomar 5 g con una aproximación de 0,1 mg y para muestras en que la cantidad sea < 1 mEqO₂ Kg⁻¹ se recomienda la toma de 10 g con una aproximación de 0,1 mg. Se tomaron 10 g de cada una de las muestras cada tres días para determinar la variación del IP con el tiempo. Los resultados obtenidos en este ensayo para las muestras se han representado gráficamente en la Figura 16, en la que se puede observar que en ausencia de CDs el IP aumenta notablemente en los primeros 6 días debido a la oxidación del lubricante y a partir de ese momento decrece notablemente, probablemente debido a que la cadena de reacciones radicalarias llegó a su término.

Por el contrario, las muestras que contienen TCDs y GCDs muestran mayor estabilidad oxidativa, siendo la muestra que contiene TCDs la más estable desde las dos primeras horas. Estos resultados son muy prometedores y ofrecen un gran potencial en el empleo de TCDs y GCDs como aditivos antioxidantes en aceites lubricantes. Además, debido a la creciente demanda en el empleo de materiales biodegradables y respetuosos con el medio

ambiente, los CDs presentan numerosas ventajas ya que pueden ser obtenidos a partir de fuentes naturales (cereales, semillas, plantas aromáticas, aceites esenciales, etc) o de desechos vegetales (industriales y domésticos) (Tabla 4), lo que los hace más sostenibles que los antioxidantes químicos en las mismas condiciones experimentales [53]. Además, es importante mencionar que los CDs también pueden ser utilizados como agentes anti-fricción y anti-desgaste “verdes” en lubricantes, llegando a reducir el coeficiente de fricción un 36% y el desgaste un 10% respecto al aceite base sin las nanopartículas [54, 55].

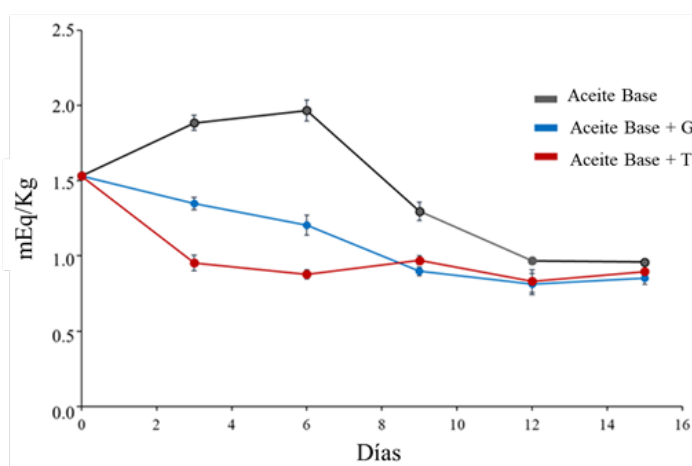


Figura 16. Estudio del envejecimiento de muestras de aceite lubricante ISO 68 en ausencia y en presencia de TCDs y GCDs como nano-aditivos antioxidantes.

3.7. Mecanismo de solubilización de los CDs en aceite lubricante y acción antioxidante en la interfase

Los CDs que se han sintetizado en este trabajo son hidrófilicos y el hecho paradójico de que sean solubles en el aceite está estrechamente relacionado

con la humedad presente en estos productos. De hecho, la concentración de agua en aceites minerales puede variar de 300 a 400 ppm, mientras que en aceites sintéticos biodegradables oscila entre 800 y 1000 ppm [56]. Teniendo en cuenta que el aceite mineral ISO 68 utilizado en nuestros experimentos no se secó previamente, éste debería contener, al menos, el nivel más bajo de humedad relacionado con el nivel de humedad ambiental. Trabajos previos en nuestro grupo demuestran que la concentración de agua en este tipo de aceites es muy baja, del orden de las 12 ppm [55]. Esta humedad en el aceite es la fuerza impulsora para formar micelas inversas: las moléculas anfifílicas presentes en el aceite pueden auto-ensamblarse en estructuras aproximadamente esféricas (micelas inversas) alrededor de las trazas de agua, dirigiendo la región hidrófila hacia el entorno del agua y las regiones hidrófobas hacia el aceite [57]. Estas micelas inversas en los aceites crean un nano-ambiente interfacial aceite-agua donde las especies hidrofílicas (p. ej., los CDs) y las anfifílicas (p. ej., radicales lipídicos) pueden entrar en estrecho contacto, pudiendo así, los CDs solubilizarse y actuar como antioxidantes activos. Para explicar la desactivación de las especies radicales por los CDs en este escenario, se consideraron varios parámetros de la estructura óptico-electrónica de los CDs. Así, para determinar la posición de los niveles de energía de la banda de valencia (BV) y los niveles inferiores de la banda de conducción (BC), se utilizaron las Ecuaciones (5) y (6):

$$E_{BC} = \chi - E^C - E_g/2 \quad \text{Ecuación 5}$$

$$E_{BV} = E_{BC} + E_g \quad \text{Ecuación 6}$$

donde E_{BC} y E_{BV} son los potenciales de las bandas de conducción y valencia, respectivamente, E^C es la energía de los electrones libres en la escala de hidrógeno ($\sim 4,5$ eV) [58], E_g y χ corresponden a la energía del salto de banda y la electronegatividad de los CDs, respectivamente. χ se expresó como la media geométrica de la electronegatividad absoluta de los átomos que forman los CDs. Tomando los GCD como modelo, se utilizaron los valores de

electronegatividad absoluta de 6,27, 7,54, 6,22, 7,30 y 7,18 eV para los átomos de C, O, S, N y H, respectivamente [59]. Con estos datos, y el valor de E_g es de 3,25 eV que previamente se había determinado (Tabla 3), los valores de E_{BC} y E_{BV} para los GCDs resultaron ser de 0,77 eV y 4,02 eV, respectivamente. En la discusión se han utilizado tres pares de radicales alquilo genéricos, RO^\bullet / ROH (2,90 eV frente a NHE), $ROO^\bullet / ROOH$ (3,50 eV frente a NHE) y $ROOH / RO^\bullet$ (2,60 eV frente a NHE) [59].

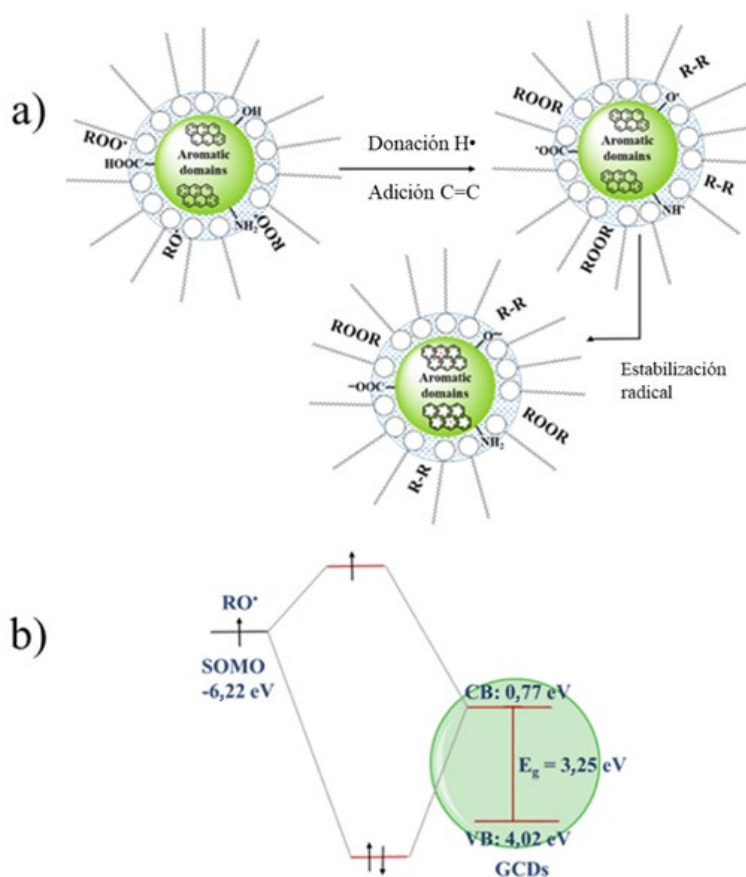


Figura 17. (a) Actividad antioxidante de los CDs en la interfase agua-aceite mediatizada por micelas inversas; (b) Interacción del orbital frontera SOMO del radical alcoxilo (RO^\bullet) y la banda de conducción de los GCDs.

Teniendo en cuenta que los altos potenciales redox de estos radicales los hacen fuertemente electrofílicos, podrían contemplarse tres posibles mecanismos de desactivación de los mismos por los CDs: (a) adición del radical a enlaces C=C ricos en electrones presentes en los CDs, (b) abstracción de H de los grupos superficiales disponibles (-COOH, -SH, -OH) (Figura 17a) y (c) tras la excitación de los GCDs por la luz, interacción entre el orbital SOMO (orbital molecular ocupado por un solo electrón) de baja energía del radical y la banda de conducción de los GCDs de mayor energía (Figura 17b). Después de cualquiera de las posibilidades anteriores, los electrones desapareados pueden deslocalizarse por resonancia dentro de los nano-dominios conjugados de los CDs y/o por una reordenación de enlaces químicos.

4 CONCLUSIONES

El empleo de biomasa como materia prima para sintetizar CDs es una forma sostenible de revalorizar desechos industriales. En este trabajo se sintetizaron con éxito por vía hidrotermal CDs a partir de desechos domésticos de té (TCDs) e industriales de bagazo de uva (P1CDs y P2CDs).

Los CDs mostraron ser dispersables tanto en agua como en medios no acuosos y tener propiedades antioxidantes. Además, se fabricaron CDs de ácido cítrico/glutación como modelo representativo de CDs obtenidos a partir de moléculas pequeñas y mediante síntesis hidrotermal. En medio acuoso, las propiedades antioxidantes de todos los CDs obtenidos fueron determinadas por DPPH y los resultados demostraron que pueden competir favorablemente con compuestos estándar como el ácido ascórbico y la vitamina E, como lo demuestran los valores de EC_{50} para el poder de reducción de 50, 75 y 175 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para TCDs, P2CDs y GCDs, respectivamente.

La solubilidad de los CDs en medios no acuosos ha permitido su empleo como aditivos antioxidantes GCDs y TCDs en un aceite lubricante base y los resultados indicaron que los CDs son candidatos con potencial para jugar un doble papel: la protección oxidativa de lubricantes minerales y los basados en aceites biodegradables (p.e., aceites vegetales) y actuar como nano-aditivos verdes con funciones de anti-fricción y anti-desgaste en los mismos.

Este trabajo supone un paso adelante hacia el uso de CDs como aditivos antioxidantes verdes no sólo en aceites lubricantes (minerales y/o biodegradables) sino también en otros productos comerciales como son cosméticos o en películas (films) para recubrimiento de alimentos y otros productos sensibles a la oxidación.

El aprovechamiento de desechos vegetales para preparar nano-partículas con un valor añadido, como son los CDs con actividad antioxidante, brinda una oportunidad extraordinaria para estudiar el papel que desempeña la composición de los materiales de partida, en particular en términos de su actividad antioxidante, del potencial citotóxico de los CDs y los procedimientos de síntesis enfocados en la química verde.

5 BIBLIOGRAFÍA

- [1] C.M. Carbonaro, R. Corpino, M. Salis, F. Mocci, S.V. Thakkar, C. Olla, P.C. Ricci. On the emission properties of carbon dots: reviewing data and discussing models; *J. Carbon Res.*, 2019, **5**, 60. <https://doi.org/10.3390/c5040060>
- [2] S. Ross, R.S. Wu, S.C. Wei, G.M. Ross, H.T. Chang. The analytical and biomedical applications of carbon dots and their future theranostic potential: a review; *J. Food Drug Anal.*, 2020, **28**, 677-695. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.1154>
- [3] A.M.El-Shafey, Carbon dots: Discovery, structure, fluorescent properties, and applications; *Green Processing and Synthesis*, 2021, 10, 134-156. <https://doi.org/10.1515/gps-2021-0006>
- [4] M. Pan, X. Xie, K. Liu, J. Yang, L. Hong, S. Wang. Fluorescent Carbon Quantum Dots-Synthesis, Fuctionalization and Sensing Application in Food Analysis; *Nanomaterials*, 2020, **10**, 930. <https://doi.org/10.3390/nano10050930>
- [5] M. Kurian, A. Paul; Recent trends in the use of green sources for carbon dot synthesis-A short review; *Carbon Trends*, 2021, **3**, 100032. <https://doi.org/10.1016/j.cartre.2021.100032>
- [6] N. Babbar, H.S. Oberoi. Enzymes in value-addition of agricultural and agro-industrial residues. In *Enzymes in Value-Addition of Wastes*; S.K. Brar, M. Verma, Eds.; Nova Science Publishers, Inc.: New York, NY, USA 2014, 29–50

- [7] M. Tuerhong, Y. Xu, X.B. Yin. Review on Carbon Dots and Their Applications; *Chin. J. Anal. Chem.*, 2017, **45**, 139-150. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(16\)60990-8](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(16)60990-8)
- [8] Yang, D.; Li, L.; Cao, L.; Chang, Z.; Mei, Q.; Yan, R.; Ge, M.; Jiang, C.; Dong, W.F. Green Synthesis of Lutein-Based Carbon Dots Applied for Free-Radical Scavenging within Cells; *Materials*, 2020, **13**, 4146. <https://doi.org/10.3390/ma13184146>
- [9] A. Bayat, S. Masoum, E. S. Hosseini. Natural plant precursor for the facile and eco-friendly synthesis of carbon nanodots with multifunctional aspects; *Journal of Molecular Liquids*, 2019, **281**,134-140, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.02.074>.
- [10] V. Roshni V., V. Gujar, H. Pathan, S. Islam, M. Tawre, K. Pardesi, M. K. Santra, D. Ottoor. Bioimaging Applications of Carbon dots (C. dots) and its Cystamine Functionalization for the Sensitive Detection of Cr(VI) in Aqueous Samples; *J Fluoresc.* 2019, **29**, 1381–1392 <https://doi.org/10.1007/s10895-019-02448-3>
- [11] G. Huang, Y. Lin, L. Zhang, et al. Synthesis of Sulfur-Selenium Doped Carbon Quantum Dots for Biological Imaging and Scavenging Reactive Oxygen Species; *Sci Rep*, 2019, **9**, 19651. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55996-w>
- [12] F. Lu, S. Yang, Y. Song, C. Zhai, Q. Wang, G. Ding, Z. Kang. Hydroxyl functionalized carbon dots with strong radical scavenging ability promote cell proliferation; *Mater. Res. Express*, 2019, **6**, 065030. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab0c55>
- [13] J.S. Lin, Y.W. Tsai, K. Dehvari, C.C. Huang, J.Y. Chang. A carbon dot based theranostic platform for dual modal imaging and free radical scavenging; *Nanoscale*, 2019, **11**, 20917. <https://doi.org/10.1039/C9NR05746C>
- [14] K. Chen, W. Qing, W. Hu, M. Lu, Y. Wang, X. Liu. On-off-on fluorescent carbon dots from waste tea: Their properties, antioxidant and selective detection of CrO_4^{2-} , Fe^{3+} , ascorbic acid and L-cysteine in real samples;

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019, **213**, 228-234. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.01.066>

[15] S. Zou, X. Zhu, L. Zhang, L. et al. Biom mineralization-Inspired Synthesis of Cerium-Doped Carbonaceous Nanoparticles for Highly Hydroxyl Radical Scavenging Activity; *Nanoscale Res Lett*, 2018, **13**, 76. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2427-8>

[16] F. Li, T. Li, C. Sun, J. Xia, Y. Jiao, H. Xu. Selenium-Doped Carbon Quantum Dots for Free-Radical Scavenging; *Angew. Chem.*, 2017, **129**, 9910–9914. <https://doi.org/10.1002/anie.201705989>

[17] L.A. Chunduri, A. Kurdekar, S. Patnaik, S. Rajasekhar Aditha, C. Prathibha, V. Kamiseti. Single Step Synthesis of Carbon Quantum Dots from Coconut Shell: Evaluation for Antioxidant Efficacy and Hemotoxicity; *J. Mater. Sci. Appl.*, 2017, **3**, 83–93.

[18] L.A. Chunduri, A. Kurdekar, S. Patnaik, B.V. Dev, T.M. Rattan, V. Kamiseti. Carbon Quantum Dots from Coconut Husk: Evaluation for Antioxidant and Cytotoxic Activity; *Mater. Focus*, 2016, **5**, 55–61. <https://doi.org/10.1166/mat.2016.1289>

[19] A. Sachdeva, P. Gopinath. Green synthesis of multifunctional carbon dots from coriander leaves and their potential application as antioxidants, sensors and bioimaging agents. *Analyst*, 2015, **140**, 4260-4269. <https://doi.org/10.1039/C5AN00454C>

[20] S. Zhao, M. Lan, X. Zhu, H. Xue, T.-W. Ng, X. Meng, C-S Lee, P. Wang, W. Zhang. Green Synthesis of Bifunctional Fluorescent Carbon Dots from Garlic for Cellular Imaging and Free Radical Scavenging; *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, **7**, **31**, 17054–17060. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b03228>

[21] T. Díaz-Faes López, A. Fernández González, M.E. Díaz-García, R. Badía-Laiño. Highly efficient Förster resonance energy transfer between carbon nanoparticles and europium–tetracycline complex; *Carbon*, 2015, **94**, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.06.066>

- [22] Y. Zhuo, H. Miao, D. Zhong, S. Zhu, X. Yang. One-step synthesis of high quantum-yield and excitation-independent emission carbon dots for cell imaging; *Mat. Lett.*, 2015, **139**, 197–200. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.10.048>
- [23] H. Wang, M.L. Zhang, Y. Ma, B. Wang, H. Huang, Y. Liu, M. Shao, Z. Kang. Carbon Dots Derived from Citric Acid and Glutathione as a Highly Efficient Intracellular Reactive Oxygen Species Scavenger for Alleviating the Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Macrophages; *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, **12**, 41088–41095. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c11735>
- [24] N.R. Wilson, P.A. Pandey, R. Beanland, R.J. Young, I.A. Kinloch, L. Gong, Z. Liu, K. Suenaga, J.P. Rourke, S.J. York, J. Sloan. Graphene Oxide: Structural Analysis and Application as a Highly Transparent Support for Electron Microscopy; *ACS Nano*, 2009, **3(9)**, 2547–2556. <https://doi.org/10.1021/nn900694t>
- [25] B. Li, Y. Nan, P. Zhang, X. Song. Structural characterization of individual graphene sheets formed by arc discharge and their growth mechanisms; *RSC Adv.*, 2016, **6**, 19797–19806. <https://doi.org/10.1039/C5RA23990G>
- [26] N. Zarrinbakhsh, T. Wang, A. Rodriguez-Urbe, M. Misra, A.K. Mohanty. Characterization of wastes and coproducts from the coffee industry for composite material production; *BioResources*, 2016, **11**, 7637–7653. <https://doi.org/10.15376/biores.11.3.7637-7653>
- [27] N. Zarrinbakhsh, A.K. Mohanty, M. Misra. Fundamental studies on water-washing of the corn ethanol coproduct (DDGS) and its characterization for biocomposite applications; *Biomass and Bioenergy*, 2013, **55**, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.016>
- [28] Díez-Pascual, A.M.; Díez-Vicente, A.L. Poly(propylene fumarate)/polyethylene glycol-modified Graphene oxide nanocomposites for tissue engineering; *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, **8 (28)**, 17902–17914. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b05635>

- [29] J.A. Luceño-Sánchez, G. Maties, C. Gonzalez-Arellano, M.A. Diez-Pascual. Synthesis and Characterization of Graphene Oxide Derivatives via Functionalization Reaction with Hexamethylene Diisocyanate; *Nanomaterials*, 2018; **8(11)**, 870. <https://doi.org/10.3390/nano8110870>
- [30] K. Dimos, Carbon Quantum Dots: Surface Passivation and Functionalization; *Curr. Org. Chem.*, 2016, **20**, 682–695. <https://doi.org/10.2174/1385272819666150730220948>
- [31] K.O. Vieira, J. Bettini, L.F.C. de Oliveira, J.L. Ferrari, M.A. Schiavon. Synthesis of Multicolor Photoluminescent Carbon Quantum Dots Functionalized with Hydrocarbons of Different Chain Lengths; *Carbon*, 2017, **124**, 729. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.08.052>
- [32] D. Wood, J. Tauc. Weak Absorption Tails in Amorphous Semiconductors; *Phys. Rev. B*, 1972, **5**, 3144–3151. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.5.3144>
- [33] Pan, Y.; Inam, F.; Zhang, M.; Drabold, D.A. Atomistic Origin of Urbach Tails in Amorphous Silicon; *Phys. Rev. Lett.* 2008, **100**, 206403
- [34] Studenyak, I.P.; Kranjčec, M.; Kurik, M. Urbach Rule in Solid State Physics; *Int. J. Optics Appl.*, 2014, **4**, 76–83. <https://doi.org/10.5923/j.optics.20140403.02>
- [35] A. Sciortino, M. Cannas, F. Messina. Temperature-dependence of solvent-induced Stokes shift and fluorescence tunability in carbon nanodots; *J. Carbon Res.*, 2019, **5**, 20. <https://doi.org/10.3390/c5020020>
- [36] F. Liu, Y. Sun, Y. Zheng, N. Tang, M. Li, W. Zhong, Y. Du. Gram-scale synthesis of high-purity graphene quantum dots with multicolour photoluminescence; *RSC Adv.*, 2015, **5**, 103428–103432. <https://doi.org/10.1039/C5RA19219F>
- [37] H. Ding, X.H. Li, X.B. Chen, J.S. Wei, X.B. Li, H.M. Xiong, Surface states of carbon dots and their influences on luminescence; *J. App. Phys.*, 2020, **127**, 231101. <https://doi.org/10.1063/1.5143819>

-
- [38] S. Zhu, Q. Meng, L. Wang, J. Zhang, Y. Song, H. Jin, K. Zhang, H. Sun, H. Wang, B. Yang. Highly Photoluminescent Carbon Dots for Multicolor Patterning, Sensors and Bioimaging; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 3953–3957. <https://doi.org/10.1002/ange.201300519>
- [39] J. Tang, J. Zhang, Y. Zhang, Y. Xiao, Y. Shi, Y. Chen, L. Ding, W. Xu, Influence of group modification at the edges of carbon quantum dots on fluorescent emission; *Nanoscale Res. Lett.*, 2019, **14**, 241. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3079-7>
- [40] P.C. Hsu, H.T. Chang. Synthesis of High-quality Carbon Nano Dots from Hydrophilic Compounds: Role of Functional Groups; *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 3984–3986. <https://doi.org/10.1039/C2CC30188A>
- [41] J.C. Sánchez-Rangel, J. Benavides, J.B. Heredia, L. Cisneros-Zevallos, D.A. Jacobo-Velázquez. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination; *Anal. Methods*, 2013, **5**, 5990–5999. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- [42] G.A. Agbor, J.A. Vinson, P.E. Donnelly. Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay; *Int. J. Food Sci., Nutr. Diet.*, 2014, **3**, 147–156. <https://doi.org/10.19070/2326-3350-1400028>
- [43] V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents; *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, **16**, 144–158. <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144.full.pdf+html>
- [44] T. Afsar1, S. Razak, M.R. Khan, S. Mawash, A. Almajwal, M. Shabir, I. Ul Haq. Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydaspica* R. Parker aerial parts; *Complementary and Alternative Medicine*, 2016, **16**: **258**. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1240-8>
- [45] C.Z. Shen, H.Y. Jun, S.H. Choi, Y.M. Kim, E.J. Jung, G.S. Oh, S.J. Joo, S.H. Kim, I.K. Kim. Evaluation of Antioxidant Activities and Active Compounds Separated from Water Soluble Extracts of Korean Black Pine

Barks; *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2010, **31**, 3567–3572.
<https://doi.org/10.5012/bkcs.2010.31.12.3567>

[46] M.M. Rebelo, J.K.R. Da Silva, E.H.A. Andrade, J.G.S. Maia. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth; *Rev. Bras. Farmacogn.*, 2019, **19**, 230–235.
<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200009>

[47] H. Amiri, Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanolic Extract of *Teucrium orientale* (L.) subsp. *Taylori* (Boiss.) Rech. f.; *Iran. J. Pharm. Res.*, 2010, **9**, 417–423.

[48] Y. Bellik, F. Benabdesselam, A. Ayad, Z. Dahmani, L. Boukraa, A. Nemmar, M. Iguer-Ouada. Antioxidant Activity of the Essential Oil and Oleoresin of *Zingiber Officinale* Roscoe as Affected by Chemical Environment; *International Journal of Food Properties*, 2013, **16:6**, 1304–1313, <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.584257>

[49] C. Murru, R. Badía-Laiño, M.E. Díaz-García. Synthesis and Characterization of Green Carbon Dots for Scavenging Radical Oxygen Species in Aqueous and Oil Samples; *Antioxidants*, 2020, **9**, 1147.
<https://doi.org/10.3390/antiox9111147>

[50] E.A. Eissa, J.S. Basta, V. Ibrahim, The Oxidation Stability of Lubricating Oil; *Pet. Sci. Technol.*, 2010, **28**, 1611–1619.
<https://doi.org/10.1080/10916460903160800>

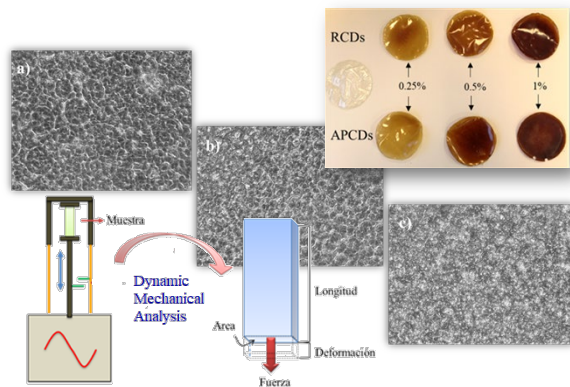
[51] C. Murru, R. Badía Laiño, M.E. Díaz-García. Oxidative Stability of Vegetal Oil-Based Lubricants; *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2021, **9(4)**, 1459–1476. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c06988>

[52] ISO 27107:2008. Animal and Vegetable Fats and Oils. Determination of Peroxide Value. Potentiometric End-Point Determination.
<https://www.iso.org/standard/43999.html>

-
- [53] S. Christé, J.C.G. Esteves da Silva, L Pinto da Silva. Evaluation of the Environmental Impact and Efficiency of N-Doping Strategies in the Synthesis of Carbon Dots; *Materials*, 2020, **13**, 504. <https://doi.org/10.3390/ma13030504>
- [54] C. Chimeno-Trinchet, M.E. Pacheco, A. Fernández-González, M.E. Díaz-García, R. Badía-Laiño, New metal-free nanolubricants based on carbon-dots with outstanding antiwear performance; *J. Ind. Eng. Chem.*, 2020, **87**, 152-161. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.03.032>
- [55] J. Espina Casado, A. Fernández-González, M.E. Díaz-García, R. Badía-Laiño. Smart carbon dots as additive and chemosensor for control water contamination in lubricants; *Sensors and Actuators, B*, 2021, **329**, 120262. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129262>
- [56] IMCA. Understanding Biodegradable Lubricants: An Introduction to “Green” Oil in Hydraulic Systems Oshore; International Marine Contractors Association (IMCA): London, UK, 2014
- [57] W. Chaiyvaist, D.J. McClements, J. Weiss, E.A. Decker. Impact of Surface-Active Compounds on Physicochemical and Oxidative Properties of Edible Oil; *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 550–556. <https://doi.org/10.1021/jf072071o>
- [58] S.R. Morrison. Electrochemistry at Semiconductor and Oxidized Metal Electrodes; Plenum Press: New York, NY, USA, 1980
- .
- [59] R.G. Pearson. Absolute Electronegativity and Hardness: Application to Inorganic Chemistry; *Inorg. Chem.* 1988, **27**, 734–740. <https://doi.org/10.1021/ic00277a030>

CAPÍTULO 3

Fabricación de bio-películas proteicas reforzadas con puntos cuánticos de carbono: estudio reológico y mecánico



1 INTRODUCCIÓN

El primer plástico sintético se produjo en 1907, lo que marcó el comienzo de la industria mundial del plástico; sin embargo, no fue hasta la década de los 50 que se produce un rápido crecimiento de la producción mundial. Durante los siguientes 65 años, la producción anual aumentó casi 200 veces hasta alcanzar los 381 millones de toneladas en 2015. Hoy en día, los principales productores de plásticos son China (23%), Europa (21%), América del Norte (20%) y el resto de Asia (excluida China; 21%). Los plásticos ofrecen muchas ventajas para aplicaciones específicas porque son fáciles de moldear, no se corroen ni se descomponen y sus características pueden adaptarse a las necesidades específicas mediante el uso de composites o la adición de aditivos específicos. El principal problema de estos materiales radica en que su reciclaje no es fácil, incluso en países con sistemas avanzados de gestión de residuos y una larga experiencia en esta actividad. Las tasas de reciclaje de plástico suelen ser mucho más bajas que las tasas de otros materiales, esto también se debe en parte a la gran variedad de plásticos, aditivos y compuestos utilizados [1].

La industria del plástico ofrece servicios importantes para una gran variedad de industrias, que incluyen embalaje, construcción, electrónica, aeroespacial y transporte. De la demanda total de plástico en Europa, más de 20.000 millones de kilos se utilizan para envases y se estima que 8.200 millones de kilos de este se utilizan para productos alimenticios [2].

Debido a la creciente concienciación de la población con respecto al medio ambiente y a la sostenibilidad, junto con las demandas de los consumidores de una mayor calidad y una vida útil más prolongada de los alimentos, muchos

países han prohibido las películas y los recubrimientos de plástico sintético no degradables que se utilizan para proteger los alimentos durante el transporte y el almacenamiento. Como resultado, ha ido creciendo el interés por el desarrollo de materiales biodegradables y/o comestibles y se han investigado muchos nuevos materiales de envasado basados en biopolímeros que tienen ventajas claves sobre los recubrimientos artificiales y las películas sintéticas.

Los biopolímeros utilizados para aplicaciones alimentarias se pueden obtener a través de diferentes recursos renovables: a) extraídos de biomasa (por ejemplo, polisacáridos, proteínas y lípidos), b) por síntesis de monómeros bioderivados (por ejemplo, ácido poliláctico, PLA) y c) producidos por microorganismos (por ejemplo, polihidroxialbutirato, polihidroxialcanoato). Dadas sus diferentes características físico-químicas, estas fuentes renovables de biomoléculas se pueden combinar para producir materiales con ventajas superiores en comparación con sus constituyentes, como propiedades de barrera (para la humedad, oxígeno, dióxido de carbono) y propiedades mecánicas más eficientes. Recientemente se han publicado excelentes artículos dedicados al desarrollo de películas y recubrimientos de biopolímeros para aplicaciones alimentarias [3,4]. Todos los materiales descritos en la literatura cumplen la misma función cuando se utilizan en envases: protección del producto de los efectos de deterioro de las condiciones ambientales externas como calor, luz, presencia o ausencia de humedad, presión, microorganismos, emisiones gaseosas, etc.

En los últimos años el concepto de Envase ha evolucionado y adquirido un nuevo significado. Las empresas alimentarias ya no buscan solo una barrera protectora entre el producto alimenticio y los agentes externos, sino una nueva generación de materiales capaces de interactuar entre el envase y el producto para brindar protección activa al alimento. Esta nueva generación de envases se denomina Envases Activos. El envase activo se puede definir como un sistema en el que el producto, el envase y el entorno interactúan de forma positiva para alargar la vida útil o para conseguir alguna mejora en las

características [5]. Los envases activos están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que se liberan o que absorben sustancias hacia o desde el alimento y el entorno que rodea a los alimentos (Reglamentos (CE) No 450/2009, 2016 sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos [6]).

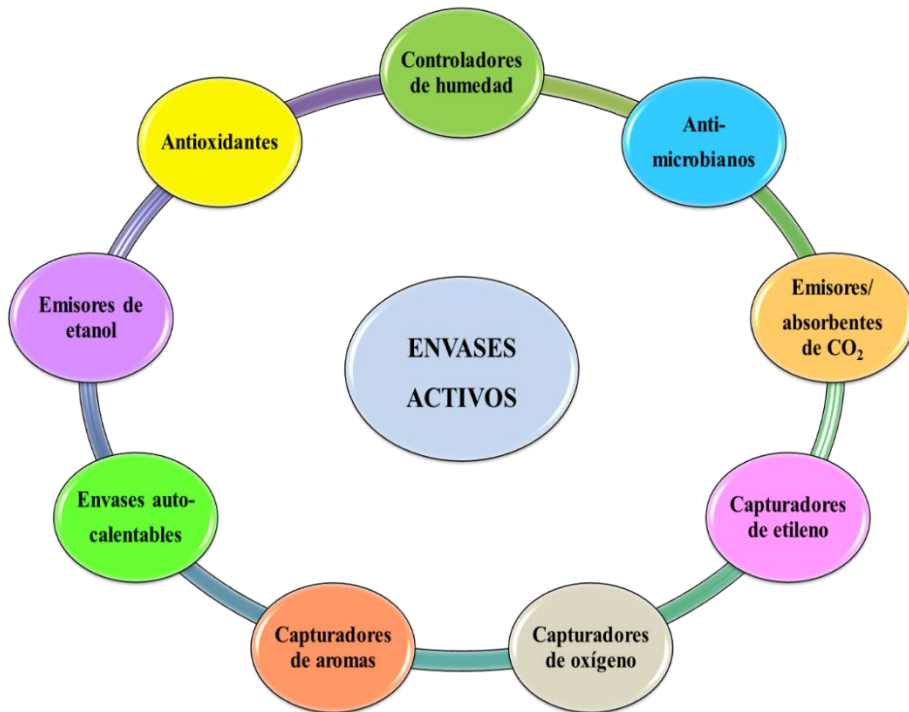


Figura 1. Diferentes acciones que pueden llevar a cabo los envases activos

Mejorar la conservación de los alimentos en el envase y prolongar su vida útil implica la aplicación de varias estrategias como control de temperatura, eliminación de oxígeno, control de humedad, adición de productos químicos como sal, azúcar, dióxido de carbono o ácidos naturales o una combinación de

estos con un embalaje eficaz. Los envases activos pueden realizar diferentes funciones, tal y como se muestra en la Figura 1.

Los problemas medioambientales originados por la producción y acumulación de plásticos, ha motivado la demanda de materiales biodegradables y que, a su vez, sean derivados de fuentes renovables. Se han elaborado soluciones de envasado innovadoras utilizando recursos biológicos renovables, generalmente denominados bioplásticos, los cuales se pueden obtener por varias vías [7]: metabolismo de microorganismos (p. ej., polihidroxibutirato), síntesis química de monómeros bioderivados (p. ej., polilactato), biomasa vegetal (p. ej., almidón y celulosa) y subproductos de industrias alimentarias (p. ej., gelatina, proteína de suero) (Figura 2).

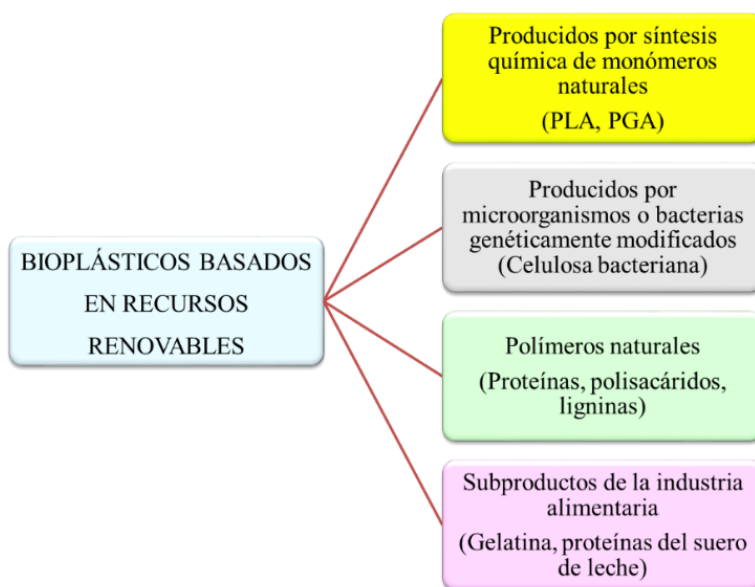


Figura 2. Bioplásticos renovables clasificados según su origen (PLA: ácido poliláctico, PGA: ácido poliglicólico)

Entre las anteriores biomoléculas, los polisacáridos, proteínas y lípidos son materias primas que se utilizan para preparar agro-polímeros mediante

diferentes técnicas que muy a menudo incluyen la extracción y purificación antes de su uso.

Se ha investigado ampliamente en el uso de polisacáridos y proteínas como materias primas para el desarrollo películas para envasado. En el proceso de formación de películas, es necesario desnaturalizar las proteínas para formar estructuras más extendidas, ya que después de la desnaturalización las cadenas proteicas tienden a asociarse dando como resultado películas con una estructura resistente, aunque con características elásticas deficientes. Muchas investigaciones se han centrado en mejorar las propiedades elásticas de las películas modificándolas mediante métodos físicos, químicos y bioquímicos, así como mezclándolas con otros biopolímeros [8].

En este estudio, se describirá la preparación de bio-películas activas empleando polímeros naturales como son el caseinato de sodio y la pectina como materias primas y puntos cuánticos de carbono como aditivo activo. El caseinato de sodio es un polímero soluble en agua que puede dispersarse rápidamente en mezclas acuosas y homogeneizarse en presencia de grasa o aceite. Se ha demostrado que posee una estructura de espiral aleatoria y es estable en disolución a $\text{pH} = 6,5$ con una escasa solubilidad cerca de su punto isoelectrico ($\sim 4,6$) [9]. Su capacidad para formar interacciones moleculares (enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas) lo convierte en un buen candidato para producir películas bio-compatibles y con buena resistencia. Por otra parte, la pectina es un polisacárido aniónico que constituye las paredes celulares de la mayoría de las plantas y se ha utilizado ampliamente en las industrias farmacéutica y alimentaria debido a sus propiedades gelificantes. Químicamente, la pectina es un polímero heterogéneo, sus moléculas están compuestas por una cadena lineal de ácido $(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-galacturónico}$. Algunas de las unidades de ácido galacturónico están esterificadas con grupos metilo, como se muestra en la Figura 3, y forman el ácido poligalacturónico, que puede esterificarse a metoxilo o tener grupos ácidos libres. La pectina comercial generalmente tiene un grado de

esterificación del 50%, lo que otorga la marca para la clasificación de la pectina comercial como altamente metoxilada alta (HM) y poco metoxilada (LM) [10]. Las características químicas de la pectina la convierten en un material ideal para la mejora de las propiedades mecánicas de películas obtenidas a partir de caseinato de sodio con una estructura fuerte pero poco elástica.

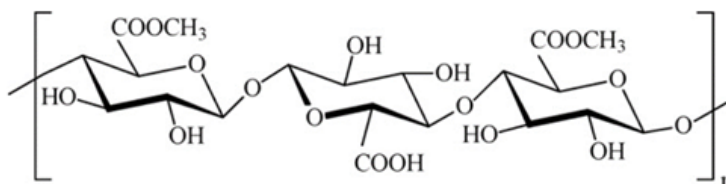


Figura 3. Estructura química de la pectina

Gracias a su facilidad de síntesis, su bajo coste, su bio-compatibilidad y sus propiedades antioxidantes, los puntos de carbono pueden definirse como excelentes candidatos como posibles aditivos ecológicos para la preparación de envases y/o recubrimientos activos para alimentos.

En este trabajo se analizará la influencia que tiene la adición de puntos de carbono (CDs) obtenidos a partir de recursos renovables como magaya de manzana y hojas de romero en las propiedades reológicas y mecánicas de suspensiones de caseinato sódico y pectina y de las películas resultantes.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Protocolos de síntesis

2.1.1. Preparación de la suspensión caseinato sódico/pectina

La suspensión para la preparación de las películas se obtuvo mezclando caseinato sódico (CAS) y pectina altamente metoxilada (HMP), suministradas por Merk Co., en una relación 1:3. La elección de esta composición se basó en un estudio previo de M. Jahromi y col. [11], combinación que ofreció los mejores resultados en cuanto a resistencia y elasticidad de la estructura de la película.

Se prepararon dos suspensiones madre de CAS y HMP en agua destilada a una concentración del 2% (p/p), con agitación suave durante 4 horas a temperatura ambiente, tras lo cual las soluciones se almacenaron a 5 ° C durante 18 horas para asegurar la hidratación completa de las moléculas. Finalmente, las suspensiones de trabajo se prepararon adicionando gota a gota y con agitación la cantidad adecuada de suspensión de CAS a un volumen dado de la suspensión de HMP a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 90 minutos para su homogeneización.

2.1.2. Síntesis de CDs a partir de magaya de manzana y hojas de romero

Los CDs se fabricaron a partir de romero y magaya de manzana mediante una síntesis hidrotermal de acuerdo con el siguiente protocolo: se colocaron 20 g de cada materia prima en vasos independientes de vidrio pyrex y se calentaron en un horno durante 5 horas a 200°C. Durante el proceso de calentamiento, se agregaron varias alícuotas de agua destilada (5 mL cada 30 min) para evitar que el producto se carbonizara. Una vez enfriados los vasos a temperatura ambiente, el polvo negro obtenido se mezcló con 20 mL de agua

destilada y se centrifugó a 12000 rpm durante 50 minutos para eliminar cualquier precipitado. Los sobrenadantes se filtraron al vacío a través de papel de filtro con poros de 0,40 μm y después se purificaron usando un sistema de nanofiltración continuo (MWCO 5 kDa) durante 1 hora. Finalmente, las disoluciones concentradas se liofilizaron mediante un liofilizador al vacío. Los CDs obtenidos se almacenaron a 2 °C hasta su uso posterior. El rendimiento de síntesis resultó ser del 5,8% para los CDs de romero (RCDs) y del 4,5% para los CDs de magaya de manzana (APCDs). Todos los CDs resultaron ser solubles en agua y en etanol.

2.1.3. Preparación de las dispersiones CAS/HMP con los CDs

Para la preparación de películas CAS/HMP enriquecidas con CDs, se mezclaron 25 mL de una suspensión de CAS (2% v/v) y 75 mL de una suspensión de HMP (2% v/v), agregando diferentes volúmenes de disolución de CDs para alcanzar concentraciones de 0%, 0,25%, 0,5% y 1,0% p/p, mezclas a las que en lo sucesivo nos referiremos como CAS/HMP, CAS/HMP+0,25CDs, CAS/HMP+0,5CDs y CAS/HMP+1,0CDs respectivamente). Se depositaron 40 mL de cada una de las suspensiones y glicerol como plastificante (p/p) en una placa Petri de plástico (90 mm de diámetro) y la mezcla se secó durante 24h a 40°C. Finalmente, las películas secas se despegaron de la placa y se acondicionaron durante 72h a temperatura ambiente y humedad relativa del 53% en un desecador que contenía en su base una disolución saturada de nitrato de magnesio.

2.2. Estudio del comportamiento reológico

2.2.1. Fundamento teórico del estudio reológico

Antes de analizar los resultados experimentales obtenidos, es necesario describir el fundamento teórico del modelo reológico que se ha utilizado en este trabajo. La reología es la ciencia del flujo y la deformación de la materia y describe la interrelación entre fuerza, deformación y tiempo. El término proviene del griego *rheos* que significa fluir [12]. Un fluido se define como cualquier sustancia que se deforma al aplicarle un esfuerzo tangencial sin importar la magnitud del mismo. Ese esfuerzo puede ser una compresión, una tensión o una fuerza de cizalla. Los fluidos se pueden clasificar en función de su comportamiento al ser sometidos a una fuerza de cizalla. Así, si un fluido se somete a una carga aplicada deformándose ligeramente y recupera su forma inicial tras eliminar la carga, se dice que este comportamiento es elástico. Los materiales elásticos ideales siguen la ley de Hooke, que describe la proporcionalidad entre el esfuerzo aplicado y la deformación, según la Ecuación 1:

$$\tau = G \cdot \gamma \quad \text{Ecuación 1}$$

en la que τ es el esfuerzo cortante, G el módulo de rigidez y γ la deformación. Esta fórmula indica que, si se aplica un esfuerzo τ sobre el material, éste sufrirá una deformación γ la cual se mantendrá mientras el esfuerzo no cese, siempre que no se haya superado el límite elástico del material.

Por el contrario, si un material no recupera su forma tras eliminar la carga aplicada, se dice que su comportamiento pertenece a un sistema viscoso, el cual se describe según la Ecuación 2 (ley de Newton):

$$\tau = \mu \times \dot{\gamma} \quad \text{Ecuación 2}$$

en la que μ es la viscosidad dinámica ($Pa \times s$), τ es el esfuerzo cortante (Pa) y $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación o tasa de cizallamiento (s^{-1}). Todos los materiales que se comportan según esta ecuación se denominan fluidos newtonianos.

Ambas leyes, la de Newton y Hooke no explican el comportamiento de algunos materiales que se comportan al mismo tiempo como un sólido ideal (elástico) y un líquido ideal (viscoso). Estos materiales poseen un efecto de memoria que se manifiestan en aquellos experimentos en los que el fluido se somete a esfuerzos que dependen del tiempo como oscilación, relajación, etc. A tal comportamiento se le denomina viscoelasticidad. En los materiales viscoelásticos una parte de la energía de deformación se disipa en fluir y otra parte se almacena para recuperar parcialmente su forma original, una vez que se detiene la fuerza aplicada [13].

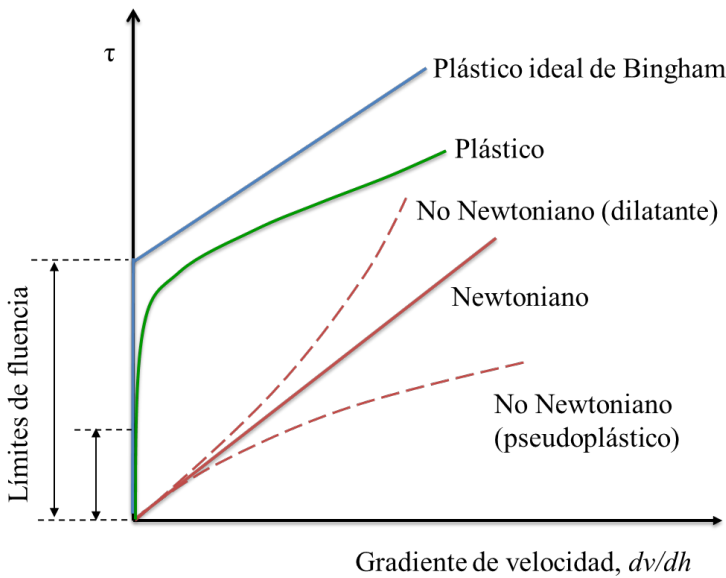


Figura 4. Tipos de fluidos atendiendo al comportamiento de la viscosidad

Si se representa el esfuerzo aplicado en función de la velocidad de deformación (curva de flujo), se observan diferentes comportamientos que permiten identificar la característica no-newtoniana dominante del fluido, como se muestra en la Figura 4.

En los fluidos con comportamiento *pseudoplástico* la viscosidad aparente (pendiente de la curva de flujo en cada punto) disminuye al aumentar la velocidad de deformación. Algunos ejemplos de este comportamiento son la mostaza, el chocolate, pinturas, etc. En el caso de los fluidos *dilatantes*, se observa un aumento de la viscosidad al aumentar el esfuerzo, como por ejemplo en algunas suspensiones de proteínas o disoluciones de detergentes. En el comportamiento *viscoplástico*, se precisa alcanzar un valor mínimo de esfuerzo, característico del material, para que empiece a fluir. El valor de ese esfuerzo crítico se le denomina *límite de fluencia*. Por debajo de ese valor, el material se comporta como un sólido elástico y, una vez superado, empieza a fluir, pudiéndolo hacer siguiendo una ley lineal, como es el caso de los denominados plásticos de Bingham.

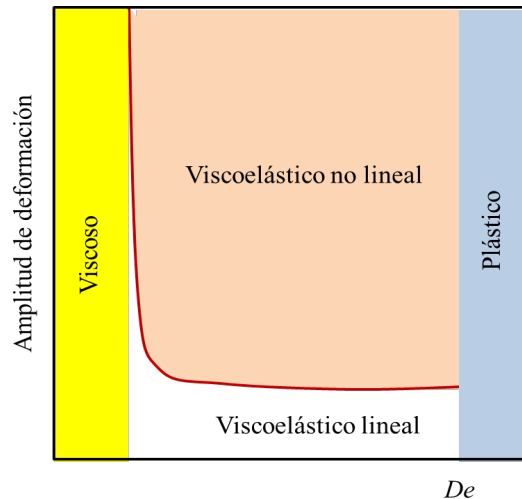


Figura 5. Comportamiento de un material en función de la amplitud de deformación y el número de Deborah

Un parámetro que se utiliza para caracterizar el comportamiento viscoelástico/viscoso/elástico de un material es el número de Deborah (nombre que procede del antiguo testamento: “las montañas fluyeron delante del Señor”) [14], un número adimensional definido como:

$$De = \lambda/t \quad \text{Ecuación 3}$$

donde t es un tiempo característico del proceso de deformación al que se somete una determinada sustancia y λ es un tiempo de relajación característico de dicha sustancia; el tiempo de relajación es infinito para un sólido de Hooke, para polímeros fundidos es del orden de 10^{-6} s y de 10^{-12} s para el agua. Según el concepto de este parámetro, el comportamiento de una sustancia puede ser viscoso si $De < 1$, elástico si $De > 1$ y viscoelástico si $De \approx 1$. De acuerdo a esta clasificación cualitativa, en un diagrama Esfuerzo de deformación vs De se pueden observar tres zonas que corresponden a diferentes comportamientos: viscoso a valores de bajos, elástico a valores de altos y viscoelástico a valores de intermedios (Figura 5).

En la caracterización reológica de polímeros y biopolímeros, los métodos recomendados para determinar las propiedades viscoelásticas lineales son las pruebas oscilatorias y de recuperación, en las que la tensión aplicada suele ser baja para no provocar cambios irreversibles en la estructura del material. En estos ensayos oscilatorios cuando la muestra es sometida a una pequeña deformación el esfuerzo generado es también sinusoidal y tiene la misma frecuencia que la deformación, aunque en muchas ocasiones el esfuerzo no está en fase con la deformación sino desplazado un cierto ángulo de fase δ . Las ecuaciones que describen las funciones sinusoidales de deformación y esfuerzo son, respectivamente:

$$\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega t) \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\tau = \tau_0 \text{sen}(\omega t + \delta) \quad \text{Ecuación 5}$$

en la que γ_0 es la amplitud de la deformación máxima, τ_0 es el esfuerzo máximo, ω la velocidad angular de la deformación (dada por $\omega = 2\pi f$, donde f es la frecuencia) y t es el tiempo. Por otra parte, las funciones del material se definen a partir del esfuerzo de cizalla sinusoidal, el cual se puede descomponer en dos componentes sinusoidales, una en fase con la deformación ($\text{sen } \omega t$) y otra fuera de fase un ángulo de 90° :

$$\tau = \tau_0 \cos(\delta) \text{sen}(\omega t) + \tau_0 \text{sen}(\delta) \cos \omega t \quad \text{Ecuación 6}$$

Trigonométricamente también se puede establecer que:

$$\tan \delta = \frac{\text{sen}(\delta)}{\cos(\delta)} \quad \text{Ecuación 8}$$

en la que $\tan \delta$ se denomina *tangente de pérdida*. La ecuación [6] se puede reorganizar en función de los parámetros que definen el comportamiento viscoelástico de un material:

$$\tau = \gamma_0 (G' \text{sen}(\omega t) + G'' \cos(\omega t)) \quad \text{Ecuación 8}$$

En la que:

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos(\delta) \quad \text{Ecuación 9}$$

es el módulo elástico o de almacenamiento ya que la energía suministrada por el esfuerzo es temporalmente almacenada durante el ensayo, pero puede ser recuperada una vez liberado el esfuerzo por lo que es una medida de la naturaleza elástica del material y

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \text{sen}(\delta) \quad \text{Ecuación 10}$$

es el módulo viscoso o de pérdidas y va asociado a la energía utilizada para iniciar el flujo y se pierde de forma irreversible como calor, por lo que caracteriza la naturaleza viscosa del material.

Teniendo en cuenta las ecuaciones 9 y 10, la ecuación 7 se puede escribir como

$$\tan \delta = G'' / G' \quad \text{Ecuación 11}$$

Las funciones trigonométricas se pueden expresar en función de números imaginarios. Así,

$$e^{i\theta} = \cos(\theta) + i \operatorname{sen}(\theta) \quad \text{Ecuación 12}$$

siendo $i = \sqrt{-1}$ y ello permite definir un módulo complejo G^* constituido por una parte real G' y una imaginaria G'' :

$$G^* = G' + i G'' \quad \text{Ecuación 13}$$

Por lo que las ecuaciones [9] y [10] también se pueden expresar, respectivamente, como:

$$G' = G^* \cos(\delta) = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos(\delta) \quad \text{Ecuación 14}$$

$$G'' = G^* \operatorname{sen}(\delta) = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \operatorname{sen}(\delta) \quad \text{Ecuación 15}$$

Estas expresiones nos permiten observar que si se somete a oscilación un material elástico puro (muelle ideal), el ángulo de fase es igual a 0° y, por tanto, $G' = G^*$ y $G'' = 0$, mientras que si es un material puramente viscoso (amortiguador ideal) el ángulo de fase es de 90° y, en consecuencia, $G' = 0$ y $G'' = G^*$. Ambos son casos extremos: sólido elástico de Hooke y líquido newtoniano, respectivamente.

En los materiales viscoelásticos, el ángulo de fase está comprendido entre 0° y 90° (Figura 6). El módulo complejo G^* es una medida de la resistencia total del material a la deformación.

Las técnicas de análisis mecánico dinámico permiten determinar el módulo complejo, el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdidas. Se utiliza una terminología diferente para los distintos tipos de deformaciones que sufren los materiales: si la deformación del material se realiza en forma de corte, la terminología utilizada para los módulos es G^* , G' y G'' mientras que cuando

la deformación del material se realiza en forma de tensión o flexión, los módulos se definen como E^* , E' y E'' , respectivamente.

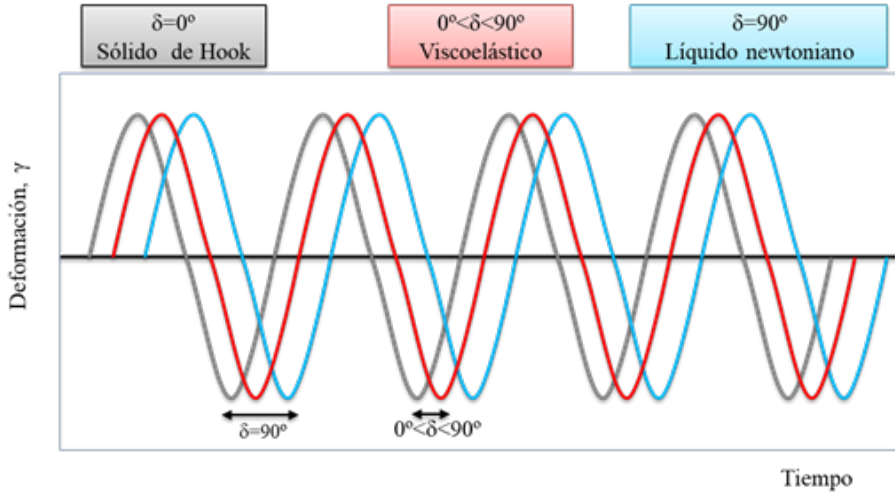


Figura 6. Tipo de respuesta según el comportamiento del material

2.2.2. Instrumentación: Reómetro de cilindro concéntrico

Los instrumentos utilizados para realizar los estudios reológicos se denominan reómetros y pueden acoplar diferentes accesorios geométricos en función de la naturaleza del material que se analiza y de la fuerza que se le quiere aplicar (Figura 7).

En este estudio la geometría elegida para realizar los experimentos reológicos ha sido un reómetro de cilindro concéntrico (TA Instruments), que se basa en el concepto de viscosidad definido por Newton (Ecuación [2]) y su principio se basa en la medida de la fuerza de fricción sobre la superficie de un cilindro rotatorio inmerso en un fluido. Las medidas oscilatorias se llevaron a cabo empleando una amplitud fija en la muestra [15] de modo que la tensión aplicada estuviese dentro de la región viscoelástica lineal (LVR) (Figura 5), lo que significa que las propiedades del material, como la estructura, no se verían afectadas por la tensión aplicada [16]. Este hecho permite investigar la

estructura del material y las interacciones moleculares, [17] y, de esta manera, es posible recopilar información sobre las propiedades microestructurales del material. La región LVR se puede determinar mediante una simple prueba de barrido de deformación (o amplitud), en la que el material se estresa a una frecuencia fija dentro de un cierto intervalo de tensión/deformación y se puede caracterizar como la región donde los módulos elástico (G') y viscoso (G'') no dependen de la deformación. Por lo general, se recomienda aplicar esta prueba de barrido de deformación como el primer paso en las mediciones oscilatorias, ya que determina la región de deformación que se debe utilizar para mediciones oscilatorias posteriores.

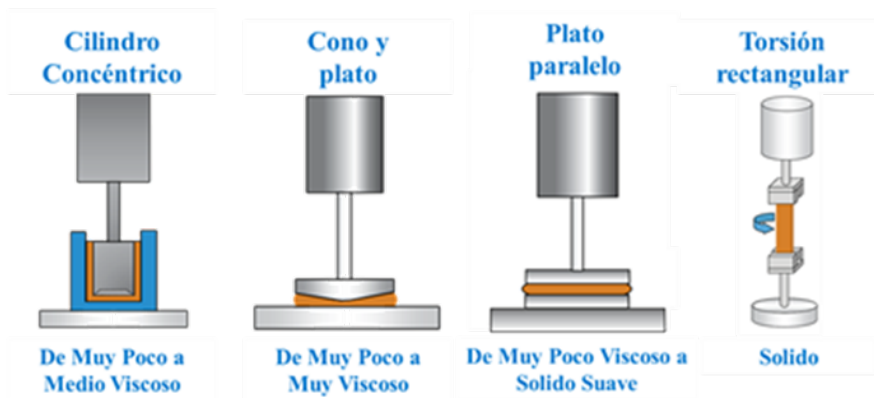


Figura 7. Geometrías básicas de rotámetros rotacionales

2.3. Estudio del comportamiento térmico de las películas medido mediante Calorimetría Diferencial de Barrido

Los equipos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se basan en dos tipos de métodos de medida: flujo de calor o de potencia compensada. Un equipo DSC basado en el método de flujo de calor tiene una cámara común donde se colocan sendos crisoles, uno para la muestra y otro para la referencia

y permite ir midiendo la diferencia de calor absorbida por una y otra. Es decir, se miden diferencias de energía. Los equipos DSC basados en el método de potencia compensada, por el contrario, constan de dos calentadores individuales, uno para la muestra de estudio y otro para la referencia. Cada calentador tiene un termopar que permite controlar la temperatura y un sistema individual de calentamiento. El método consiste en fijar una temperatura promedio y el sistema trabaja para mantener la muestra y la referencia a esa temperatura.

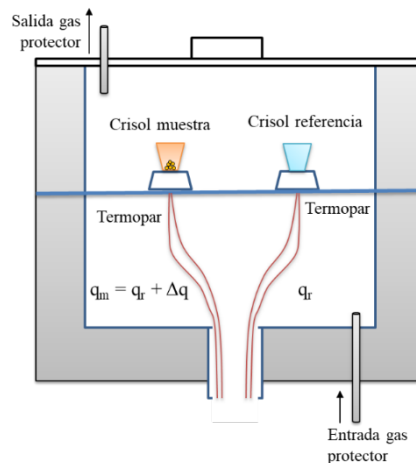


Figura 8. Diagrama básico de una cámara DSC de flujo de calor.

La cantidad de calor necesaria para incrementar la temperatura de la muestra (q_m) en el mismo incremento (ΔT) es mayor que el requerido para aumentar la referencia (q_r) debido al exceso de calor absorbido por las moléculas de la muestra (Δq).

El método de flujo de calor, generalmente, tiene una mayor sensibilidad y resolución y es el que se ha utilizado en esta Tesis. En la Figura 8 se muestra un esquema básico de la cámara de medida.

En la celda de medida están presentes dos pequeños crisoles de alúmina, uno que contiene el material que se está investigando y el otro vacío o conteniendo una sustancia referencia. La diferencia entre el flujo de calor hacia la muestra y la referencia depende de la composición del contenido del recipiente, así como de los cambios físicos en la muestra (p.e. el cambio de fase). Para el desarrollo de los ensayos térmicos de las películas se introdujeron aproximadamente 5mg de muestra y se empleó una rampa de calentamiento de 5°C/min en el intervalo de -90 a 100 °C bajo flujo constante de nitrógeno (gas protector). Los termogramas se registraron en el propio equipo (DSC, TA Instruments) y se trataron empleando el software Trios[®].

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización morfológica y estructural de los CDs

El tamaño de los CDs y su morfología se caracterizaron por HRTEM. Ambos tipos de CDs presentaron una forma esférica: como se puede ver en la Figura 9a, los RCDs son en su mayoría monodispersos, con un diámetro promedio de 3.8 ± 0.75 mientras que los APCDs (Fig. 9b) son ligeramente más grandes con un diámetro promedio de 4.2 ± 0.94 nm. Las imágenes HRTEM muestran la presencia de una fase amorfa y una fase cristalina con un espaciado interplanar de 0,21 nm que se corresponde con el espaciado inter-planos del grafito ($d_{100} = 0.213$ nm) (inserto en Figura 9b).

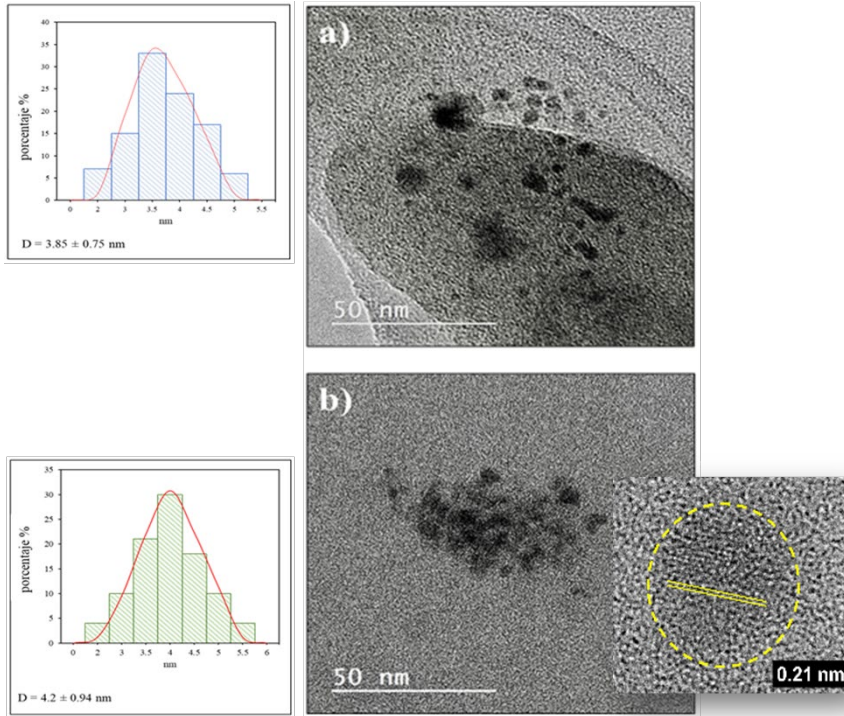


Figura 9. Imágenes HR-TEM de (a) RCDs y (b) APCDs junto con los histogramas de tamaño respectivos. Inserto: Fase cristalina con un espaciado interplanar de 0,21 nm.

3.2. Caracterización de las suspensiones CAS/HMP

Se prepararon varias suspensiones precursoras CAS/HMP con cantidades crecientes de pectina (relación CAS:HMP = 0:100; 25:75; 50:50; 75:25 y 100:0 v/v) y se observó la estructura de las películas obtenidas empleando un microscopio invertido (Olympus IX51). En la imagen de la suspensión con una proporción CAS:HMP = 25:75 v/v, Figura 10a, se pueden apreciar claramente las micelas de caseína (círculos en la imagen) y una estructura “esponjosa” de la suspensión. Con el aumento de la concentración de HMP las micelas son “atrapadas” en el entramado de la pectina (Figuras 10b y 10 c), dando lugar a

una suspensión más compacta debido a fuerzas intermoleculares de diversa naturaleza (hidrofóbicas, hidrofílicas, van der Waals, etc.).

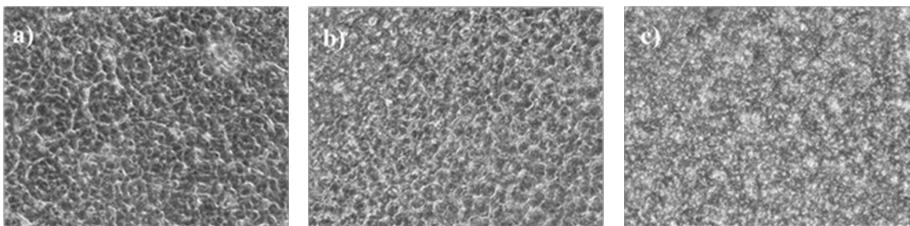


Figura 10. Imágenes obtenidas por microscopio inverso (Olympus XI51-aumento 40X/0.64) de dispersiones CAS/HMP en función de la relación CAS:HMP: a) 75:25 v/v, b) 50:50 v/v y c) 25:75

3.2. Caracterización de las mezclas CAS/HMP reforzadas con CDs

3.2.1. Caracterización reológica de las mezclas CAS/HMP reforzadas con CDs

En este trabajo, para todas las muestras se eligió una tensión constante del 1% para realizar los barridos de frecuencia entre 0,1 y 10 Hz y a la temperatura de 25°C ya que las curvas de barrido de deformación de amplitud indicaron que esta deformación está dentro de la región viscoelástica lineal. No se realizó ninguna configuración previa del instrumento.

El módulo complejo G^* y $\tan(\delta)$ de las mezclas CAS/HMP en ausencia y en presencia de RCDs se muestran en la Figura 11. Como puede observarse en la Figura 11a, todas las muestras presentan un aumento del G^* a medida que aumenta la frecuencia, lo que sugiere que a mayor frecuencia las muestras se hacen más “rígidas”. Por otra parte, las suspensiones de CAS/HMP y las que contenían RCDs en un porcentaje del 0,25% p/p exhiben valores bajos del G^* en el intervalo de 0,1-1,0 Hz, mientras que es posible observar un ligero

aumento en las muestras que contienen un mayor porcentaje de RCDs. Cada ensayo fue realizado por triplicado para los dos tipos de CDs y los resultados obtenidos fueron muy similares en ambos casos (los datos correspondientes a los APCDs figuran en el Anexo II). Los resultados indican que las mezclas que contienen entre 0,5% y 1,0% p/p de CDs son ligeramente más “rígidas” que la mezcla CAS/HMP debido, probablemente, a la formación de nano-entrecruzamientos entre los CDs y las cadenas de CAS y HMP, lo que refuerza el entrecruzamiento entre ellas. La diferencia entre los valores de G^* es menos notable a valores más altos de frecuencia, indicando que la respuesta está dominada por interacciones locales entre las cadenas de CAS y HMP y son indistinguibles de entrecruzamientos químicos [18].

Por otra parte, en la Figura 11b, se observa que las muestras CAS/HMP, CAS/HMP+0,5CDs y CAS/HMP+1CDs mantienen un valor de $\tan(\delta)$ aproximadamente constante independiente de la frecuencia aplicada. Esto quiere decir, que las cadenas de los componentes de la suspensión CAS/HMP no tienen suficiente tiempo para reorganizarse mientras se aplica la tensión; es decir, la fuerza aplicada se distribuye prácticamente igual entre los modos elástico y viscoso, y se necesitaría aplicar más fuerza para deformar el material. En el caso de la mezcla CAS/HMP+0,25CDs el valor de $\tan(\delta)$ decrece lentamente a partir de 0,252 Hz lo que indica que domina el módulo de respuesta viscosa y la mayor parte de la energía aplicada en la suspensión se almacena elásticamente.

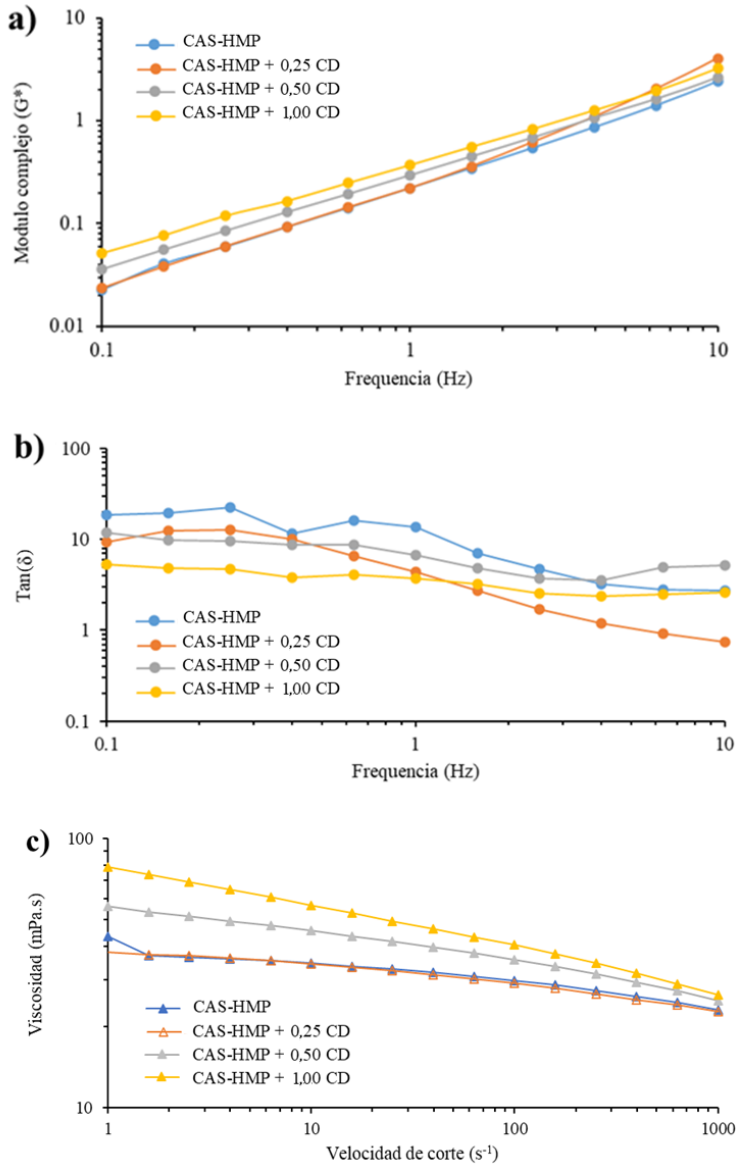


Figura 11. Perfil reológico de suspensiones CAS/HMP en ausencia y en presencia de diferentes porcentajes de RCDs: (a) módulo complejo G^* vs frecuencia, (b) $\text{tan}(\delta)$ vs frecuencia y (c) viscosidad frente a velocidad de cizalla.

La Figura 11c muestra la viscosidad de las suspensiones CAS/HMP para formar películas en ausencia y con diferentes proporciones de RCDs. En todos los casos se puede observar que la viscosidad de las muestras disminuye con el aumento de la velocidad de cizalla, aproximándose a un valor constante a valores elevados de la velocidad de cizalla, lo que implica un comportamiento de tipo no-newtoniano pseudoplástico; es decir, un adelgazamiento en cizalla. Por otra parte, también se observa que en la zona de baja velocidad de cizalla y a un valor dado de la misma, la viscosidad aumenta con la concentración de RCDs. Sin embargo, para comprender más a fondo el comportamiento reológico de las suspensiones en estudio y visualizar mejor los fenómenos de relajación, los datos obtenidos se ajustaron al modelo de ley de potencia o de Ostwald-de Waele (Ecuación 16):

$$\tau = m \dot{\gamma}^n \quad \text{Ecuación 16}$$

en la que τ es el esfuerzo cortante (Pa), m es una constante llamada coeficiente de consistencia ($Pa \times s$), $\dot{\gamma}$ la velocidad de cizalla o corte (s^{-1}) y n es otra constante denominada índice de fluidez. Los valores de m (índice de consistencia) y n (índice de fluidez) se calcularon con el modelo de Herschel-Bulkley, derivado del modelo de potencia, en el que se introduce el índice de fluidez y es válido para una gama amplia de materiales. El modelo de Herschel-Bulkley, basado en la Ecuación 17, permite determinar los parámetros n y m transformando la ecuación del modelo a una función lineal log-log o ln-ln [19]:

$$\tau = \tau_0 + m\dot{\gamma}^n \quad \text{Ecuación 17}$$

en la que τ_0 es la tensión de fluencia (Pa) del fluido y el resto de los parámetros tienen la misma significación que en la Ecuación [16]. Reorganizando la Ecuación [17] tenemos:

$$\tau - \tau_0 = m\dot{\gamma}^n \quad \text{Ecuación 18}$$

y tomando logaritmos:

$$\log_{10}(\tau - \tau_0) = \log_{10} m + n \log_{10} \dot{\gamma} \quad [19]$$

La representación gráfica de la función según el modelo de Herschel-Bulkley se muestran en la Figura 12 y los datos de los coeficientes n (índice de fluidez) y m (coeficiente de consistencia) se recogen en la Tabla 1. El modelo de Herschel-Bulkley incluye varios casos particulares: a) si $n=1$ y $\tau_0 = 0$ el fluido tiene un comportamiento newtoniano y m es igual a la viscosidad dinámica, b) si $n=1$ y $\tau_0 > 0$ describe el modelo lineal de Bingham para líquidos no-newtonianos caracterizados por una tensión de fluencia τ_0 no nula por debajo de la cual el fluido se comporta como un sólido, c) si $n \neq 1$ y $\tau_0 = 0$ describe el modelo de la ley de potencia de fluidos no-newtoniano ($n < 1$, comportamiento pseudoplástico (“*shear thinning*”), $n > 1$ comportamiento de dilatación o espesamiento (“*shear thickening*”) [20].

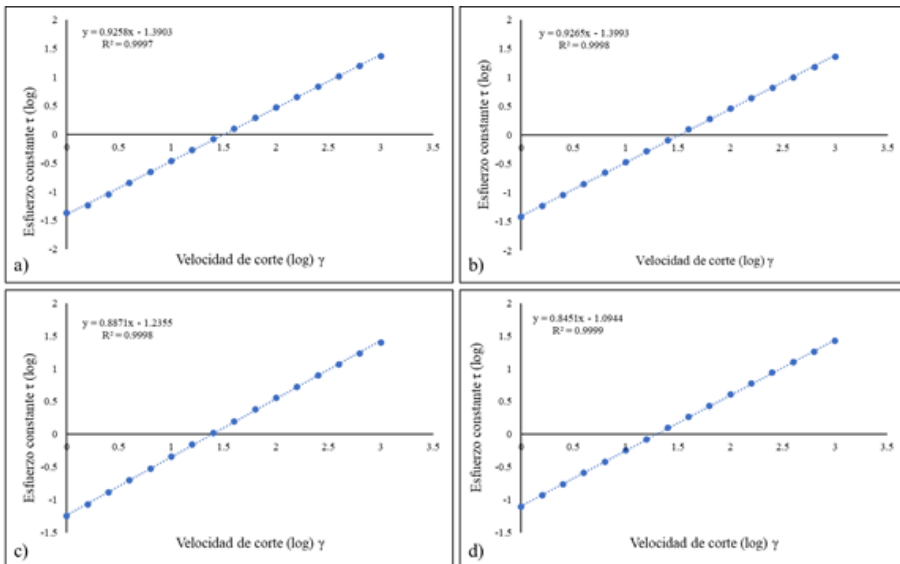


Figura 12. Representación lineal de la función según el modelo de Herschel-Bulkley para suspensiones de CAS/HMP conteniendo (a), CAS/HMP, (b) CAS/HMP+0,25CDs, (c) CAS/HMP+0,50CDs, y (d) CAS/HMP+1,0CDs

Tabla 1. Parámetros reológicos obtenidos por regresión lineal empleando el método de Herschel-Bulkley para suspensiones de CAS/HMP con diferentes concentraciones de CDs.

[CDs], %	Parámetros de flujo		
	m (mPa \times s)	n	R^2
0,00	40,1	0,92	0,99
0,25	40,7	0,93	0,99
0,50	58,4	0,89	0,99
1,00	79,5	0,84	0,99

Como se puede comprobar, todas las suspensiones exhibieron un comportamiento pseudoplástico ($n < 1$, *shear thinning*) en el intervalo de velocidad de cizalla estudiado. Asimismo, se puede comprobar que, respecto a la suspensión de CAS/HMP en ausencia de CDs, la viscosidad dinámica (representada por el valor de m) de las suspensiones que los contienen aumenta con la concentración de los mismos, en particular en las que contienen 1,0% p/p de CDs. Este hecho se puede explicar por un mayor número de posibles interacciones de los CDs con las cadenas de CAS y HMP que restringen el movimiento de las mismas y como consecuencia, la viscosidad de la suspensión aumenta. Resultados similares se han observado en suspensiones de nanopartículas en aceites [21]. Los ensayos realizados no mostraron ninguna diferencia en los resultados obtenidos con respecto al origen de los CDs utilizados (magaya de manzana o romero).

3.2.2. Caracterización física de bio-películas CAS/HMP enriquecidas con CDs

Morfología y color.

Las películas CAS/HMP conteniendo diferentes concentraciones de CDs, preparadas según se describe en el apartado 2.1.3, presentaron una apariencia homogénea siendo más oscuras aquellas que poseían una mayor concentración

de nanopartículas. Las películas que no contenían CDs se mostraron incoloras y transparentes (Figura 13). Se tomaron imágenes de SEM de las secciones transversales de todas las bio-películas con diferentes aumentos observándose que, independientemente de la concentración de CDs, presentaban una estructura compacta pero con la presencia de microporos.

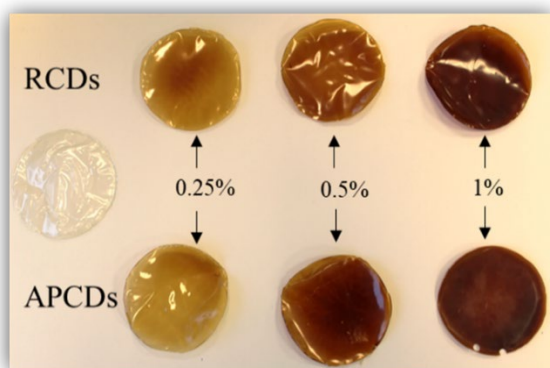


Figura 13. Aspecto y coloración de las bio-películas de CAS/HMP en ausencia y enriquecidas con diferentes concentraciones de CDs obtenidos a partir de romero (RCDs) y de magaya de manzana (APCDs).

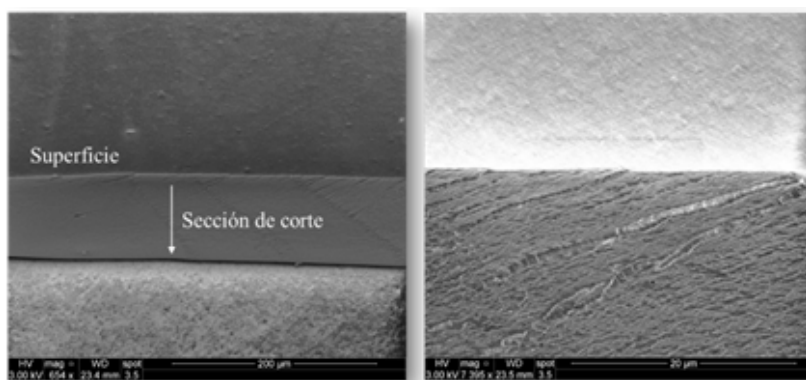


Figura 14. Imágenes SEM de una biopelícula CAS/HMP conteniendo 0,25% RCDs a diferentes aumentos, 200 µm y 20 µm.

En la Figura 14 se muestran a modo de ejemplo, dos imágenes SEM para la bio-película CAS/HMP+0,25CD que confirman estas características morfológicas.

Propiedades térmicas.

Las propiedades térmicas de los materiales son importantes siempre que se diseñan bio-películas con uso industrial. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una herramienta que aporta valiosa información sobre cambios en la temperatura de transición vítrea y sobre la degradación térmica de los materiales [22]. Aproximadamente 5 mg de las muestras fueron pesadas en un recipiente de aluminio cerrado herméticamente con tapa y se utilizó como referencia un recipiente vacío.

La Figura 15 muestra los termogramas de las películas de CAS/HMP, de las fabricadas con los dos tipos de CDs y los respectivos CDs libres. Una primera observación en la Figura 15.a muestra que los RCDs presentan dos inflexiones endotérmicas, una a $\sim 200\text{K}$ ($\sim 73^\circ\text{C}$) identificada como T_g (temperatura de transición vítrea), otra a $\sim 330\text{K}$ ($\sim 57^\circ\text{C}$) correspondiente a T_c (temperatura de cristalización) y una tercera inflexión a $\sim 385\text{K}$ ($110\text{-}112^\circ\text{C}$) asignada a T_m (temperatura de fusión).

En el caso de las películas de CAS/HMP y las que contienen RCDs, se puede observar que la presencia creciente de RCDs provoca un aumento de la T_c desde $\sim 240\text{K}$ ($\sim 33^\circ\text{C}$) para la película pura CAS/HMP hasta $\sim 250\text{K}$ ($\sim 23^\circ\text{C}$) para la película reforzada con un 0,25% de RCDs. Las películas que contienen 0,5% y 1,0% RCDs también presentan un aumento de la T_c , aunque menos acusado que en el caso anterior. Este hecho se puede considerar como una termo-estabilización de las membranas debida a un efecto de nucleación heterogéneo de los RCDs sobre las cadenas de la caseína y el quitosano, que da lugar a la cristalización del conjunto a mayor temperatura. En las muestras en las que se emplean APCDs (Figura 15b), como en el caso anterior, el flujo total de calor es función de la cantidad de CDs en las películas. Se puede

observar que se mantiene el valor de la T_g a ~ 200 K en todas las películas, así como el valor de la T_c de la membrana CAS/HMP, siendo en este caso menos apreciable el cambio en función de la concentración de APCDs.

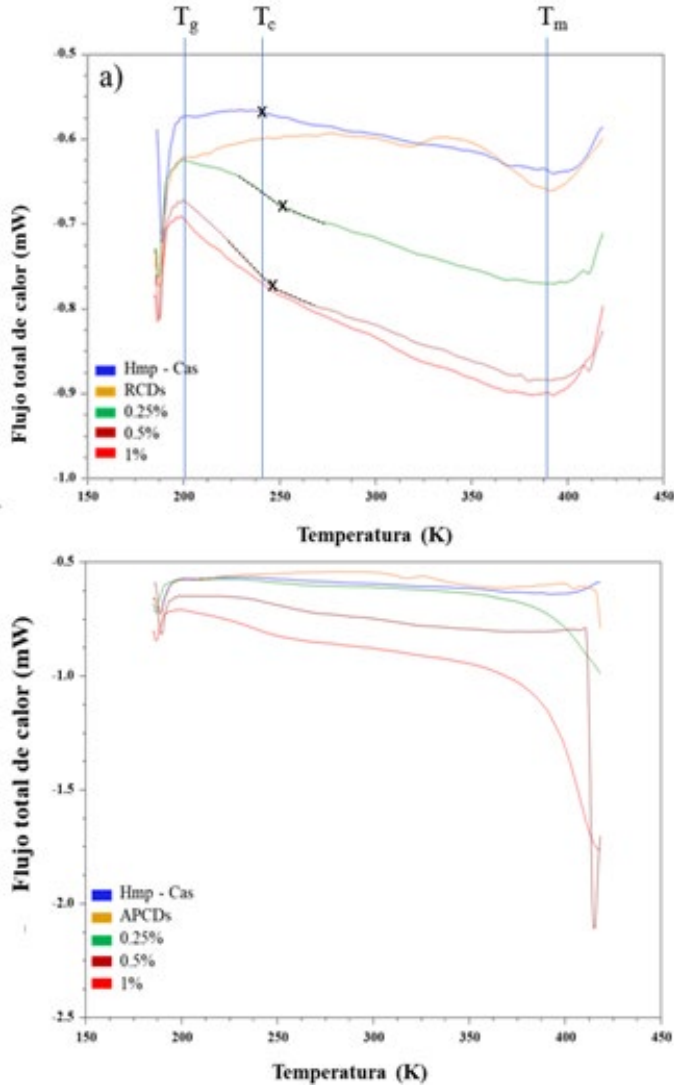


Figura 15. Termogramas de DSC de películas CAS/HMP reforzadas con: (a) RCDs y (b) APCDs.

A diferencia de los RCDs, el comportamiento térmico de las películas compuestas con APCDs y los propios APCDs muestran un pico a 410 K que podría asignarse a la T_d o temperatura de descomposición.

Propiedades mecánicas.

Las pruebas mecánicas dinámicas se llevaron a cabo para todas las películas fabricadas mediante el uso de un reómetro acoplado con accesorio de tensión y una cámara ambiental (Figura 16). DMA es el acrónimo general dado a este instrumento que permite deformar mecánicamente la muestra y mide la respuesta del material a esa deformación en función de la temperatura o del tiempo.

El equipo DMA permite estudiar las propiedades mecánicas de biopelículas en un amplio intervalo de temperaturas y humedad relativa, con el fin de prever posibles aplicaciones de las mismas en función de su respuesta a los cambios en diferentes condiciones ambientales.

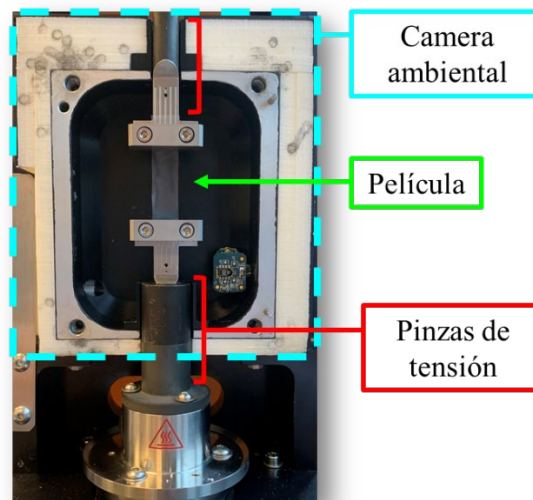
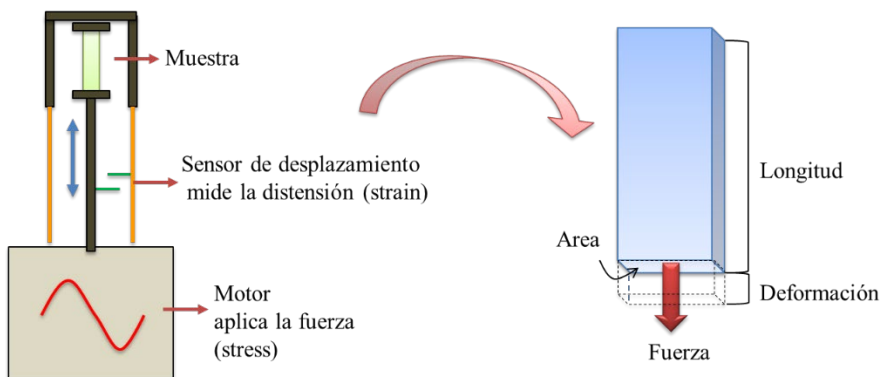


Figura 16. Equipo utilizado para las pruebas DMA (Dynamic Mechanical Analysis)

Para proceder con las mediciones, se cortaron todas las películas con un tamaño aproximado de 3 cm de longitud y 1 cm de ancho y se ajustaron con pinzas dentro de la cámara. El grosor, la longitud y la anchura de cada película se midieron mediante un calibre y los valores obtenidos se utilizaron para configurar el instrumento antes del análisis.



$$\text{Presión (stress) (Pa)} = \frac{\text{Fuerza (N)}}{\text{Área (m}^2\text{)}} \quad \text{Cambio de forma (strain)} = \frac{\text{Deformación (m)}}{\text{Longitud (m)}}$$

$$\text{Módulo (Pa)} = \frac{\text{Presión (stress) (Pa)}}{\text{Distensión (strain)}}$$

Figura 17. Esquema básico del funcionamiento de un equipo DMA

En la Figura 17 se muestra cómo funciona el equipo y se indican los parámetros que se pueden medir. Se realizó un primer ensayo a temperatura variable con películas CAS/HMP y CAS/HMP+1,0CD. Para la realización de la prueba se establecieron las siguientes condiciones experimentales:

- fuerza axial de 0,01%,
- frecuencia de 1 Hz,
- rampa de calentamiento 0,7°C/min, con una temperatura inicial de 25°C y una temperatura final de 45°C.

El comportamiento viscoelástico de las películas se representó gráficamente utilizando los valores del módulo complejo (E^*) de energía obtenidos después de cada medición. El módulo complejo se define como el producto del módulo de almacenamiento (E') y del módulo de pérdida (E'') de energía; es un parámetro útil para predecir la resistencia global de las películas a la deformación debida a la tensión [23]. Los módulos de conservación y pérdida de energía describen el comportamiento de enlaces químicos más fuertes y débiles, respectivamente. Para cada película las rampas de temperatura se llevaron a cabo a tres valores diferentes de la humedad relativa (10%-50%-70%). Como se puede observar en la Figura 18, tanto la película de CAS/HMP como la que contenía un 1,0% p/p de CDs, presentaron valores de E^* más elevados en condiciones de baja humedad relativa (10%), en todo el intervalo de temperaturas estudiado. Incluso, se pudo comprobar que con una humedad relativa del 10% las películas presentaban valores de E^* elevados hasta los 70°C. Las películas de CAS/HMP tienden a perder su estructura (valores más bajos de E^*) a temperaturas más bajas, alrededor de 30°C y humedad relativa $\geq 50\%$.

Sin embargo, las películas de CAS/HMP reforzadas con CDs presentan, comparativamente, una mayor estabilidad a 30°C y humedad relativa del 50%. En condiciones de humedad relativa elevada (70%), tanto las películas CAS/HMP como las reforzadas con CDs se deforman fácilmente (valores muy bajos de E^*) y no es posible detectar una respuesta a la tensión por encima de los 30°C. Esto puede explicarse por el hecho de que las películas son altamente hidrófilas y absorben agua con mucha facilidad, perdiendo su estructura y no respondiendo ya a la fuerza aplicada.

Dado que en el estudio anterior, el tiempo al que estaban sometidas las películas a la humedad y la temperatura era relativamente corto (velocidad de calentamiento 0,7°C/min), con objeto de comprobar la resistencia de las películas a la tensión durante un tiempo más prolongado (hasta 20 min) a cuatro temperaturas diferentes y humedad relativa del 50%, se llevó a cabo un

nuevo ensayo reológico para las películas de CAS/HMP y reforzadas con CDs, empleando una frecuencia de 1Hz y una fuerza axial de 0.01%.

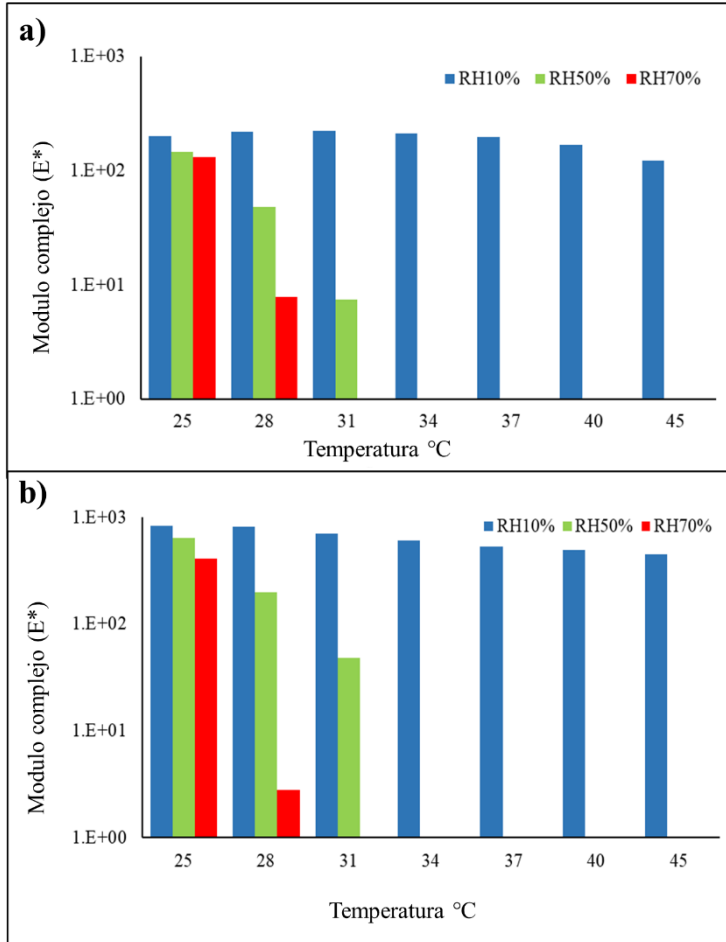


Figura 18. Comportamiento reológico en función de la temperatura y la humedad relativa de películas: (a) CAS/HMP y (b) CAS/HMP+1,0RCDs

En la Figura 19 se representan los resultados obtenidos para el módulo complejo E^* de cada película en función del tiempo. La Figura 19.a muestra que a 18°C las películas de CAS/HMP presentan valores estables de E^* durante

el tiempo de ensayo y que las películas CAS/HMP conteniendo RCDs muestran un valor más elevado E^* , siendo éste función de la concentración de CDs. Las películas con un elevado contenido en RCDs (1,0% p/p) mostraron mayor E^* que el resto, lo cual implica que al elevar el número de nanopartículas se favorecen las interacciones con las moléculas de CAS/HMP y, por tanto, una mayor rigidez de la estructura de las películas [24], lo que corrobora los datos anteriormente obtenidos sobre el incremento de la viscosidad dinámica con la concentración de CDs.

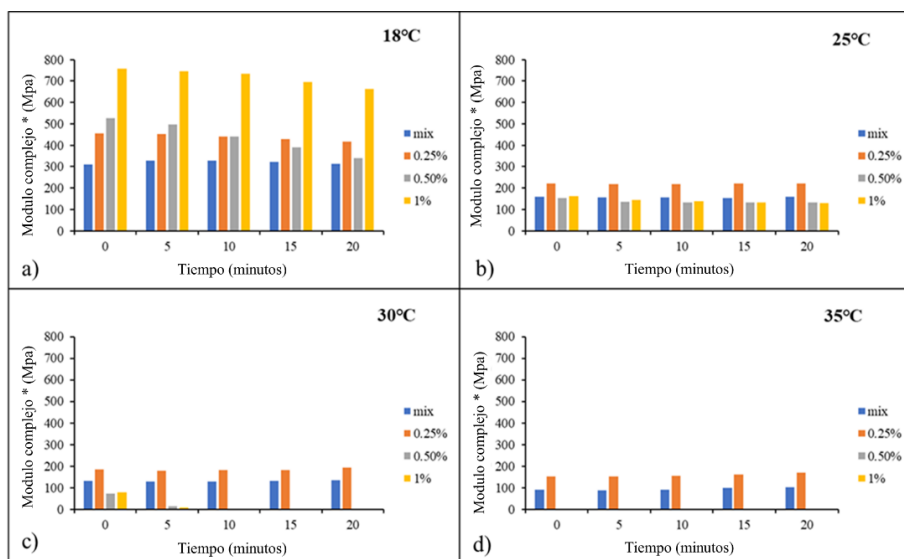


Figura 19. Comportamiento reológico de películas CAS/HMP y CAS/HMP+RCDs en función del tiempo de exposición a diferentes temperaturas.

En el ensayo realizado a 25°C (Figura 19.b) se observa una gran pérdida de resistencia estructural en todas las películas (E^* decrece notablemente), particularmente en las películas limpias y las reforzadas con 0,5% y 1,0% p/p

RCDs. Es interesante observar que a esta temperatura las que tienen un menor contenido en RCDs son ligeramente más estables que el resto. A pesar de la pérdida de resistencia de la estructura, la medición de todas las muestras fue posible durante la duración de la prueba. Los hechos cambiaron notablemente en los ensayos realizados a 30 y 35°C, Figuras 19.c y 19.d, donde se puede observar que sólo las películas limpias CAS/HMP y aquellas con un menor porcentaje de CDs (0,25% p/p) mantienen una cierta estabilidad estructural. Así, a 35°C tanto las películas CAS/HMP como las de CAS/HMP+0,25CD mantienen un 30% de la estabilidad observada a 18°C. No obstante, todas las películas están sujetas a la penetración, a través de microporos (ver Figura 14), de agua presente en la atmósfera, lo que provoca una pérdida de resistencia en la estructura, aunque las películas con mayor concentración de CDs (0,5% y 1,0% p/p) son las más susceptibles a temperaturas $\geq 30^\circ\text{C}$. Es importante señalar que se obtuvieron resultados análogos empleando RCDs y APCDs (ver datos en el Anexo II).

En conclusión, podemos afirmar que la adición de nanopartículas aumenta la resistencia de la estructura de las películas biocompatibles de CAS/HMP, son estables a temperaturas suaves bajo condiciones de humedad relativa del $\leq 50\%$.

4 CONCLUSIONES

En este trabajo se prepararon suspensiones de caseinato de sodio (CAS) y pectina altamente metoxilada (HMP) así como suspensiones enriquecidas con puntos de carbono (CDs) obtenidos a partir de biomasa vegetal (hojas de romero y magaya de manzana) con objeto de formar películas biocompatibles. Estas suspensiones precursoras de las películas demostraron tener un comportamiento no-newtoniano y las bio-películas formadas a partir de ellas demostraron que los CDs modifican favorablemente la estabilidad térmica

como se demostró con los cambios en la temperatura de cristalización (análisis por DSC) y la estabilidad mecánica en condiciones de humedad relativa $\leq 50\%$ y temperaturas $\leq 25^{\circ}\text{C}$. Estos parámetros prevén potenciales aplicaciones de estas membranas como películas protectoras en el campo de los alimentos en situaciones en las que las condiciones de humedad y temperatura puedan estar controladas, y no se superan los límites anteriores.

5 BIBLIOGRAFÍA

[1] L. Shen, E. Worrell. Plastic Recycling. Editor(s): Ernst Worrell, Markus A. Reuter, Handbook of Recycling, Elsevier, 2014, Chapter 13, 179-190. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396459-5.00013-1>

[2]https://think.ing.com/uploads/reports/ING_The_plastic_puzzle_December_2019_%28003%29.pdf. Último acceso 20 de junio de 2021

[3] C.L. Reichert, E. Bugnicourt, M.-B. Coltelli, P. Cinelli, A. Lazzeri, I. Canesi, F. Braca, B.M. Martínez, R. Alonso, L. Agostinis, Sand col. Bio-Based Packaging: Materials, Modifications, Industrial Applications and Sustainability; *Polymers (Basel)*, 2020, **12(7)**, 1558. <https://doi.org/10.3390/polym12071558>

[4] H. Chen, J. Wang, Y. Cheng, C. Wang, H. Liu, H. Bian, Y. Pan, J. Sun, W. Han. Application of Protein-Based Films and Coatings for Food Packaging: A Review. *Polymers* 2019, **11**, 2039. <https://doi.org/10.3390/polym11122039>

[5] J. Miltz N. Passy, C.H. Mannheim. Trends and applications of active packaging systems. In: P. Ackermann, M. Jägerstad, T. Ohlsson, (Eds) Food and packaging materials-Chemical interaction. The Royal Society of Chemistry, London, England, 1995, 201–210.

[6] <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0450&from=EN>. Último acceso 20 de junio de 2021

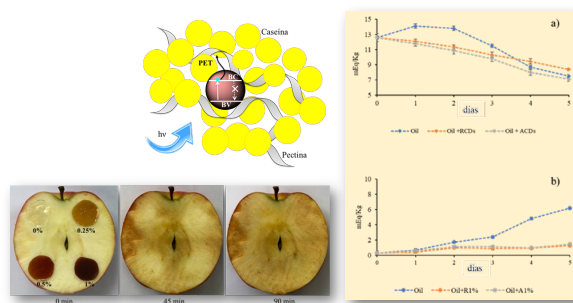
[7] N. Benbettaïeb, J.P. Gay, T. Karbowski, F. Debeaufort. Tuning the functional properties of polysaccharideprotein bio-based edible films by chemical, enzymatic, and physical cross-linking. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20216, **15**, 739-752. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12210>

-
- [8] V.G. Martins, V.P. Romani, P. Chaves Martins, G. da Silva Filipini Innovative packaging that saves food. In Charis M. Galanakis (Eds) Saving Food. Academic Press, 2019, Chapter 6, 171-202. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815357-4.00006-7>.
- [9] O.G. Jones, D.J. McClements. Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication, and Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2010, **9**, 374–397. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00118.x>
- [10] J.R. Andrade, E. Raphael, A. Pawlicka. Plasticized pectin-based gel electrolytes *Electrochimica Acta*, 2009, **54(26)**, 6479-6483. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.05.098>
- [11] M. Jahromi, M. Niakousari, M.T. Golmakani, M.A. Mohammadifar. Physicochemical and structural characterization of sodium caseinate based film-forming solutions and edible films as affected by high methoxyl pectin; *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, **165 Part B**, 1949-1959. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.057>.
- [12] M. Reiner. Rheology. In: Flügge S. (eds) Elasticity and Plasticity / Elastizität und Plastizität. Encyclopedia of Physics / Handbuch der Physik. Springer, Berlin, Heidelberg, 1958. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-43081-14>
- [13] Sepe P. Michael; Dynamic Mechanical Analysis for Plastics Engineering; Plastics Desing library. Elsevier, William Andrew 1998.
- [14] R.J. Poole. The Deborah and Weissenberg numbers. *The British Society of Rheology, Rheology Bulletin*. 2012, **53**, 32-39
- [15] K.P. Menard (Ed). Dynamic Mechanical Analysis: A Practical Introduction, Second Edition, CRC Press, Boca Raton, 2008. <https://doi.org/10.1201/9781420053135>

- [16] Q. Zhong, C.R. Daubert, O.D. Veley. Physicochemical Variables Affecting the Rheology and Microstructure of Rennet Casein Gels; *J. Agric. Food Chem.* 2007, **55**(7), 2688–2697. <https://doi.org/10.1021/jf0625914>
- [17] J.Ahmed P. Ptaszek S. Basu (Eds). Advances in Food Rheology and Its Applications; 1st Edition, Woodhead Publishing, 2017.
- [18] R.A. Mrozek, P.J. Cole, K.J. Otim, K.R. Shull, J.L. Lenhart. Influence of Solvent Size on the Mechanical Properties and Rheology of Polydimethylsiloxane-based Polymeric Gels. *Polymer*, 2011, **52**, 3422-3430, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.05.021>
- [19] A. Bartoszewicz, P. Latosiński. Sliding mode control of inventory management systems with bounded batch size; *Applied Mathematical Modelling*, 2019, **66**, 296-304, <https://doi.org/10.1016/j.apm.2018.09.010>
- [20] P. Saramito. A new elastoviscoplastic model based on the Herschel-Bulkley viscoplastic model; *J. Non-Newton Fluid Mech.*, 2009, **158**, 154-161 <https://doi.org/10.1016/j.jnnfm.2008.12.001>
- [21] S.B. Mousavi, S.Z. Heris, P. Estellé. Viscosity, tribological and physicochemical features of ZnO and MoS₂ diesel oil-based nanofluids: An experimental study. *Fuel*, 2021, **293**, 120481. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120481>
- [22] O. Lopez Mayorga, E. Freire. Dynamic analysis of differential scanning calorimetry data; *Biophys Chem*, 1987, **27**(1), 87-96. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(87\)80049-2](https://doi.org/10.1016/0301-4622(87)80049-2)
- [23] T.G. Mezger. The Rheology Handbook, 4th ed.; Vincentz Network GmbH: Hannover, Germany, 2014, 135–210
- [24] Drašković, M.; Turković, E.; Vasiljević, I.; Trifković, K.; Cvijić, S.; Vasiljević, D.; Parođićić, J. Comprehensive evaluation of formulation factors affecting critical quality attributes of casted orally disintegrating films. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2020, **56**, 101614. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101614>

CAPÍTULO 4

Películas de caseína y pectina enriquecidas con puntos de carbono para la protección bioactiva antioxidante de alimentos



1 INTRODUCCIÓN

Un elevado porcentaje de los alimentos producidos mundialmente para el consumo humano se desperdicia o se deteriora. El deterioro de los alimentos puede ocurrir durante la producción, el transporte, el procesamiento o el almacenamiento de los productos y son varias las causas: a) el tiempo, b) la acción de los organismos vivos (bacterias, hongos, insectos, roedores o el propio ser humano), c) las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, oxígeno, acción de la luz) y d) la actividad biológica endógena de los alimentos (enzimas, respiración, estrés). Todo ello supone no sólo pérdidas económicas importantes sino que ese deterioro supone un detrimento de las características organolépticas, de la seguridad del alimento y de su valor nutritivo.

La oxidación es la principal causa de deterioro de los alimentos y limita considerablemente la vida útil de estos productos. Las principales consecuencias de oxidación incluyen: i) una disminución del valor nutricional de los alimentos debido a la destrucción de ácidos grasos, proteínas y vitaminas liposolubles; ii) una disminución del contenido energético, iii) la producción de sabores y olores y iv) cambios de color (degradación de pigmentos), que son importantes en la decisión de los consumidores a la hora de adquirir el producto [1]. Debido al gran impacto económico que tiene el deterioro por oxidación, la industria alimentaria investiga en el desarrollo de nuevos métodos para reducir los efectos de la oxidación y ha reconocido la importancia de utilizar antioxidantes para este propósito. Según la Unión Europea [2], hay varios antioxidantes autorizados que pueden ser utilizados en

alimentos siendo la mayoría de los permitidos compuestos artificiales, como el hidroxianisol butilado, el hidroxitolueno butilado, la tercbutilhidroquinona y el galato de propilo, siendo su uso autorizado sólo en alimentos procesados.

Como se comentó en la Introducción, entre los diferentes tipos de envases activos que ya han encontrado campo en el mercado, están los envases activos antioxidantes, que contienen diferentes tipos de compuestos antioxidantes y/o antimicrobianos ocluidos en el material. Se han utilizado diferentes tipos de nanopartículas, siendo las de base carbono, y en particular los CDs, las que ofrecen un gran potencial por la posibilidad de obtenerlas a partir de varias fuentes naturales tanto de origen vegetal (pieles y pulpa de frutas, hojas y tallos de plantas, semillas, etc) como animal (carne, pescado, albumina de suero bovino, yema de huevo) así como de diferentes tipos de biomasa [3]. El empleo de los CDs como aditivos antioxidantes está en su infancia y son realmente escasas las aplicaciones de los mismos en muestras reales relacionadas con la presencia de los mismos sobre la viabilidad de células *in vitro* y su protección bajo estrés oxidativo.

Los estudios sobre las propiedades mecánicas de los films realizados en el capítulo anterior nos dieron la oportunidad de prever qué aplicaciones podrían dárseles a las películas reforzadas con CDs antioxidantes: debido a su elevada hidrofiliidad y la facilidad con la que pierden resistencia estructural en ambientes húmedos hacen que estas películas sean ineficaces para ser utilizadas en productos alimenticios con alto contenido de agua. Por este motivo, las muestras elegidas para estudiar el potencial de las películas reforzadas con CDs como posibles películas activas fueron productos hidrofóbicos. En este capítulo se estudian las propiedades ópticas y antioxidantes de los biofilms obtenidos a partir de caseinato sódico (CAS) y pectina altamente metoxilada (HMP) reforzados con CDs antioxidantes obtenidos a partir de romero y magaya de manzana y, como prueba del concepto, su aplicación para ralentizar la oxidación de aceites comestibles y cosméticos.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Estudio de la actividad antioxidante.

2.1.1. Ensayo DPPH: captura del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

Las propiedades antioxidantes de los CDs y de las bio-películas fueron analizadas mediante el ensayo del radical estable DPPH• (cuyo fundamento ya fue expuesto en el Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral). Para estudiar la actividad antioxidante de los CDs se preparó una disolución etanólica del reactivo DPPH• (100 μ M) y se adicionó 1 mL de la misma se añadió a dispersiones de CDs de diferente concentración. Las mezclas se agitaron y se dejaron reposar durante 30 minutos en la oscuridad. Finalmente, la decoloración del radical se determinó midiendo la absorbancia a 517 nm. Para el estudio de la actividad antioxidante de las películas, se colocaron 5 mg de las bio-películas en tubos Eppendorf, se agregaron 1,5 mL de metanol y 0,5 mL de la disolución de DPPH•. Los tubos se cubrieron con láminas de aluminio y se agitaron durante 30 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 517 nm. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Se utilizó como blanco una suspensión que contenía todos los reactivos, excepto el DPPH•. El porcentaje de inhibición se calculó usando la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición DPPH}\bullet = [(Ac-As)/Ac] \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

donde Ac es la absorbancia del control y As es la absorbancia de la muestra.

2.2. Determinación del índice de peróxido en aceites comestibles y cosméticos en presencia de bio-películas CAS/HMP reforzadas con CDs

El fundamento y el protocolo para determinar el índice de peróxidos (PV) se llevó a cabo como se describe en la Sección 2.2.3 del Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral. En este estudio se utilizó un electrodo combinado de anillo de Pt-Ag/AgCl 3M KCl, 3M KNO₃ y un pH/mVmetro Crison con una exactitud de medida de ± 0.2 mV. Para la realización de este ensayo en las películas se seleccionaron aquellas que en ensayo anterior resultaron tener un poder antioxidante más alto (1% RCD y 1% APCD). El ensayo PV en presencia de las bio-películas reforzadas se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: se cortaron varias muestras de película del mismo peso (0,2 g) y se colocaron en tubos de vidrio conteniendo 10 g del aceite en estudio. Otros tubos se llenaron únicamente con la misma cantidad de aceite y se usaron como control. Todos los tubos se colocaron en un horno y se calentaron entre 1 y 5 días a una temperatura de 40°C para el aceite comestible y de 70°C en el caso del aceite cosmético para favorecer, en ambos casos, la formación lenta y controlada de especies químicas reactivas (radicales peróxido). Para evaluar el PV, se pesaron 3 g de cada muestra y se disolvieron en 50 mL de una mezcla de Cl₃CH/ácido acético glacial (3: 2 v/v). Se agregaron entonces 0,5 mL de una disolución acuosa saturada de KI. La mezcla se agitó suavemente hasta el final del análisis. El electrodo combinado de Pt-Ag/AgCl se sumergió en el sistema de dos fases y se midieron los potenciales redox estables después de adicionar una solución estándar de Na₂S₂O₃ 0,01 M. Se realizaron las mismas operaciones para los blancos. El PV se calculó usando la ecuación:

$$PV = (V \times Ct \times F \times 1000) / m \quad \text{Ecuación 2}$$

donde V es el volumen adicionado de la disolución estándar de Na₂S₂O₃ a la muestra de aceite vegetal analizada, F y Ct son el factor de corrección y la

concentración molar de la disolución estándar $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, respectivamente, y m es el peso (g) de la muestra de aceite.

3 RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Caracterización óptica de los CDs y de las bio-películas

Las propiedades ópticas de los CDs se caracterizaron mediante espectroscopía de UV-visible. Los espectros de absorción de RCDs y APCDs (Figura 3a), realizados en un espectrofotómetro Agilent, modelo Cary 60, mostraron características similares, con una banda a 280 nm correspondientes a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ debidas a grupos con hibridación sp^2 (dobles enlaces C-C) y otra banda a 330 nm asignada a transiciones $n \rightarrow \pi^*$ debidas a grupos C=O, C-N o C-OH en enlaces con hibridación sp^3 . Los espectros de fotoluminiscencia (PL) de emisión y excitación de los CDs, realizados con un espectrofotómetro Varían, modelo Cary, se muestran en la Figura 3b, en donde se puede observar una banda de emisión con un máximo de intensidad a 440 nm y una banda de excitación con un máximo a 350 nm. Como se puede observar, no hay una diferencia significativa en los espectros de fotoluminiscencia de ambos tipos de CDs.

Para determinar las propiedades fotoluminiscentes de las películas se prepararon varias muestras del mismo tamaño (1cm \times 1cm) que fueron colocadas encima de un soporte front-face para registrar los espectros de excitación y fluorescencia. Se utilizó como blanco de referencia películas CAS/HMP en ausencia de CDs.

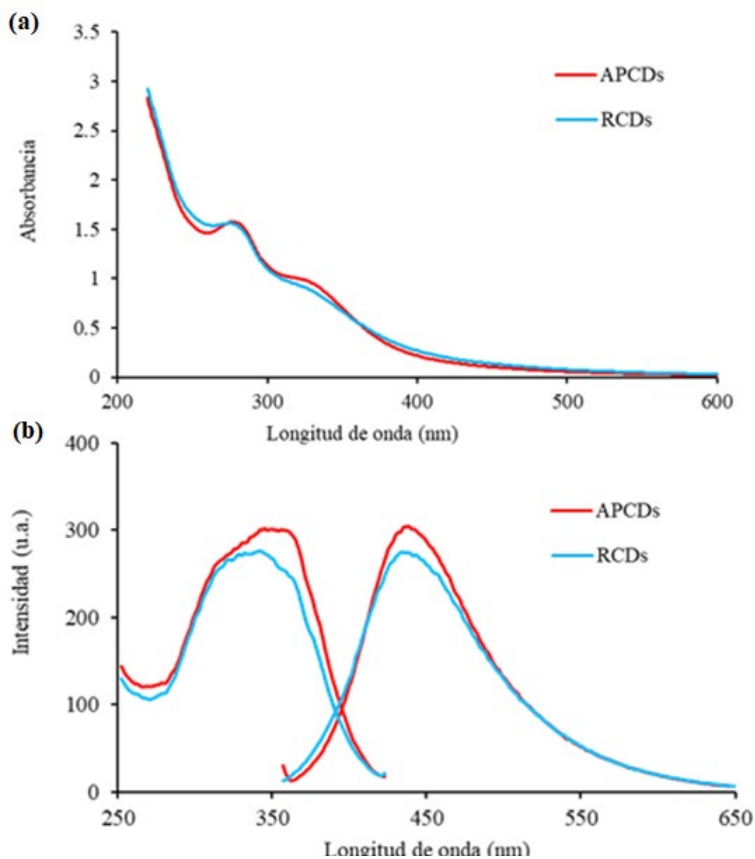


Figura 3. a) Espectros de absorción y b) espectros de excitación y fluorescencia de los distintos tipos de CDs

Como se observa en la Figura 4, las películas que muestran una banda de absorción bien definida, con un máximo a 420 nm, son las que contienen una baja concentración de CDs (0,25%), mientras que las que contienen una mayor concentración presentan bandas de excitación anchas y poco definidas debido, probablemente, a un efecto de filtro interno.

No obstante, este hecho podría ser un factor a tener en cuenta a la hora de considerar las posibles aplicaciones prácticas de este tipo de bio-películas, ya que las que tienen mayor concentración de CDs (0,5 y 1,0%) podrían actuar

como pantalla para la radiación exterior si se utilizan para envasar productos sensibles a la luz (p.e. aceites que se oxidan y producen radicales libres).

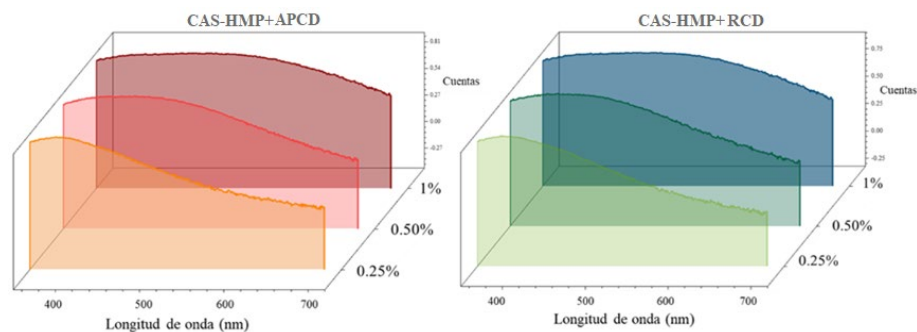


Figura 4. Espectros de excitación de las películas enriquecidas con APCDs y RCDs.

Se registraron también los espectros de fluorescencia de las películas y como se observa en la Figura 5, utilizando una longitud de onda de excitación a 260 nm las películas CAS/HMP (sin CDs) presentan una intensa banda de fluorescencia con un máximo de intensidad a 325 nm debido probablemente a la fluorescencia intrínseca que posee la caseína [4].

Sin embargo, la excitación a 348 nm (máximo de excitación de los CDs y fuera del máximo de excitación de la caseína) produce una débil banda de emisión 425 nm en las muestras CAS/HMP (sin CDs). Por otra parte, las películas conteniendo RCDs o APCDs, cuando se excitaron a 348 nm presentaron bandas de emisión débiles a 438 nm. Este hecho se podría explicar por la presencia de dos sistemas fluorescentes que interaccionan a través de un proceso redox de desactivación: transferencia electrónica fotoinducida (PET), proceso del que ya se ha discutido en el Capítulo 2. En el esquema que se propone en la Figura 6, cuando se excita la película CAS/HMP+CD a la longitud de onda correspondiente a la excitación de los CDs, se promueve un electrón de la banda de valencia a la banda de conducción. En el nano-entorno

de los CDs, estos electrones pueden ser cedidos a la caseína y/o a la pectina, ambos con capacidad antioxidante [5, 6], impidiéndose así el retorno de los mismos a la banda de valencia y, por tanto, la emisión de fluorescencia de los CDs decae.

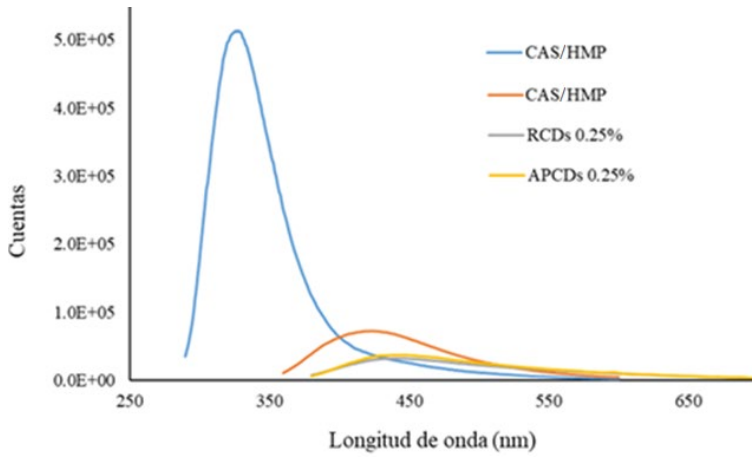


Figura 5. Espectros de emisión de fluorescencia de películas CAS/HMP (rojo, $\lambda_{exc}=260$ nm y azul, $\lambda_{exc}=348$ nm) y de las películas conteniendo 0,25% de RCDs (gris, $\lambda_{exc}=348$ nm) y 0,25% APCDs (naranja, $\lambda_{exc}=348$ nm)

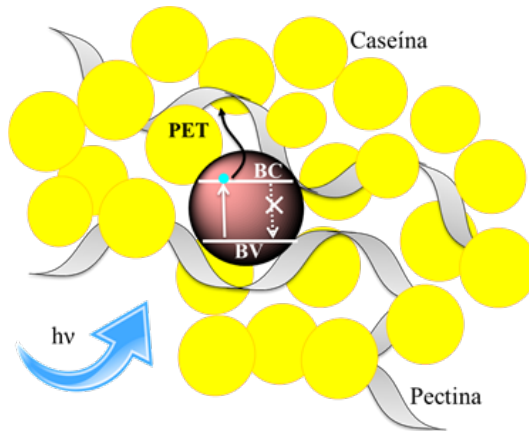


Figura 6. Proceso de desactivación de la fluorescencia de los CDs en el nanoentorno de la película CAS/HMP

Los espectros ATR-FTIR de los CDs, de las películas reforzadas con CDs y las películas sin reforzar se realizaron con un espectrómetro de la casa comercial Varian, modelo 670-IR acoplado con un dispositivo para la adquisición de espectros de reflectancia total atenuada (ATR). Las imágenes se muestran en la Figura 7 para el caso de los RCDs y en el Anexo III para los APCDs.

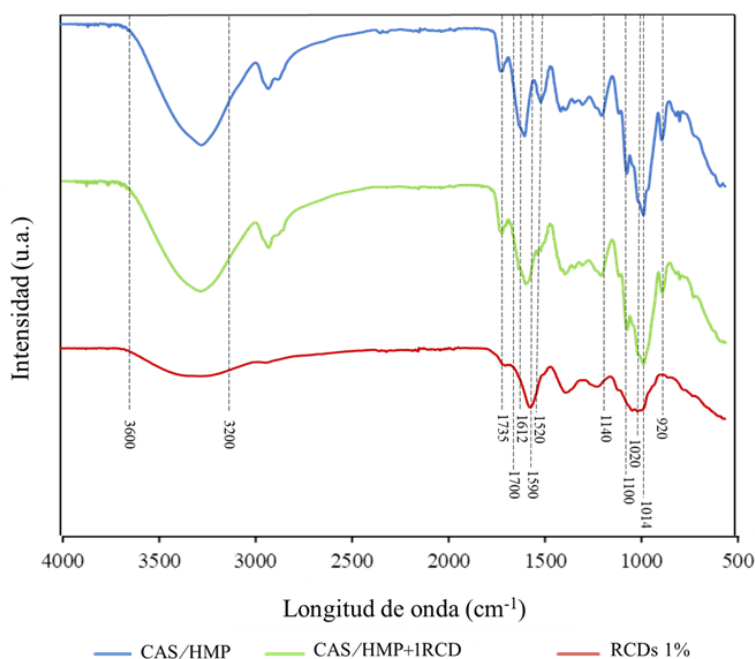


Figura 7. Espectros ATR-FTIR de RCDs, de películas CAS/HMP y películas CAS/HMP reforzadas con 1%RCDs.

En el espectro de los RCDs, la banda ancha observada a 3200-3600 cm⁻¹ se atribuyó a vibraciones de estiramiento de enlaces -O-H y de enlaces N-H presentes en la lignocelulosa. Las bandas a 1590 cm⁻¹, 1014 cm⁻¹ y 1700 cm⁻¹ se atribuyen a la absorción de grupos carboxílicos superficiales, a vibraciones de enlaces C-O presentes en polisacáridos y a cetonas simples y grupos

carboxílicos, respectivamente. La banda a 1020 cm^{-1} se asignó a las vibraciones del C-6 de la celulosa.

Como se puede comprobar también en la Figura 7, la región con más información de los espectros FTIR de las películas CAS/HMP tanto reforzadas con RCDs como las no reforzadas, es la que oscila entre 900 y 1800 cm^{-1} .

Así, esta región es particularmente útil para definir el grado de esterificación de la pectina: las bandas a 1735 cm^{-1} y a 1612 cm^{-1} pueden asignarse al estiramiento del grupo metil-éster ($\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{COOH}}(\text{COOCH}_3)$) y al estiramiento asimétrico del grupo carbonilo en el carboxilato ($\nu(\text{O}=\text{C}-\text{O})$) no esterificado de la pectina, respectivamente [7]. Por otra parte, otras bandas detectadas relacionadas con la conformación estructural de los enlaces glicosídicos en la pectina son las que se observan en la región de 1100 - 920 cm^{-1} : la banda a 1140 cm^{-1} es característica de las vibraciones en anillo y flexión de enlaces C-OH, mientras que la banda intensa a 1020 cm^{-1} se debe a flexiones de enlaces C-OH [8]. Se puede observar que la banda a 1520 cm^{-1} presente en la película no reforzada y asignada a vibraciones amida II (vibraciones de estiramiento de enlaces C-N en combinación con vibraciones de flexión de enlaces N-H) de la caseína, prácticamente ha desaparecido en la película reforzada y la banda observada a 1612 cm^{-1} observada en la película no reforzada se ha desplazado a 1590 cm^{-1} en la película reforzada, probablemente por interacción con los RCDs de la caseína y la pectina, respectivamente. En general, la intensidad de las bandas de las películas no se modifica con la presencia de los RCDs. Los espectros ATR-FTIR de los APCDs y de las películas reforzadas con APCDs 1% se muestran en el Anexo 4 y se puede comprobar que el comportamiento es similar al descrito para los RCDs.

3.2. Actividad antioxidante de las bio-películas

Los resultados del ensayo DPPH• para determinar la actividad antioxidante de los CDs se recogen en la Figura 8, en la que se puede apreciar que la

actividad DPPH• de los CDs depende de su concentración. Así, por ejemplo, una concentración de 0,2 mg/mL, el porcentaje de inhibición del radical DPPH• por RCDs y APCDs resultó ser del 40% y 20%, respectivamente. Para los RCDs se observó que el porcentaje de inhibición del radical DPPH• aumenta hasta una concentración de 0,2 mg/mL, a partir de la cual se observa una ligera disminución de la capacidad de inhibir el radical DPPH•. En el caso de los APCDs, también se observa un crecimiento en el porcentaje de inhibición del radical DPPH• hasta una concentración del 0,5% mg/mL, a partir de la cual se produce una disminución. Para la misma concentración de CDs utilizado, los RCDs presentan una mayor actividad. Así, por ejemplo, para una concentración de 0,2 mg/mL, el porcentaje de inhibición del radical DPPH• por RCDs y APCDs resultó ser del 40% y 20%, respectivamente.

En la Figura 9 se han recogido los resultados obtenidos para las películas reforzadas con CDs y se puede observar que el porcentaje de inhibición del radical DPPH• es función de la concentración de CDs utilizada en su preparación. Obsérvese también que la película que no ha sido reforzada también presenta una actividad antioxidante relativamente importante (55% de inhibición del DPPH• en las condiciones experimentales utilizadas). Este hecho puede adscribirse a la actividad antioxidante que presenta la caseína [5]. Se ha demostrado que la presencia de aminoácidos aromáticos como Trp, Tyr y Pre favorece la actividad antioxidante de los péptidos y que los anillos indol y pirrolidina en Trp y Pro, respectivamente, pueden actuar como donores de hidrógeno (via grupos hidroxilo) en la desactivación de radicales hidroxilo [9]. Asimismo, también se ha demostrado que la pectina posee propiedades antioxidantes debido a contaminantes (p.e. fenoles) que son co-extraídos con la pectina [6, 10]. La adición de CDs incrementa notablemente la capacidad inhibidora de radicales de las películas: un 62% para las reforzadas con 1% RCDs y un 42% para las reforzadas con un 1% APCDs.

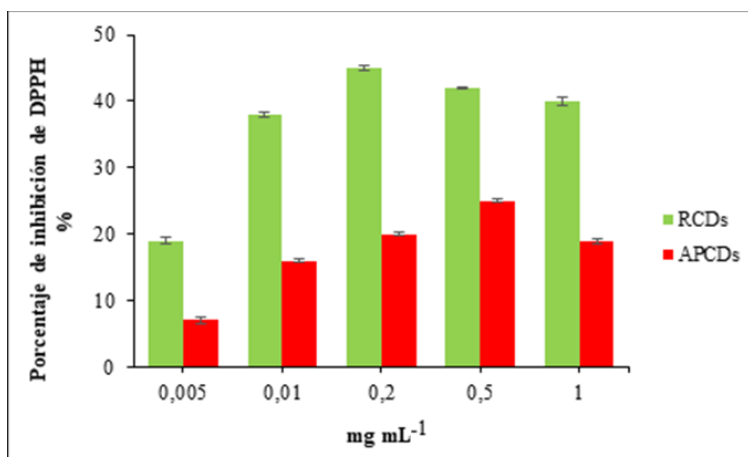


Figura 8. Actividad antioxidante de RCDs y APCDs empleando el ensayo DPPH.

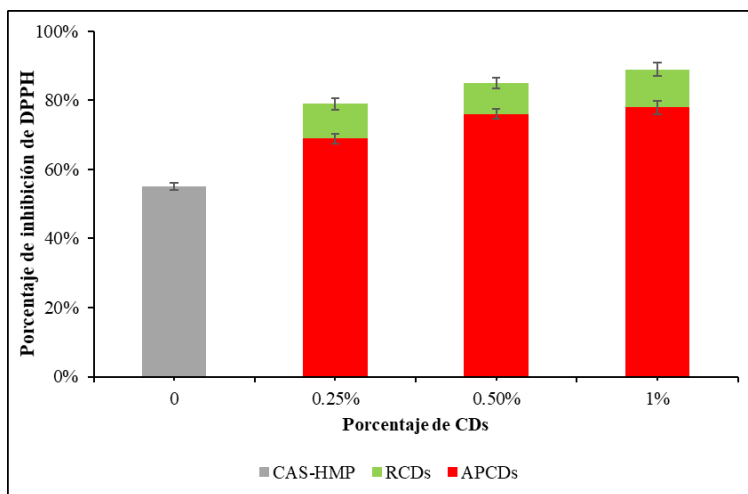


Figura 9. Actividad antioxidante de películas reforzadas con diferentes concentraciones de CDs.

3.3. Estudio del lixiviado en aceites de RCDs ocluidos en películas CAS/HMP+1RCD

Dado que el objetivo de reforzar bio-películas con CDs es su empleo final como material para envolver y/o empaquetar productos alimenticios, es necesario comprobar si estas películas en contacto con el alimento liberan los CDs y difunden hacia el producto. En el caso particular que nos ocupa, este estudio se llevó a cabo en las muestras de aceites sin utilizar ningún reactivo, gracias a las propiedades fluorescentes intrínsecas de los CDs. Para ello, en un pequeño vaso de precipitados se pesaron 25 g de aceite de oliva y se introdujo una pieza de 2 cm × 2 cm de una película reforzada con 1% RCD (muestra) y se mantuvo el conjunto en una placa con agitación suave durante 15 días a 25°C. Otro vaso conteniendo la misma cantidad de aceite y sin adición de película se sometió al mismo tratamiento térmico y de agitación durante el mismo tiempo y se utilizó como referencia (blanco). Cada día se tomaron 0,5 g de los aceites (blanco y muestra) y se disolvieron en 5mL de cloroformo para medir la señal de fluorescencia: a 348 nm que corresponde a la banda de emisión de los RCDs y a 322 nm correspondiente a la banda de emisión del aceite. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. La Figura 10 muestra la variación de la señal de fluorescencia a lo largo de los 15 días.

Desde el primer día es posible observar que la intensidad de emisión del aceite a 322 nm es ligeramente mayor que la que tienen las muestras de aceite que contienen las películas reforzadas con CDs. Además, la intensidad de la emisión del aceite conteniendo la película CAS/HMP+1RCD no aumenta, sino que incluso disminuye ligeramente, lo que parece indicar que los RCDs no se liberan de la película dado el carácter hidrofóbico del medio y su nula dispersibilidad en él.

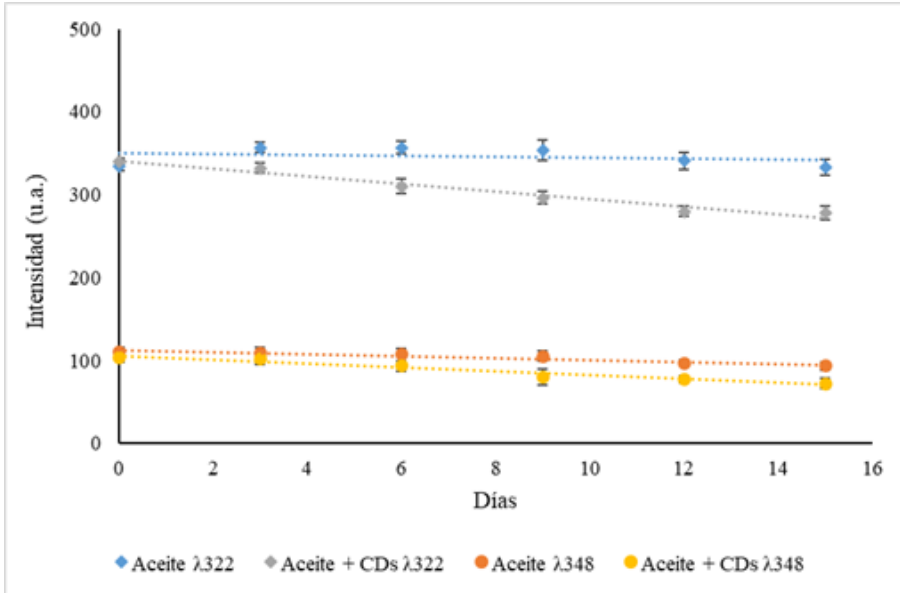


Figura 10. Estudio de liberación de RCDs contenidos en películas CAS/HMP+1RCDs en contacto con aceites

En la Figura 10 también se puede observar que a la longitud de onda de emisión de 348 nm (máximo de emisión de los RCDs) las tendencias siguen un patrón similar en el aceite limpio y en el aceite conteniendo la película CAS/HMP+1RCD, aunque la diferencia en las intensidades de emisión es menor. Una explicación plausible para la bajada en la intensidad de fluorescencia estaría relacionada con la presencia de agua/humedad en el aceite que contiene la película CAS/HMP+1RCD: se almacenan bajo una humedad relativa del 57% y durante el ensayo es posible que lentamente se liberen trazas de agua formando micelas inversas en el medio [11] y, por tanto, modificando la polaridad del mismo.

Los resultados de los experimentos llevados a cabo con muestras de un aceite cosmético fueron similares a los descritos para el aceite de oliva (Anexo III).

3.4. Influencia de las bio-películas CAS/HMP+CDs en el índice de peróxidos de aceites comestibles y cosméticos

Los aceites comestibles y muchos aceites cosméticos (que contienen aceites esenciales vegetales) tienen un elevado porcentaje de triacilglicéridos y ácidos grasos. En general, todos los aceites se deterioran (se oxidan) si no son convenientemente envasados y almacenados. La tasa de oxidación depende principalmente de factores inherentes como el perfil de ácidos grasos de la materia prima, del proceso de extracción, de los componentes minoritarios, así como de otros factores como son la humedad, la temperatura de almacenamiento, la presencia de oxígeno y la luz. La oxidación de lípidos no solo puede producir olores rancios, sabores desagradables y decoloración, sino que también puede disminuir la calidad nutricional y la seguridad de su uso debido a que los productos de degradación (p.e. radicales libres) pueden resultar nocivos para la salud humana [12]. Durante las primeras etapas del proceso de oxidación, se forman radicales de hidroperóxido y, a lo largo de los años, se han desarrollado diferentes métodos para determinar el grado de oxidación del aceite. En particular, el índice de peróxido (PV) es un indicador utilizado para evaluar la formación de hidroperóxidos y hay varios métodos disponibles para determinarlo. Con objeto de comprobar la eficacia de las bio-películas CAS/HMP+CDs para ralentizar y/o parar el proceso inicial de oxidación, se determinó el PV de los aceites (comestible y cosmético) en presencia y ausencia de las películas empleando la valoración yodométrica con detección potenciométrica del punto final [13], siguiendo el protocolo descrito en la Metodología. Para realizar este experimento se utilizaron solo las

películas que contenían un mayor porcentaje de CDs (CAS/HMP+1CD) pues resultaron tener el mayor potencial antioxidante en el ensayo DPPH•.

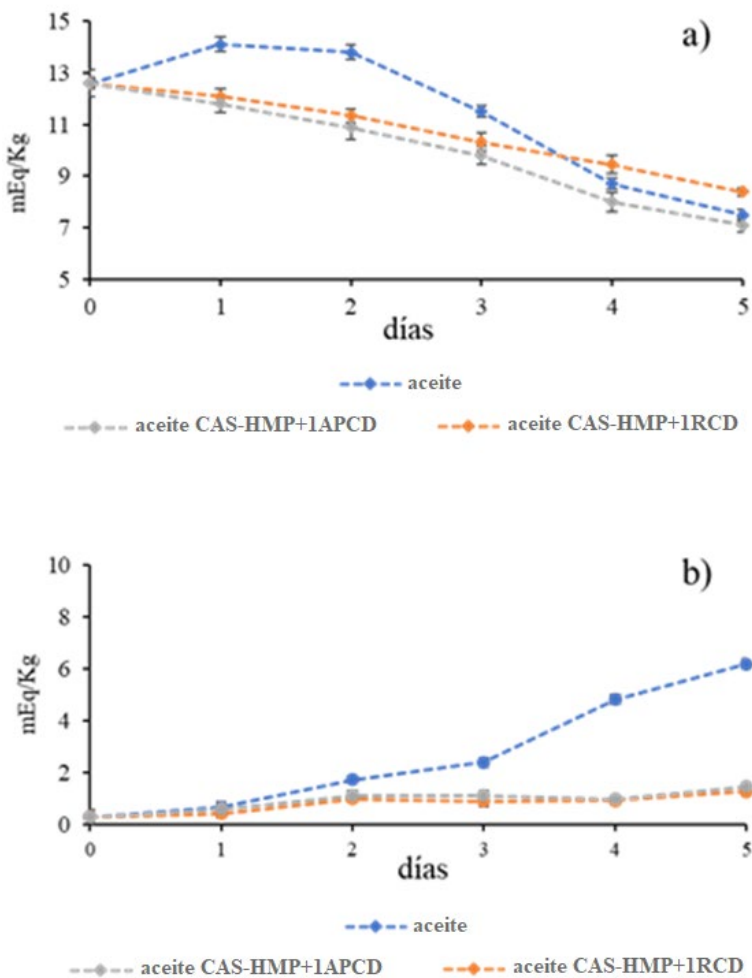


Figura 11. Estudio de formación de especies radicales en muestras de aceite de oliva (a) y aceite cosmético (b) tratados con películas antioxidantes.

Los resultados se recogen en la Figura 11 y se puede observar que en el caso del aceite de oliva los cambios más significativos en el PV tienen lugar

durante los primeros días del experimento. En ausencia de películas, se produjo un aumento del PV durante los 2 primeros días debido a la oxidación del aceite para después producirse una rápida disminución del PV debido, probablemente, a la terminación de la cadena de radicales libres. También se observó un comportamiento similar en las mediciones de las muestras del aceite cosmético, aunque el PV inicial fue significativamente menor que en el caso del aceite de oliva, pero sube continuamente durante el tiempo ensayado. Las muestras que contienen las películas reforzadas con CDs han mostrado que el PV en el aceite de oliva comienza a disminuir desde el primer día, sugiriendo que las películas desactivan los peróxidos generados en estas primeras etapas. En el caso del aceite cosmético, se puede comprobar cómo el PV se mantiene en un valor bajo durante todo el tiempo de estudio, indicando que estabilizan el aceite gracias al consumo de los peróxidos generados.

3.5. Posibles aplicaciones de las bio-películas en muestras de alimentos no grasos

Con el fin de comprobar si las bio-películas desarrolladas ofrecían un uso potencial como materiales antioxidantes en productos no grasos, y teniendo en cuenta la fragilidad de las películas en medios muy húmedos, se seleccionó una clase de manzana que se oxida muy rápidamente. Se probaron cuatro bio-películas: CAS/HMP, CAS/HMP+0,25CD, CAS/HMP+0,5CD y CAS/HMP+1CD. Las películas se cortaron en secciones de tamaño similar y se colocaron sobre la superficie de las manzanas que se habían cortado por la mitad, como se muestra en la Figura 12. Las muestras se mantuvieron a una temperatura ambiente de 25°C durante 90 minutos. Las películas se retiraron suavemente a los 45 minutos y se pudo observar que las áreas donde fueron

colocadas eran más claras que el resto de la superficie del fruto. La remoción de las películas de la superficie de la manzana fue difícil debido a la hidrofiliidad de las mismas. Incluso, algunas llegaron a perder totalmente su estructura durante los 45 minutos del experimento. Una vez que se retiraron las películas, se dejó que las muestras de manzana continuaran oxidándose durante otros 45 minutos, llegando a oscurecerse (oxidarse) toda el área, incluso las que previamente fueron cubiertas por las películas. La concentración de CDs en las películas y/o su origen (RCDs o APCDs) no impide el proceso de deterioro de las muestras, probablemente debido a la pérdida de estructura de las mismas. Aunque el problema de la estabilidad de las películas CAS/HMP en medios acuosos todavía está por resolver [14], este experimento nos brindó la oportunidad de comprobar que, una vez conseguida esa estabilidad, podrían ser utilizadas como materiales antioxidantes para el envasado de productos alimenticios con un grado de humedad elevado.

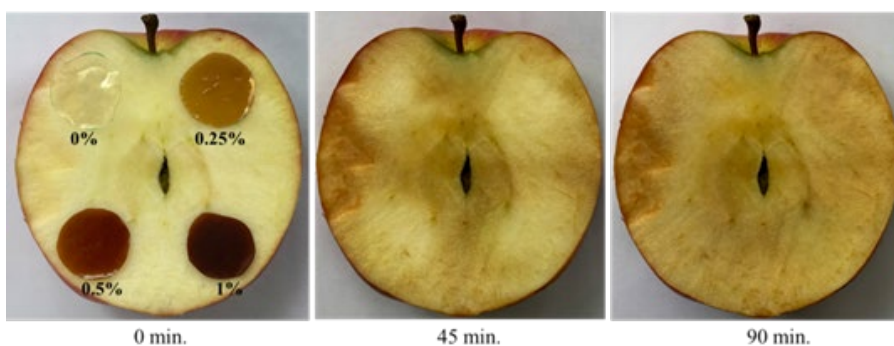


Figura 12. Proceso de envejecimiento (oxidación) de una muestra de manzana tratada con las películas CAS/HMP y CAS/HMP+CDs antioxidantes

4 CONCLUSIONES

En este capítulo se han estudiado las propiedades ópticas y antioxidantes de CDs obtenidos a partir de hojas de romero (RCDs) y de magaya de sidra (APCDs) y se han utilizado como aditivos para la fabricación de bio-películas de CAS/HMP. Ambos tipos de CDs presentan propiedades fluorescentes y antioxidantes, siendo los RCDs los de mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH•. Las películas CAS/HMP también presentan actividad antioxidante (debida a la caseína), la cual se incrementa con la adición RCDs. Se pudo demostrar mediante la determinación del índice de peróxidos que las películas CAS/HMP1CD ralentizan la oxidación de aceites comestibles y cosméticos. Sin embargo, las películas en contacto con productos comestibles con alto contenido en agua se desestabilizan por su elevada hidrofilia, por lo que se necesita ahondar, en trabajos futuros, en la estabilización de las mismas para ampliar su potencial como materiales activos (antioxidantes) para el envasado de alimentos y/o productos cosméticos.

5 BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Sanches-Silva, D. Costa, T.G. Albuquerque, G.G. Buonocore, F. Ramos, M.C. Castilho, A.V. Machado, H.S. Costa. Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2014, 31(3), 374-395. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.879215>
- [2] Legislación, Directiva 2006/52/CE (Comisión Europea 2006, <https://www.boe.es/doue/2006/204/L00010-00022.pdf>. Última consulta 14 de junio de 2021.
- [3] W.Meng, X. Bai, B. Wang, Z. Liu, S. Lu, B. Yang; Biomass-derived carbon dots and their applications. *Energy Environ. Mater.* 2019, **2**, 172–192. <https://doi.org/10.1002/eem2.12038>
- [4] A.B.T. Ghisaidoobe, S.J. Chung. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques; *Int. J. Mol. Sci.* 2014, **15**, 22518-22538; <https://doi.org/10.3390/ijms151222518>
- [5] Y.-E. Kim, J.W. Kim, S. Cheon, M.S. Nam, K.K. Kim. Alpha-casein and beta-lactoglobulin from cow milk exhibit antioxidant activity: A plausible link to antiaging effects. *J. Food Sci.* 2019, **84**, 3083–3090. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14812>
- [6] V.V. Smirnov, V.V. Golovchenko, F.V. Vityazev, O.A. Patova, N. Y. Selivanov, O.G. Selivanova, S.V. Popov. The Antioxidant Properties of Pectin Fractions Isolated from Vegetables Using a Simulated Gastric Fluid; *J. Chem.*, 2017, ID 5898594. <https://doi.org/10.1155/2017/5898594>

- [7] M. Szymanska-Chargot, A. Zdunek. Use of FT-IR Spectra and PCA to the Bulk Characterization of Cell Wall Residues of Fruits and Vegetables Along a Fraction Process. *Food Biophysics*. 2013, **8**, 29–42. <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9279-7>
- [8] R. Sun, S. Hughes. Extraction and physico-chemical characterization of pectins from sugar beet pulp. *Polym. J.*, 1998, **30**, 671–677. <https://doi.org/10.1295/polymj.30.671>
- [9] H. Zhang, S. Nakamura, D.D. Kitts; Antioxidant Properties of Casein Phosphopeptides (CPP) and Maillard-Type Conjugated Products, *Antioxidants*, 2020, **9**, 648. <https://doi.org/10.3390/antiox9080648>
- [10] J. Wang, S. Hu, S. Nie, Q. Yu, M. Xie. Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, **2016**, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/5692852>
- [11] C. Murru, R. Badía Laíño, M.E. Díaz-García. Oxidative Stability of Vegetal Oil-Based Lubricants; *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2021, **9** (4), 1459-1476. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c06988>
- [12] H. Uzun E. Ibanoglu E. Oxidation kinetics of hazelnut oil treated with ozone. *Grasas y aceites*, 2017, **68**(4), e222. <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/1689>
- [13] ISO 27107: 2008. Versión corregida 2009-05-15. Grasas y aceites animales y vegetales. Determinación del valor de peróxido. Punto final potenciométrico Determinación. Disponible en línea: <https://webstore.ansi.org/standards/din/dineniso271072010>
- [14] A. Lisitsyn, A. Semenova, V. Nasonova, E. Polishchuk, N. Revutskaya, I. Kozyrev, E. Kotenkova; Approaches in Animal Proteins and Natural Polysaccharides Application for Food Packaging: Edible Film Production and Quality Estimation; *Polymers*, 2021 **13**, 1592. <https://doi.org/10.3390/polym13101592>

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El empleo de las Redes Neuronales Artificiales acopladas con el FTIR demostraron ser una herramienta válida para la identificación de las variedades de uva utilizadas en la producción del vino DOP Vino de Calidad de Cangas, así como en la clasificación de su madurez, gracias a la posibilidad de extraer valiosa información de espectros FTIR con gran similitud estadística. La aplicación del algoritmo de los pesos de conexión de Olden permitió identificar las bandas de absorción características y los compuestos químicos que más influyen en la clasificación, concluyendo que la pectina es importante para la identificación varietal y el grado de madurez de las muestras mientras que la fructosa y, en menor grado, los polifenoles, juegan un papel importante en la identificación del grado de madurez. Los resultados de este trabajo se publicaron en la revista **Computers and Electronics in Agriculture**, 164 (2019) 104922, bajo el título “Artificial Neural Network and Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy to identify the chemical variables related to ripeness and variety classification of grapes for Protected. Designation of Origin wine production”.

El empleo de biomasa vegetal ha permitido sintetizar satisfactoriamente, empleando metodologías verdes, puntos cuánticos de carbono (CDs) por vía

hidrotermal a partir de desechos domésticos de té e industriales de bagazo de uva y magaya de manzana. Los CDs resultaron ser dispersables tanto en agua como en medios no acuosos y sus propiedades antioxidantes fueron determinadas mediante ensayos DPPH. Los resultados demostraron que pueden competir favorablemente con compuestos antioxidantes convencionales como el ácido ascórbico y la vitamina E. La buena solubilidad de los CDs en medio no acuosos los convierte en candidatos ideales para su empleo como aditivos en aceites lubricantes minerales, donde han demostrado aumentar la estabilidad oxidativa del aceite base, potenciando sus propiedades anti-fricción y anti-desgaste. Estos resultados, que forman parte del trabajo, se publicaron en la revista *Antioxidant*, 9 (2020) 1147, bajo el título “Synthesis and Characterization of Green Carbon Dots for Scavenging Radical Oxygen Species in Aqueous and Oil Samples”.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran, desde un punto de vista básico, que la composición de los materiales de partida es un factor clave para la síntesis de CDs con buenas propiedades antioxidantes y, desde un punto de vista práctico, que la reutilización de desechos industriales y/o domésticos para obtener nanomateriales activos es la forma de contribuir a implementar una economía circular, utilizando al mismo tiempo los conceptos de la química verde.

Se ha abordado la incorporación de los puntos cuánticos obtenidos a partir de biomasa vegetal para producir bio-películas activas, un enfoque innovador para ampliar los campos de aplicación de estos nanomateriales. Las películas, preparadas a partir de caseinato sódico y pectina y enriquecidas con puntos de carbonos obtenidos a partir de magaya de manzana y romero, demostraron tener una interesante capacidad para la remoción de especies radicalarias de oxígeno. Los CDs derivados de hojas de romero presentaron un mayor poder de inhibición del radical DPPH, resultando cercano al 50 %. La incorporación

de los CDs de romero a las bio-películas potencia la capacidad antioxidante de la propia biopelícula (55 % de inhibición debida a la caseína y la pectina), alcanzándose hasta un 90 % de inhibición. Los ensayos mecánicos han demostrado que las películas son estables en ambientes con humedad relativa menores del 50 % y temperaturas que no superen los 25°C. En particular, las películas fabricadas con un 1% p/p de CDs presentaron una estructura más resistente y una mejor estabilidad térmica, llegando a ser estables hasta los 45°C en ambientes con baja humedad relativa.

Se estudiaron también las propiedades ópticas de los puntos cuánticos de carbono y de las bio-películas. Los espectros de absorción UV-Visible de los CDs mostraron bandas de absorción centradas a 280 y 330 nm mientras que las bandas de los espectros de fluorescencia tienen un máximo de emisión a 440 nm, cuando se excitan a una longitud de onda de 350 nm. Los datos están en concordancia con los reportados en la literatura para otros CDs sintetizados a partir de biomasa orgánica y se mantienen al incorporarse en las bio-películas. Los resultados indican que estas películas activas ofrecen un valor añadido a su capacidad antioxidante como filtros o marcas luminiscentes.

Las bio-películas enriquecidas han demostrado un gran potencial en su aplicación en aceites donde son altamente estables y mantienen sus efectos como inhibidores de especies radicalarias de oxígeno. Su empleo en aceite alimentario y cosmético demuestra que se consigue mantener una estabilidad oxidativa desde que se inicia el contacto. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser un primer paso en el estudio de puntos de carbono con alta capacidad antioxidante en la preparación de Envases Activos en la Industria Alimentaria, Cosmética y de los Lubricantes

CONCLUSIONS

Despite the statistical similarity of the different FTIR spectra of a variety of grape skins and leaves, the use of Artificial Neural Networks coupled with the FTIR proved to be a valid tool for the identification of the grape varieties used in the production of the *DPO Vino de Calidad Cangas* wine as well as in their ripening degree. The Olden connection weights algorithm was used to identify the absorption bands and the main compounds for the classification, being pectin important for both varietal identification and ripening degree of the samples. Fructose was also a key compound for the evaluation of the ripening state. The results of this work were published in the journal *Computers and Electronics in Agriculture*, 164 (2019) 104922, under the title “*Artificial Neural Network and Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy to identify the chemical variables related to ripeness and variety classification of grapes for Protected. Designation of Origin wine production*”.

We successfully synthesize carbon dots (CDs) by a hydrothermal route from domestic tea waste and industrial grape bagasse. The carbon dots obtained were found to be dispersible both in water and in non-aqueous media and their antioxidant properties were determined by the DPPH essay. The results showed that CDs can compete favourably with conventional antioxidant compounds such as ascorbic acid and vitamin E. The good solubility of CDs

in non-aqueous media make them promising candidates as additives in mineral lubricating oils, increasing the oxidative stability of both mineral and vegetable oils and acting as green nano-additives with anti-friction and anti-wear functions. These results are part of the work published in the journal *Antioxidant*, 9 (2020) 1147, under the title "*Synthesis and Characterization of Green Carbon Dots for Scavenging Radical Oxygen Species in Aqueous and Oil Samples*".

The results obtained in this work demonstrated that, from a basic standpoint, the composition of the starting materials to produce CDs with antioxidant properties is a key factor and, from a practical point of view, the reuse of industrial and/or domestic wastes is the way to implement the circular economy and the green chemistry processes.

The use of quantum dots obtained from plant biomass to improve the properties of biofilms is an innovative approach to expand the practical applications of nanomaterials. The biofilms prepared from sodium caseinate and pectin, were enriched with different amounts of CDs obtained from apple pomace and rosemary. The CDs from rosemary leaves exhibited a high antioxidant activity against the DPPH radical, up to 50%. The incorporation of the rosemary CDs to the biofilms enhanced the antioxidant activity of the biofilms themselves (inherent activity due to the antioxidant properties of casein and pectin), reaching up to 90% of DPPH inhibition. The mechanical tests carried out with the films demonstrated their hydrophilic nature and poor resistance under environmental conditions of high relative humidity (>50%) and high temperatures (>25°C). However, biofilms containing a high amount of CDs (e.g. 1%w/w) presented a more tough structure and a high thermal stability, up to 45°C under low relative humidity.

The optical and antioxidant properties of CDs and biofilms were thoroughly studied. The UV-Visible absorption spectra of the CDs showed bands at 280 and 330 nm while the fluorescence spectra presented an emission band with maximum intensity at 440 nm, when excited at a wavelength of 350 nm. Similar data were observed when the CDs were added to the biofilms. CDs from apple bagasse and rosemary leaves were found to have good antioxidant properties, although those from rosemary showed a higher inhibition percentage of the DPPH radical. The films fortified with CDs were used as active materials to slow down the oxidative degradation of edible and cosmetic oils. Results demonstrated that since the first contact of the biofilms with the oils, their oxidative degradation was minimized. The results obtained in this work can be a first step towards the development of CDs with outstanding antioxidant properties and their use in the development of Active Containers in the Food, Cosmetics and Lubricant Industries.

Trabajos relacionados con la presente

Tesis Doctoral

y

Sugerencias para trabajos futuros

Trabajos relacionados con la presente Tesis Doctoral

Partículas de sílice obtenidas a partir de cáscara de arroz y su funcionalización con diosgenina: biocida biocompatible para la agricultura. Estudios preliminares.

Introducción

A pesar de los avances en el campo de los nanomateriales y sus aplicaciones en muy diversos campos, es preciso abordar, todavía, el reto de la sostenibilidad, particularmente en el campo de la Agricultura. Entre los diferentes tipos de nanomateriales, las nanopartículas presentan propiedades químicas y físicas únicas y diferentes al material base y ofrecen un gran potencial en agricultura no sólo en el crecimiento y desarrollo de las plantas sino también como vehículo para la liberación de pesticidas, fungicidas, herbicidas, fertilizantes, factores de crecimiento, proteínas y otros compuestos. Uno de los objetivos más importantes en la producción de nano-agro-partículas es su síntesis sin emplear elementos tóxicos o instrumentación sofisticada. Por ello, la comunidad científica está enfocando sus esfuerzos en utilizar como materiales de partida respetuosos con el medio ambiente, como son plantas y subproductos agrícolas. Entre las nanopartículas más utilizadas en agricultura se encuentran las nanopartículas de sílice (SiO_2NPs) con diferentes fines: mejora del crecimiento, rendimiento, incremento en la concentración de clorofila, contenido en agua, etc. [1, 2]. En el presente trabajo, hemos

abordado la síntesis de SiO₂NPs a partir de un material biogénico, la cáscara de arroz, como fuente importante de sílice [3]. Aproximadamente el 20% del volumen de arroz en grano es cáscara, por lo que cada año se producen alrededor de 144 millones de toneladas de cascarilla de arroz. Aunque parte de este material se destina a alimentar ganado, la mayor parte se desecha en los campos o los ríos o se quema, lo que supone importantes problemas medioambientales. Con objeto de aliviar este problema, se han desarrollado varias tecnologías circulares para revalorizar la cascarilla de arroz: en la industria de la construcción para hacer cemento, fertilizantes de bajo costo, en la producción de energía, en la purificación de aguas, etc. [4].

En el presente trabajo, realizado durante mi estancia en la Universidad de La Habana, bajo la supervisión de la Dra. Alicia Marcelina Díaz García, hemos utilizado la cascarilla de arroz para la obtención de nanopartículas de sílice, dado el elevado contenido en sílice de este material (94,50% en peso) [5], con el objeto de su posterior funcionalización con diosgenina para su uso como biocida en agricultura. Este proyecto es novedoso pues, hasta la fecha, no se ha descrito el empleo de la diosgenina inmovilizada en nanopartículas para su empleo en la eliminación de plagas.

Síntesis de SiO₂NPs a partir de cascarilla de arroz

Para la síntesis de las SiO₂NPs se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Hincapié-Rojas y col. [6] con ligeras modificaciones. Se pesaron 30 gramos de cascarilla de arroz y se lavaron con agua destilada para eliminar impurezas y otros contaminantes. A continuación se secaron en horno a 100°C durante 3 horas y, posteriormente se quemaron en una mufla a 400°C durante 1 hora para eliminar la mayor parte de la materia orgánica. Finalmente, la temperatura se incrementó a 800°C durante 1 hora con objeto de reducir cualquier material carbonoso para la obtención de las cenizas blancas. A

continuación, se adicionó ácido clorhídrico 0.1 M (250 mL por cada 15 g de ceniza) y se agitó durante 1 hora a 90°C. El precipitado obtenido se lavó cuatro veces con agua destilada, se filtró y se secó en horno convencional a 100°C durante 3 h (Figura 1). Se obtuvo una cantidad final de 3.4 gramos de cenizas blanca con un alto contenido de sílice y el proceso tuvo un rendimiento del 1%.

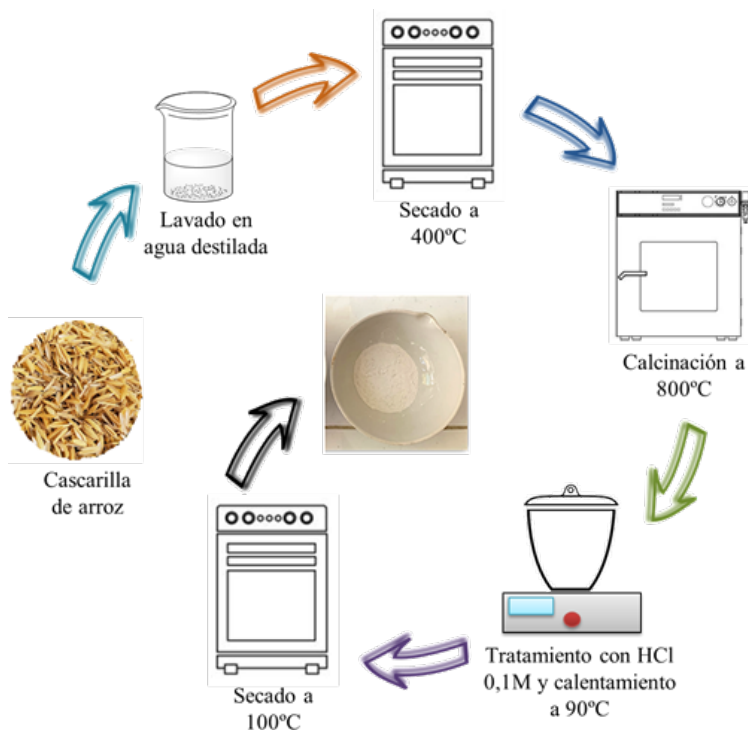


Figura 1. Diagrama de flujo mostrando los pasos llevados a cabo para la obtención de las partículas de sílice a partir de la cascarilla de arroz.

Tras este tratamiento, se obtuvo un polvo blanco rico en sílice en cómo se puede observar en la Figura 2.

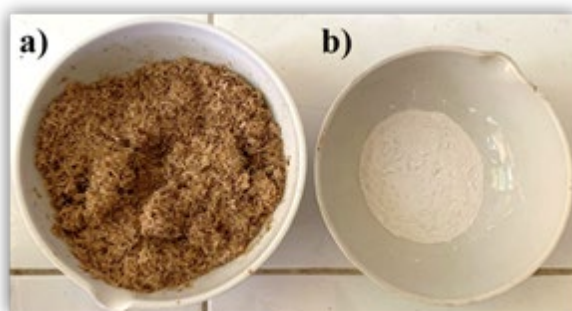


Figura 2. a) Cascarilla de arroz y b) SiO₂ obtenido mediante el proceso de calcinación.

Diosgenina: características y aplicaciones

La diosgenina (Figura 3), una sapogenina esteroidal natural, es un compuesto bioactivo muy conocido y está presente abundantemente en hierbas medicinales como el rizoma de *Dioscorea*, *Dioscorea villosa*, *Trigonella foenum-graecum*, *Smilax China* y *Rhizoma polygonati*. [7]. Tiene una amplia gama de aplicaciones en el campo bio-médico, debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas.

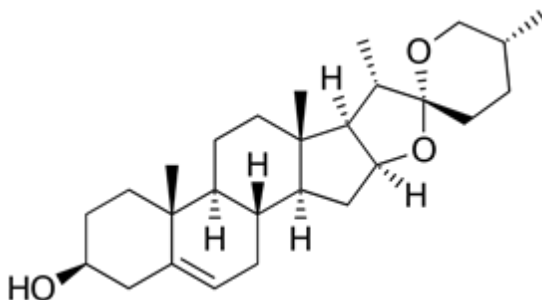


Figura 3. Estructura química de la Diosgenina.

La diosgenina se utiliza como un material de partida importante para la producción de fármacos esteroideos en la industria farmacéutica [8]. También ha sido utilizada por su actividad biocida contra pestes por insectos [9, 10 11], aunque no hemos podido encontrar referencias a su inmovilización en ningún tipo de nanomateriales.

Tareas a realizar

El objetivo de este trabajo es la obtención de un complejo altamente biocida biocompatible y no toxico que incorpore las propiedades antimicóticas y antimicrobianas de las SiO₂NPs y la molécula bioactiva Diosgenina para estudiar su posible aplicación en Agricultura.

- Caracterización fisico-química de las SiO₂NPs
- Estudio de los procesos de inmovilización de la diosgenina en las SiO₂NPs: adsorción física y enlace químico.
- Caracterización fisico-química de los materiales obtenidos.
- Estudio de la actividad biocida de los materiales con mayor potencial.
- Aplicación a sistemas vegetales reales.

Bibliografía

[1] A Rastogi, D. K.Tripathi, S. Yadav, D. K.Chauhan, M. Živčák, M. Ghorbanpour, N. I. El-Sheery, M. Brestic; Application of silicon nanoparticles in agricultura; *Biotech*, 2019, **9**, 90. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1626-7>

- [2] O.M. Elshayb, A.M. Nada, H. M. Ibrahim, H. E. Amin, A. M. Atta; Application of Silica Nanoparticles for Improving Growth, Yield, and Enzymatic Antioxidant for the Hybrid Rice EHR1 Growing under Water Regime Conditions; *Materials*, 2021, **14**, 1150. <https://doi.org/10.3390/ma14051150>
- [3] Nayak, P., Datta, A. Synthesis of SiO₂-Nanoparticles from Rice Husk Ash and its Comparison with Commercial Amorphous Silica through Material Characterization. *Silicon*, 2021, **13**, 1209–1214. <https://doi.org/10.1007/s12633-020-00509-y>
- [4] A. Geethakarathi; Novel Approaches Towards Sustainable Management of an Agricultural Residue - The Rice Husk, *Nat. Environment. Poll. Tech.*, 2021, **20**, 349-355. <https://doi.org/10.46488/NEPT.2021.v20i01.040>
- [5] R. Ghosh, S. Bhattacharjee. A review study on precipitated silica and activated carbon from rice husk. *J. Chem. Eng. Process Technol.*, 2013, **4(4)**, <https://doi.org/10.4172/2157-7048.1000156>
- [6] D.F. Hincapié-Rojas, P. Pineda-Gomez, A. Rosales-Rivera. Synthesis and characterisation of submicron silica particles from rice husk; *Green Materials*, 2018, **6(1)**, 15-22. <https://doi.org/10.1680/jgrma.17.00019>
- [7] A.P. Martins, E. Gallardo, S. Silvestre. Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology. *J Anal Methods Chem.* 2016, **2016**, 4156293. <https://doi.org/10.1155/2016/4156293>
- [8] S. Cong, Q. Tong, Q. Peng, T. Shen, X. Zhu, Y. Xu, S. Qi. In vitro anti-bacterial activity of diosgenin on *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Mol Med Rep.* 2020, **22(6)**, 5392-5398. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11620>
- [9] E. De Geyter, E. Lambert, D. Geelen, G. Smagghe (2007) Novel advances with plant saponins as natural insecticides to control pest insects. *Pest Technol* 2007, **1**, 96–105

[10] S. Balwinder, K. Amritpal; Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: A review; *LWT Food Sci Technol*, 2018, **87**, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.077>

[11] S. Pipithsangchan, B. Morallo-Rejesus. Insecticidal activity of diosgenin isolated from three species of grape ginger (*Costus* spp.) on the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Philipp. Agric. Scientist*. 2005, **88(3)**, 317-327. <https://www.ukdr.uplb.edu.ph/journal-articles/2951>

Sugerencias para trabajos futuros

Basándonos en los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, se considera interesante ampliar varios ítems, relacionados fundamentalmente con los puntos cuánticos de carbono (CDs):

- Profundizar en el estudio de los CDs con propiedades antioxidantes. En este sentido, no hay un estudio sistemático sobre:
a) la importancia del material de partida para la síntesis de los CDs en su actividad antioxidante, b) el mecanismo de acción antioxidante, c) su citotoxicidad y d) en los métodos de síntesis basados en química verde.
- Empleo de CDs como agentes antioxidantes y antimicrobianos en envases activos para productos alimentarios. El empleo de CDs como agentes antioxidantes en películas biocompatibles abre el camino para estudiar más a fondo los efectos positivos de este tipo de nanomateriales en la fabricación de películas obtenidas a partir de materiales renovables. Se requiere un estudio más profundo que aborde: a) estabilización de las películas para su empleo en entornos con una humedad relativa alta modificando la composición de la misma, b) estudio de la difusión de los CDs hacia

el material con el que está en contacto la película, c) estabilidad a largo plazo de las películas y d) estudio de las características organolépticas del producto en contacto con las películas, entre otros temas.

- Aplicaciones en muestras reales y transferencia de resultados. Este campo está en sus inicios, pues hasta la fecha desconocemos que existan en el mercado materiales activos, biocompatibles (biopelículas, polímeros) y seguros para uso alimentario, que contengan CDs. Este sería un gran paso en la investigación.

ANEXO I

ANEXO I

Capítulo 1. Estudio de variables químicas en el hollejo de uvas y hojas de vid empleando ATR-FTIR/Redes Neuronales Artificiales: Relación con el grado de madurez y la clasificación varietal

I.1. Relación entre el número de onda en cm^{-1} correspondiente al máximo de la banda de absorción.

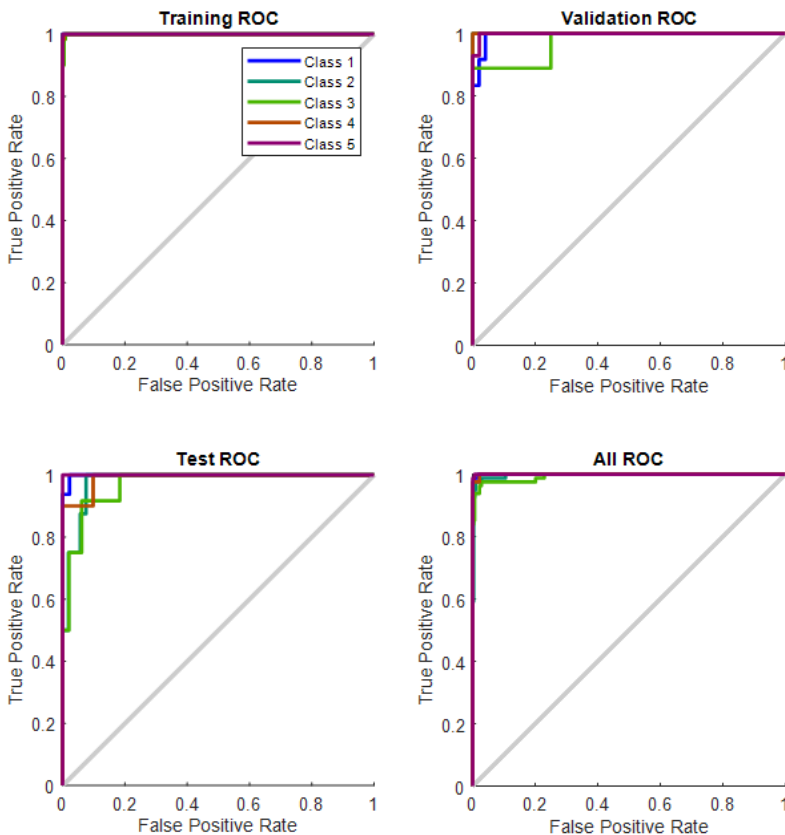
Número de onda, cm^{-1}	Variable	Número de onda, cm^{-1}	Variable
644,1	# 39	1270,8	# 14
653,7	# 29	1303,2	# 13
682,7	# 38	1320,3	# 12
719,2	# 28	1364,2	# 11
728,1	# 34	1376,8	# 10
761,7	# 27	1386,2	# 9
813,4	# 26	1417,3	# 33
825,4	# 35	1432,8	# 36
884,9	# 25	1462,8	# 8
915,8	# 24	1470,8	# 30
961,0	# 23	1517,1	# 7
998,2	# 22	1541,2	# 32
1008,8	# 37	1559,0	# 31
1031,6	# 21	1628,7	# 6
1045,7	# 20	1687,1	# 5
1063,1	# 19	1713,1	# 4
1104,6	# 18	1732,8	# 3
1166,4	# 17	2658,9	# 40

1210,6	# 16	2848,8	# 1
1241,8	# 15	2916,5	# 2

I.2.a Curvas de ROC para la clasificación por tipo de uva en cada semana. En la tabla se indican el código empleado para denominar cada variedad y el color empleado en las gráficas.

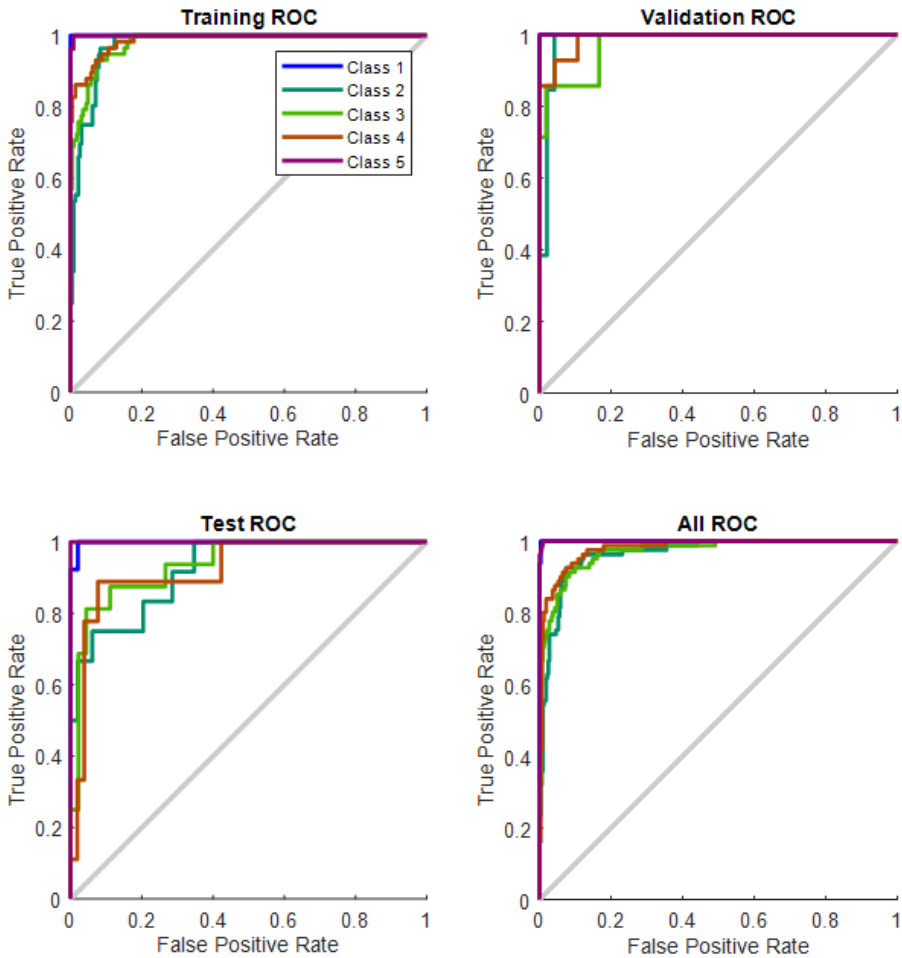
Variedad	Código	Color
Albarín Blanco, AB	Clase1	Azul
Albarín Negro, AN	Clase 2	Verde
Carrasquín, CQ	Clase 3	Verde claro
Mencia, MN	Clase 4	Rojo
Verdejo Negro, VN	Clase 5	Morado

Curvas ROC: Primera semana



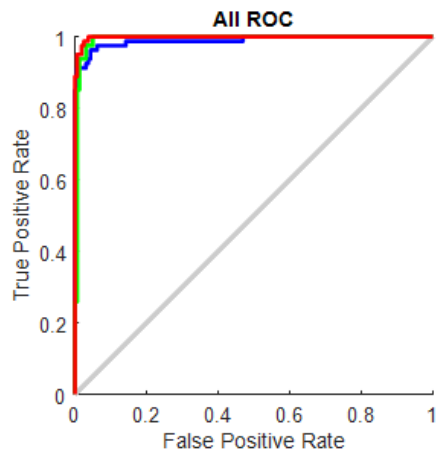
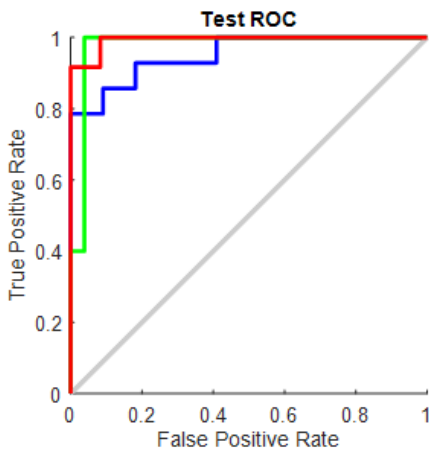
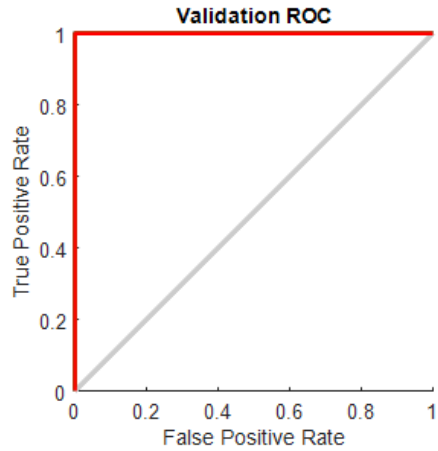
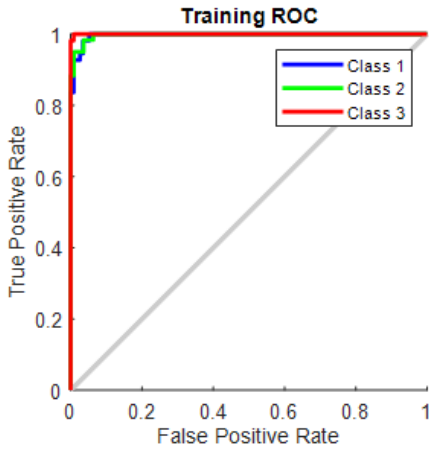
Curvas ROC: Segunda semana

Variedad	Código	Color
Albarín Blanco, AB	Clase 1	Azul
Albarín Negro, AN	Clase 2	Verde
Carrasquín, CQ	Clase 3	Verde claro
Mencía, MN	Clase 4	Rojo
Verdejo Negro, VN	Clase 5	Morado



Curvas ROC: Tercera semana

Variedad	Código	Color
Albarín Blanco, AB	Clase 1	Azul
Albarín Negro, AN	Clase 2	Verde
Carrasquín, CQ	Clase 3	Verde claro
Mencia, MN	Clase 4	Rojo
Verdejo Negro, VN	Clase 5	Morado



I.2.b. Matrices de confusión: Clasificación varietal

Primera semana

		Training Confusion Matrix					
Output Class	1	53 18.8%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	100% 0.0%
	2	0 0.0%	60 21.3%	1 0.4%	0 0.0%	0 0.0%	98.4% 1.6%
	3	0 0.0%	0 0.0%	59 20.9%	1 0.4%	0 0.0%	98.3% 1.7%
	4	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	57 20.2%	0 0.0%	100% 0.0%
	5	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	51 18.1%	100% 0.0%
			100% 0.0%	100% 0.0%	98.3% 1.7%	98.3% 1.7%	100% 0.0%
		Target Class					

		Validation Confusion Matrix					
Output Class	1	11 18.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 1.6%	91.7% 8.3%
	2	0 0.0%	13 21.3%	1 1.6%	0 0.0%	0 0.0%	92.9% 7.1%
	3	1 1.6%	0 0.0%	8 13.1%	0 0.0%	0 0.0%	88.9% 11.1%
	4	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	13 21.3%	0 0.0%	100% 0.0%
	5	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	13 21.3%	100% 0.0%
			91.7% 8.3%	100% 0.0%	88.9% 11.1%	100% 0.0%	92.9% 7.1%
		Target Class					

		Test Confusion Matrix					
Output Class	1	16 26.2%	1 1.6%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	94.1% 5.9%
	2	0 0.0%	6 9.8%	1 1.6%	0 0.0%	0 0.0%	85.7% 14.3%
	3	0 0.0%	0 0.0%	9 14.8%	1 1.6%	0 0.0%	90.0% 10.0%
	4	0 0.0%	1 1.6%	2 3.3%	9 14.8%	0 0.0%	75.0% 25.0%
	5	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	15 24.6%	100% 0.0%
			100% 0.0%	75.0% 25.0%	75.0% 25.0%	90.0% 10.0%	100% 0.0%
		Target Class					

		All Confusion Matrix					
Output Class	1	80 19.8%	1 0.2%	0 0.0%	0 0.0%	1 0.2%	97.6% 2.4%
	2	0 0.0%	79 19.6%	3 0.7%	0 0.0%	0 0.0%	96.3% 3.7%
	3	1 0.2%	0 0.0%	76 18.8%	2 0.5%	0 0.0%	96.2% 3.8%
	4	0 0.0%	1 0.2%	2 0.5%	79 19.6%	0 0.0%	96.3% 3.7%
	5	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	79 19.6%	100% 0.0%
			98.8% 1.2%	97.5% 2.5%	93.8% 6.2%	97.5% 2.5%	98.8% 1.2%
		Target Class					

Segunda semana

Training Confusion Matrix

Output Class	1	58 20.5%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	100% 0.0%
	2	0 0.0%	43 15.2%	10 3.5%	4 1.4%	1 0.4%	74.1% 25.9%
	3	0 0.0%	7 2.5%	43 15.2%	3 1.1%	0 0.0%	81.1% 18.9%
	4	0 0.0%	6 2.1%	4 1.4%	51 18.0%	1 0.4%	82.3% 17.7%
	5	0 0.0%	0 0.0%	1 0.4%	0 0.0%	51 18.0%	98.1% 1.9%
			100% 0.0%	76.8% 23.2%	74.1% 25.9%	87.9% 12.1%	96.2% 3.8%
		1	2	3	4	5	
		Target Class					

Validation Confusion Matrix

Output Class	1	10 16.4%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	100% 0.0%
	2	0 0.0%	13 21.3%	1 1.6%	0 0.0%	0 0.0%	92.9% 7.1%
	3	0 0.0%	0 0.0%	6 9.8%	2 3.3%	0 0.0%	75.0% 25.0%
	4	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	12 19.7%	0 0.0%	100% 0.0%
	5	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	17 27.9%	100% 0.0%
			100% 0.0%	100% 0.0%	85.7% 14.3%	85.7% 14.3%	100% 0.0%
		1	2	3	4	5	
		Target Class					

Test Confusion Matrix

Output Class	1	13 21.3%	0 0.0%	1 1.6%	0 0.0%	0 0.0%	92.9% 7.1%
	2	0 0.0%	7 11.5%	1 1.6%	0 0.0%	0 0.0%	87.5% 12.5%
	3	0 0.0%	1 1.6%	13 21.3%	1 1.6%	0 0.0%	86.7% 13.3%
	4	0 0.0%	3 4.9%	1 1.6%	8 13.1%	0 0.0%	66.7% 33.3%
	5	0 0.0%	1 1.6%	0 0.0%	0 0.0%	11 18.0%	91.7% 8.3%
			100% 0.0%	58.3% 41.7%	81.3% 18.8%	88.9% 11.1%	100% 0.0%
		1	2	3	4	5	
		Target Class					

All Confusion Matrix

Output Class	1	81 20.0%	0 0.0%	1 0.2%	0 0.0%	0 0.0%	98.8% 1.2%
	2	0 0.0%	63 15.6%	12 3.0%	4 1.0%	1 0.2%	78.8% 21.3%
	3	0 0.0%	8 2.0%	62 15.3%	6 1.5%	0 0.0%	81.6% 18.4%
	4	0 0.0%	9 2.2%	5 1.2%	71 17.5%	1 0.2%	82.6% 17.4%
	5	0 0.0%	1 0.2%	1 0.2%	0 0.0%	79 19.5%	97.5% 2.5%
			100% 0.0%	77.8% 22.2%	76.5% 23.5%	87.7% 12.3%	97.5% 2.5%
		1	2	3	4	5	
		Target Class					

Tercera semana

Training Confusion Matrix

Output Class	1	51 30.0%	1 0.6%	0 0.0%	98.1% 1.9%
	2	1 0.6%	59 34.7%	0 0.0%	98.3% 1.7%
	3	3 1.8%	0 0.0%	55 32.4%	94.8% 5.2%
		92.7% 7.3%	98.3% 1.7%	100% 0.0%	97.1% 2.9%
		1	2	3	
		Target Class			

Validation Confusion Matrix

Output Class	1	11 30.6%	0 0.0%	0 0.0%	100% 0.0%
	2	0 0.0%	10 27.8%	0 0.0%	100% 0.0%
	3	0 0.0%	1 2.8%	14 38.9%	93.3% 6.7%
		100% 0.0%	90.9% 9.1%	100% 0.0%	97.2% 2.8%
		1	2	3	
		Target Class			

Test Confusion Matrix

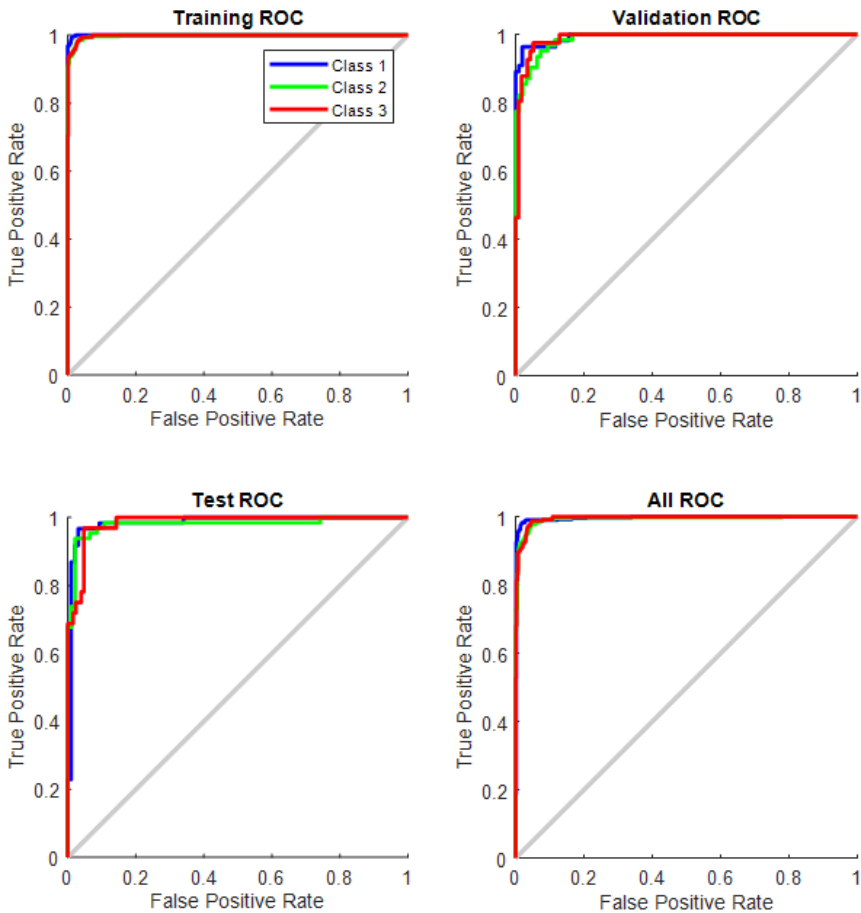
Output Class	1	11 30.6%	1 2.8%	0 0.0%	91.7% 8.3%
	2	1 2.8%	9 25.0%	0 0.0%	90.0% 10.0%
	3	2 5.6%	0 0.0%	12 33.3%	85.7% 14.3%
		78.6% 21.4%	90.0% 10.0%	100% 0.0%	88.9% 11.1%
		1	2	3	
		Target Class			

All Confusion Matrix

Output Class	1	73 30.2%	2 0.8%	0 0.0%	97.3% 2.7%
	2	2 0.8%	78 32.2%	0 0.0%	97.5% 2.5%
	3	5 2.1%	1 0.4%	81 33.5%	93.1% 6.9%
		91.3% 8.8%	96.3% 3.7%	100% 0.0%	95.9% 4.1%
		1	2	3	
		Target Class			

I.3.a. Curvas de ROC para la clasificación por grado de maduración. En la tabla se indican el código empleado para denominar cada semana y el color empleado en las gráficas.

Variedad	Código	Color
Primera semana	Clase 1	Azul
Segunda semana	Clase 2	Verde
Tercera semana	Clase 3	Rojo



I.3.b. Matrices de confusión: Clasificación por grado de maduración independiente del tipo de uva (suma de todas las uvas)

Training Confusion Matrix

Output Class	1	285 38.7%	3 0.4%	1 0.1%	98.6% 1.4%
	2	3 0.4%	272 37.0%	9 1.2%	95.8% 4.2%
	3	1 0.1%	3 0.4%	159 21.6%	97.5% 2.5%
		98.6% 1.4%	97.8% 2.2%	94.1% 5.9%	97.3% 2.7%
		↖ ↘ ↻	Target Class		

Validation Confusion Matrix

Output Class	1	52 32.9%	2 1.3%	0 0.0%	96.3% 3.7%
	2	2 1.3%	58 36.7%	5 3.2%	89.2% 10.8%
	3	1 0.6%	2 1.3%	36 22.8%	92.3% 7.7%
		94.5% 5.5%	93.5% 6.5%	87.8% 12.2%	92.4% 7.6%
		↖ ↘ ↻	Target Class		

Test Confusion Matrix

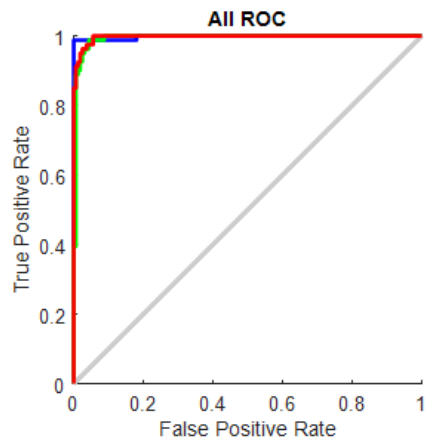
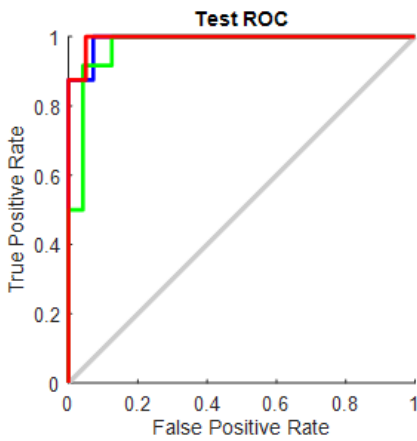
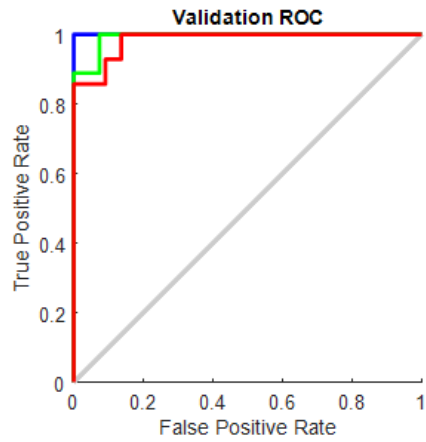
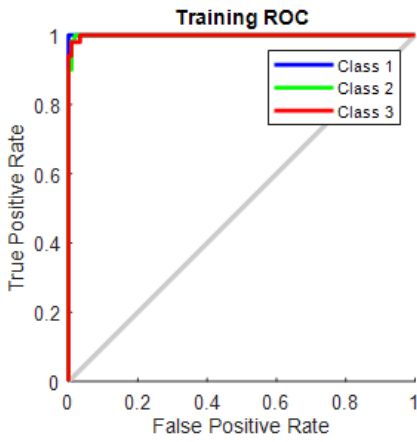
Output Class	1	57 36.1%	2 1.3%	1 0.6%	95.0% 5.0%
	2	1 0.6%	63 39.9%	8 5.1%	87.5% 12.5%
	3	3 1.9%	0 0.0%	23 14.6%	88.5% 11.5%
		93.4% 6.6%	96.9% 3.1%	71.9% 28.1%	90.5% 9.5%
		↖ ↘ ↻	Target Class		

All Confusion Matrix

Output Class	1	394 37.5%	7 0.7%	2 0.2%	97.8% 2.2%
	2	6 0.6%	393 37.4%	22 2.1%	93.3% 6.7%
	3	5 0.5%	5 0.5%	218 20.7%	95.6% 4.4%
		97.3% 2.7%	97.0% 3.0%	90.1% 9.9%	95.5% 4.5%
		↖ ↘ ↻	Target Class		

I.4.a. Curvas de ROC para la clasificación por grado de maduración para la variedad Albarín Negro, AN.

Variedad	Código	Color
Primera semana	Clase 1	Azul
Segunda semana	Clase 2	Verde
Tercera semana	Clase 3	Rojo



I.4.b. Matrices de confusión para la variedad Albarín Negro, AN.

Training Confusion Matrix

Output Class	1	60 35.3%	0 0.0%	1 0.6%	98.4% 1.6%
	2	0 0.0%	58 34.1%	1 0.6%	98.3% 1.7%
	3	0 0.0%	2 1.2%	48 28.2%	96.0% 4.0%
		100% 0.0%	96.7% 3.3%	96.0% 4.0%	97.6% 2.4%
		1 2 3	Target Class		

Validation Confusion Matrix

Output Class	1	13 36.1%	0 0.0%	0 0.0%	100% 0.0%
	2	0 0.0%	8 22.2%	2 5.6%	80.0% 20.0%
	3	0 0.0%	1 2.8%	12 33.3%	92.3% 7.7%
		100% 0.0%	88.9% 11.1%	85.7% 14.3%	91.7% 8.3%
		1 2 3	Target Class		

Test Confusion Matrix

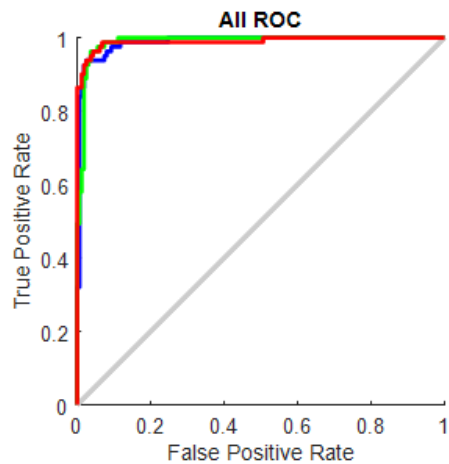
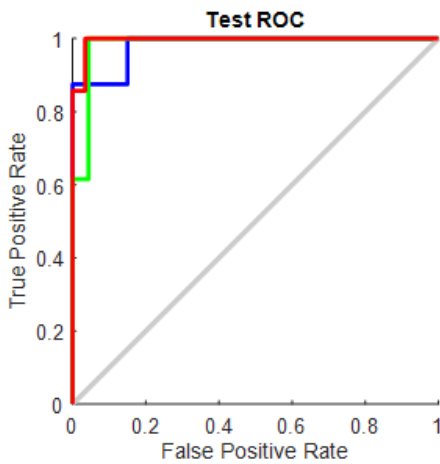
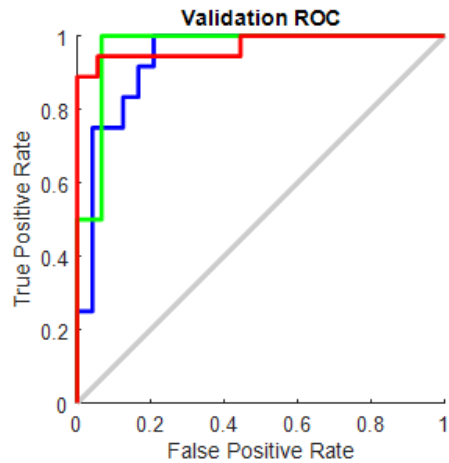
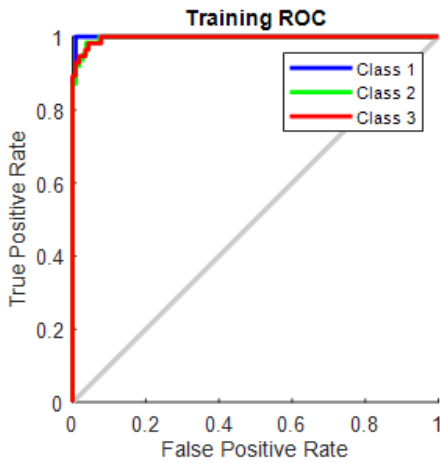
Output Class	1	7 19.4%	0 0.0%	0 0.0%	100% 0.0%
	2	1 2.8%	11 30.6%	1 2.8%	84.6% 15.4%
	3	0 0.0%	1 2.8%	15 41.7%	93.8% 6.3%
		87.5% 12.5%	91.7% 8.3%	93.8% 6.3%	91.7% 8.3%
		1 2 3	Target Class		

All Confusion Matrix

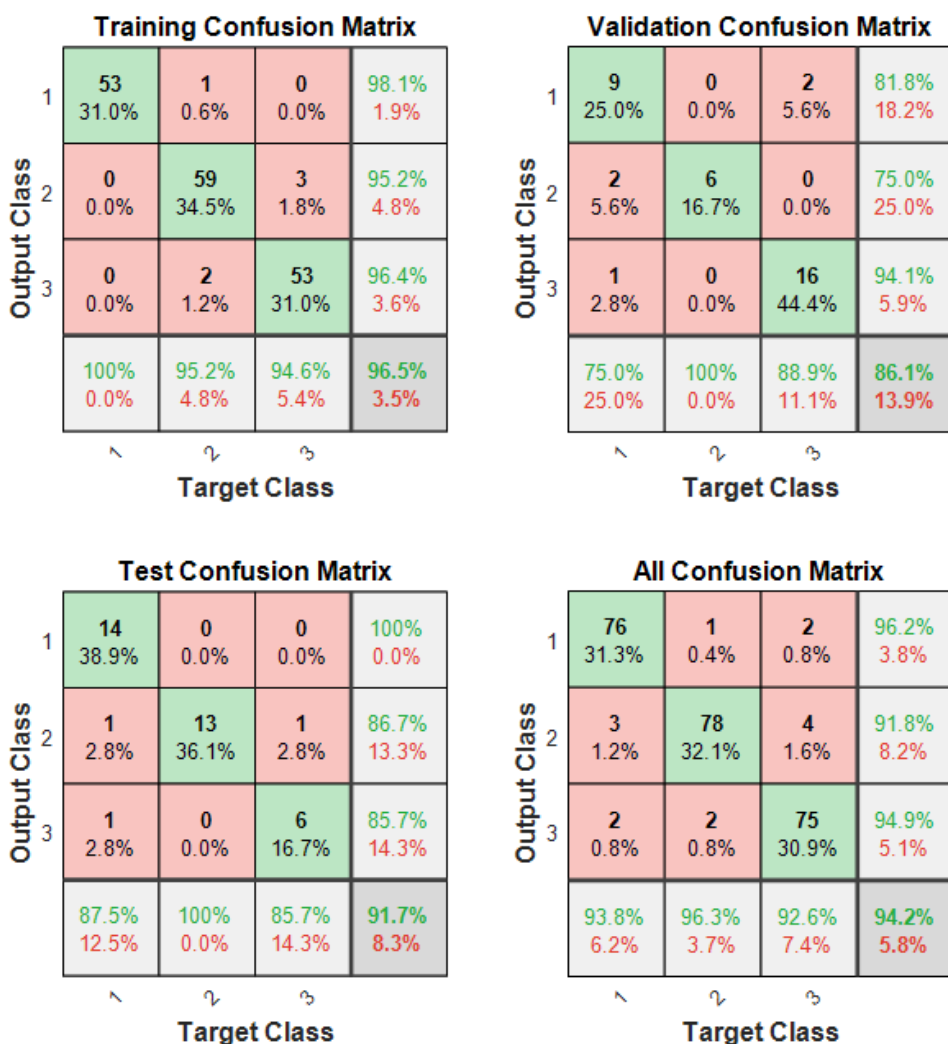
Output Class	1	80 33.1%	0 0.0%	1 0.4%	98.8% 1.2%
	2	1 0.4%	77 31.8%	4 1.7%	93.9% 6.1%
	3	0 0.0%	4 1.7%	75 31.0%	94.9% 5.1%
		98.8% 1.2%	95.1% 4.9%	93.8% 6.3%	95.9% 4.1%
		1 2 3	Target Class		

I.5.a. Curvas de ROC para la clasificación por grado de maduración para la variedad Carrasquín, CQ.

Variedad	Código	Color
Primera semana	Clase 1	Azul
Segunda semana	Clase 2	Verde
Tercera semana	Clase 3	Rojo

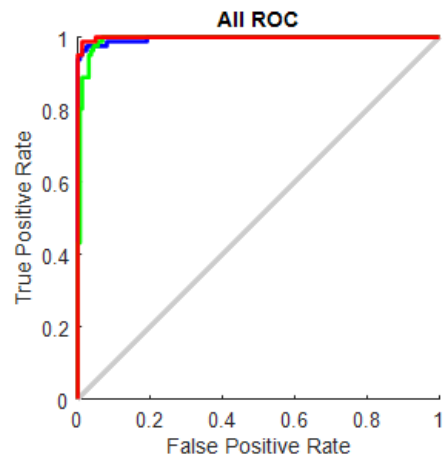
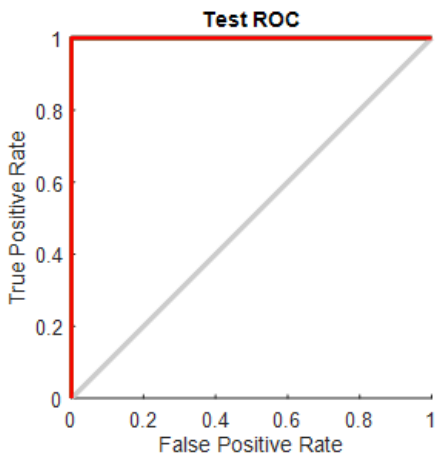
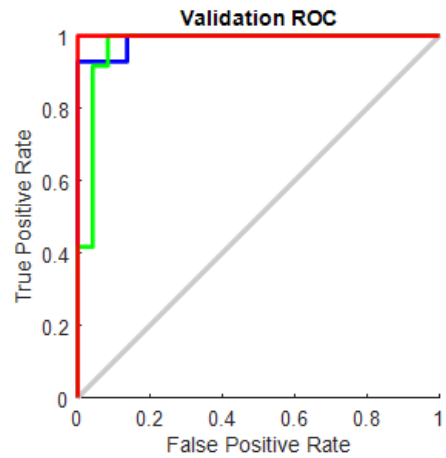
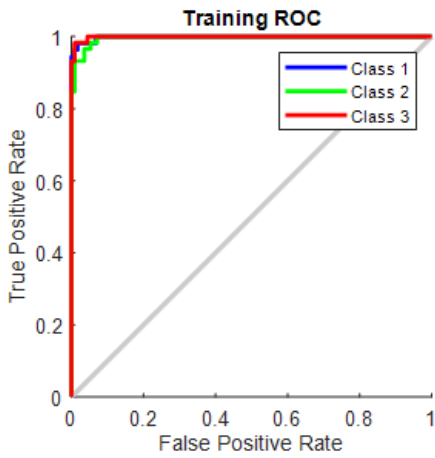


I.5.b. Matrices de confusión clasificación por grado de maduración para la variedad Carrasquín, CQ.

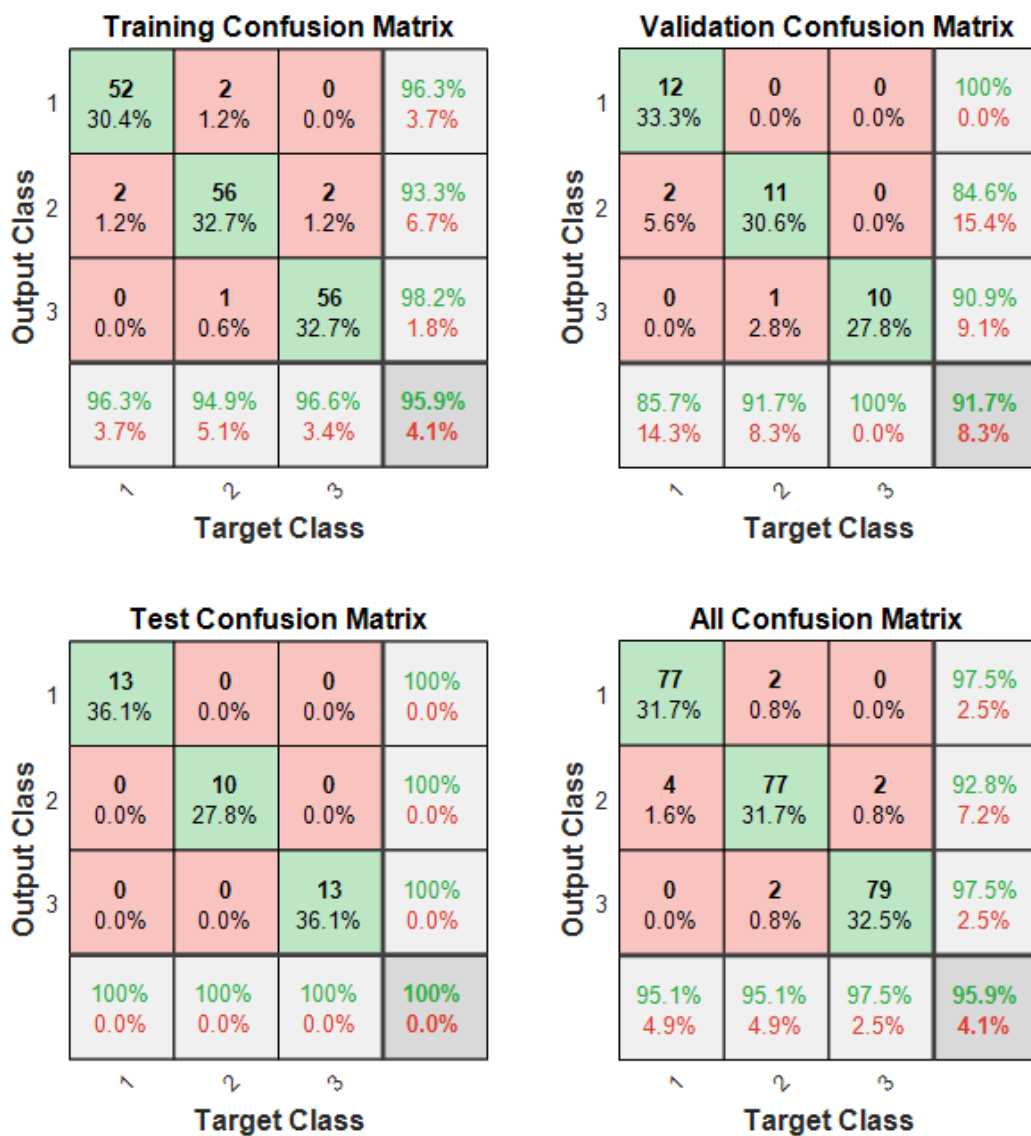


I.6.a. Curvas de ROC para la clasificación por grado de maduración para la variedad Mencía, MN.

Variedad	Código	Color
Primera semana	Clase 1	Azul
Segunda semana	Clase 2	Verde
Tercera semana	Clase 3	Rojo

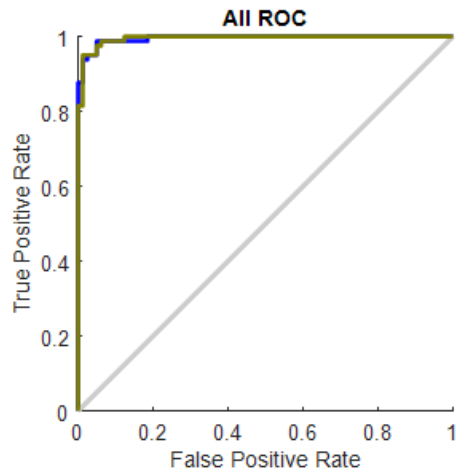
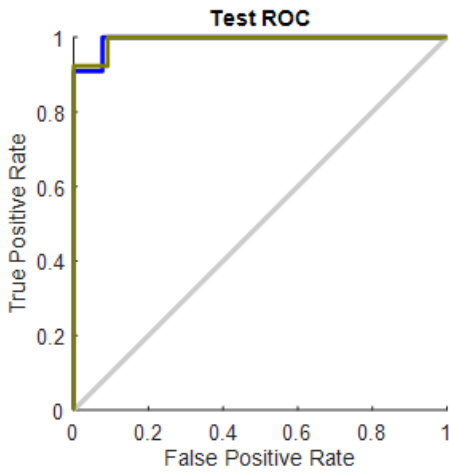
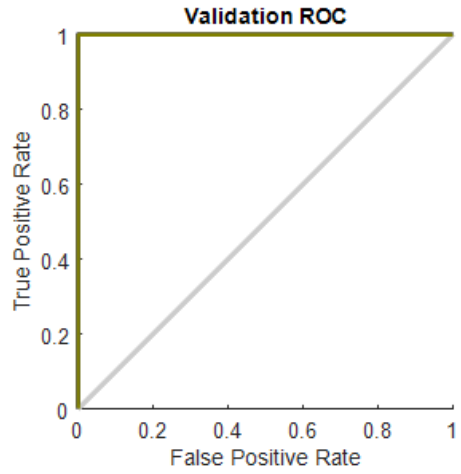
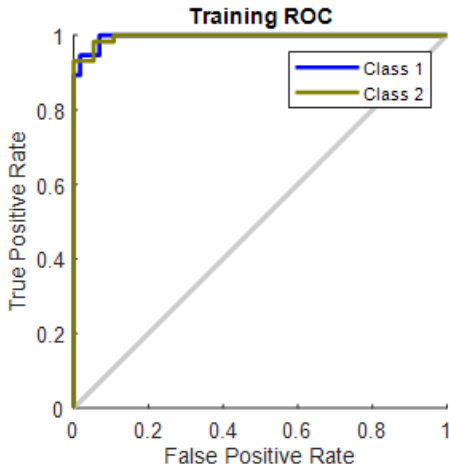


I.6.b. Matrices de confusión para la variedad Mencía, MN.



I.7.a. Curvas de ROC para la clasificación por grado de maduración para la variedad Verdejo Negro, VN.

Variedad	Código	Color
Primera semana	Clase 1	Azul
Segunda semana	Clase 2	Gris



I.7.b. Matrices de confusión para la variedad Verdejo Negro, VN.

Training Confusion Matrix

Output Class	1	53 46.5%	1 0.9%	98.1% 1.9%
	2	3 2.6%	57 50.0%	95.0% 5.0%
		94.6% 5.4%	98.3% 1.7%	96.5% 3.5%
		Target Class		

Validation Confusion Matrix

Output Class	1	13 54.2%	0 0.0%	100% 0.0%
	2	1 4.2%	10 41.7%	90.9% 9.1%
		92.9% 7.1%	100% 0.0%	95.8% 4.2%
		Target Class		

Test Confusion Matrix

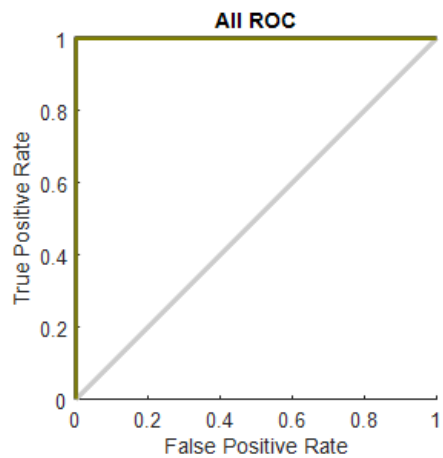
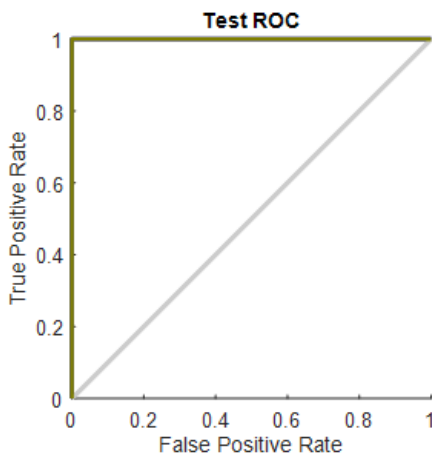
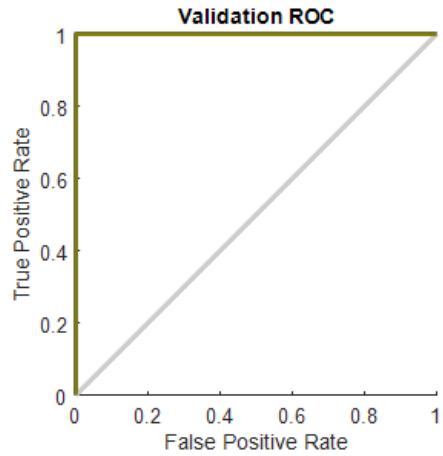
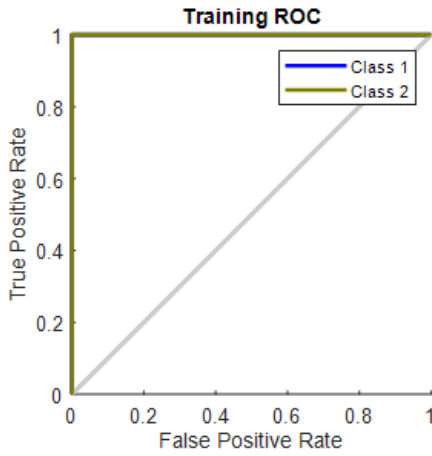
Output Class	1	10 41.7%	0 0.0%	100% 0.0%
	2	1 4.2%	13 54.2%	92.9% 7.1%
		90.9% 9.1%	100% 0.0%	95.8% 4.2%
		Target Class		

All Confusion Matrix

Output Class	1	76 46.9%	1 0.6%	98.7% 1.3%
	2	5 3.1%	80 49.4%	94.1% 5.9%
		93.8% 6.2%	98.8% 1.2%	96.3% 3.7%
		Target Class		

I.8.a. Curvas de ROC para la clasificación por grado de maduración para la variedad Albarín Blanco, AB.

Variedad	Código	Color
Primera semana	Clase 1	Azul
Segunda semana	Clase 2	Gris

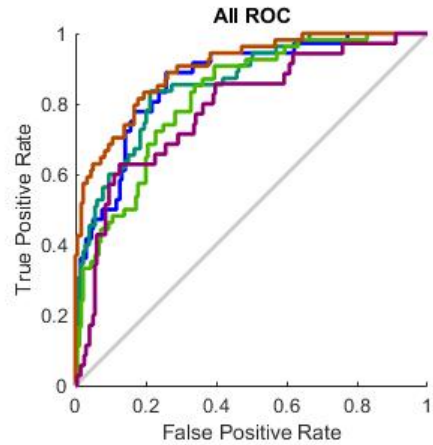
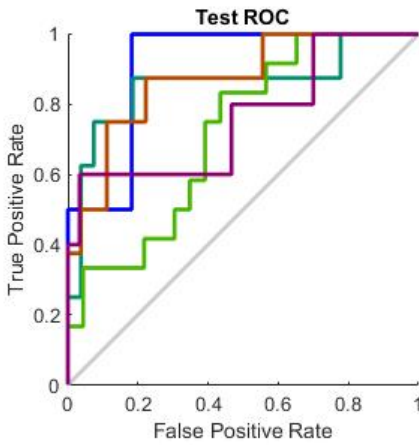
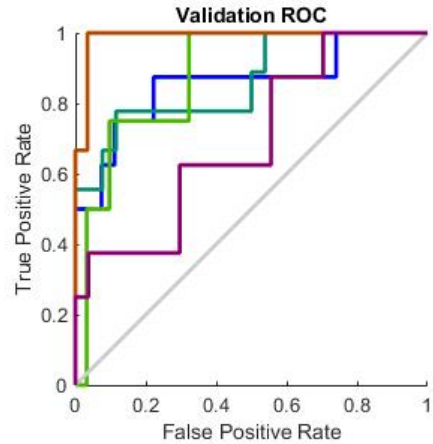
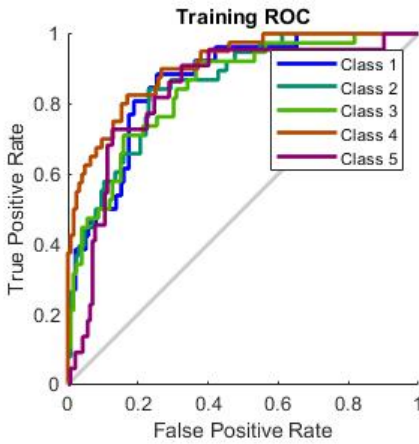


I.8. b. Matrices de confusión para la variedad Albarín Blanco, AB.



I.9.a. Curvas de ROC para la clasificación varietal empleando hojas.

Variedad	Código	Color
Albarín Blanco, AB	Clase 1	Azul
Albarín Negro, AN	Clase 2	Verde
Carrasquín, CQ	Clase 3	Verde claro
Mencía, MN	Clase 4	Rojo
Verdejo Negro, VN	Clase 5	Morado



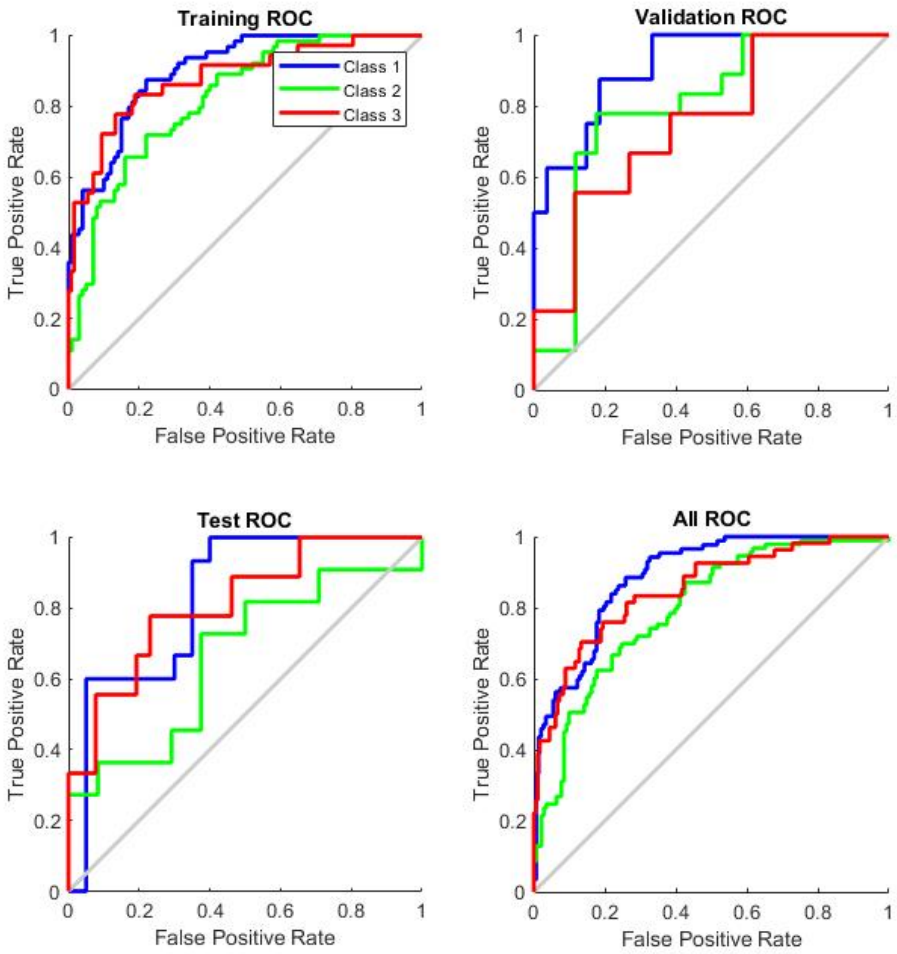
I.9.b. Matrices de confusión para la clasificación varietal empleando hojas.

		Training Confusion Matrix							Validation Confusion Matrix				
Output Class		Target Class					Output Class		Target Class				
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5
1		13 7.9%	4 2.4%	4 2.4%	6 3.7%	3 1.8%	43.3%	4 11.4%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 2.9%	30.0%
2		6 3.7%	26 15.9%	6 3.7%	3 1.8%	8 4.9%	53.1%	0 0.0%	6 17.1%	1 2.9%	0 0.0%	1 2.9%	75.0%
3		2 1.2%	3 1.8%	20 12.2%	4 2.4%	3 1.8%	62.5%	2 5.7%	1 2.9%	3 8.6%	0 0.0%	4 11.4%	30.0%
4		5 3.0%	2 1.2%	3 1.8%	27 16.5%	2 1.2%	69.2%	2 5.7%	2 5.7%	0 0.0%	6 17.1%	2 5.7%	50.0%
5		0 0.0%	3 1.8%	5 3.0%	0 0.0%	6 3.7%	42.9%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	NaN%
		50.0%	68.4%	52.6%	67.5%	27.3%	56.1%	50.0%	66.7%	75.0%	100%	0.0%	54.3%
		50.0%	31.6%	47.4%	32.5%	72.7%	43.9%	50.0%	33.3%	25.0%	0.0%	100%	45.7%

		Test Confusion Matrix							All Confusion Matrix				
Output Class		Target Class					Output Class		Target Class				
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5
1		1 2.9%	0 0.0%	1 2.9%	2 5.7%	0 0.0%	25.0%	18 7.7%	4 1.7%	5 2.1%	8 3.4%	4 1.7%	46.2%
2		0 0.0%	6 17.1%	5 14.3%	0 0.0%	0 0.0%	54.5%	6 2.6%	38 16.2%	12 5.1%	3 1.3%	9 3.8%	55.9%
3		1 2.9%	1 2.9%	5 14.3%	2 5.7%	2 5.7%	45.5%	5 2.1%	5 2.1%	28 12.0%	6 2.6%	9 3.8%	52.8%
4		0 0.0%	1 2.9%	0 0.0%	4 11.4%	1 2.9%	66.7%	7 3.0%	5 2.1%	3 1.3%	37 15.8%	5 2.1%	64.9%
5		0 0.0%	0 0.0%	1 2.9%	0 0.0%	2 5.7%	66.7%	0 0.0%	3 1.3%	6 2.6%	0 0.0%	8 3.4%	47.1%
		50.0%	75.0%	41.7%	50.0%	40.0%	51.4%	50.0%	69.1%	51.9%	68.5%	22.9%	55.1%
		50.0%	25.0%	58.3%	50.0%	60.0%	48.6%	50.0%	30.9%	48.1%	31.5%	77.1%	44.9%

I.10.a. Curvas de ROC para la clasificación para la clasificación por grado de maduración para las hojas.

Variedad	Código	Color
Primera semana	Clase 1	Azul
Segunda semana	Clase 2	Verde
Tercera semana	Clase 3	Rojo



I.10.b. Matrices de confusión para la clasificación por grado de maduración para las hojas.

		Training Confusion Matrix				Validation Confusion Matrix			
Output Class	1	43 26.2%	11 6.7%	3 1.8%	75.4% 24.6%	6 17.1%	3 8.6%	2 5.7%	54.5% 45.5%
	2	19 11.6%	49 29.9%	14 8.5%	59.8% 40.2%	2 5.7%	14 40.0%	5 14.3%	66.7% 33.3%
	3	2 1.2%	4 2.4%	19 11.6%	76.0% 24.0%	0 0.0%	1 2.9%	2 5.7%	66.7% 33.3%
		67.2% 32.8%	76.6% 23.4%	52.8% 47.2%	67.7% 32.3%	75.0% 25.0%	77.8% 22.2%	22.2% 77.8%	62.9% 37.1%
		Target Class				Target Class			

		Test Confusion Matrix				All Confusion Matrix			
Output Class	1	12 34.3%	5 14.3%	2 5.7%	63.2% 36.8%	61 26.1%	19 8.1%	7 3.0%	70.1% 29.9%
	2	3 8.6%	6 17.1%	5 14.3%	42.9% 57.1%	24 10.3%	69 29.5%	24 10.3%	59.0% 41.0%
	3	0 0.0%	0 0.0%	2 5.7%	100% 0.0%	2 0.9%	5 2.1%	23 9.8%	76.7% 23.3%
		80.0% 20.0%	54.5% 45.5%	22.2% 77.8%	57.1% 42.9%	70.1% 29.9%	74.2% 25.8%	42.6% 57.4%	65.4% 34.6%
		Target Class				Target Class			

ANEXO II

ANEXO II

Capítulo 3. Fabricación de bio-películas proteicas reforzadas con puntos cuánticos de carbono: estudio reológico y mecánico

II.1. Propiedades reológicas de muestras de películas reforzadas con APCDs

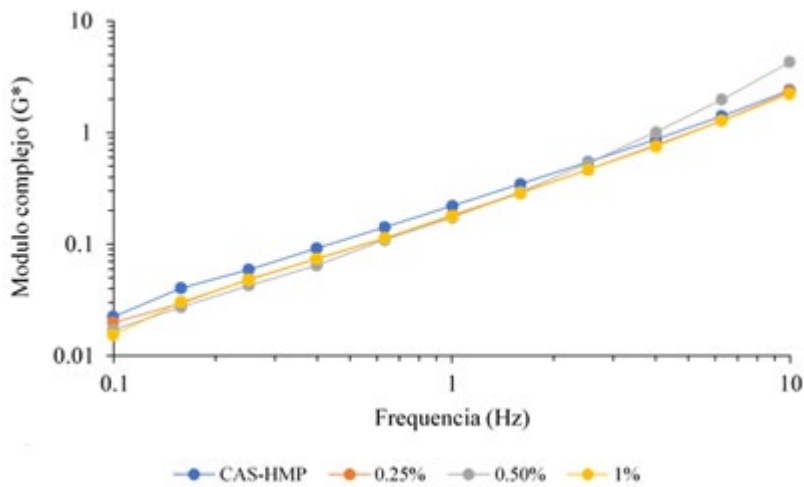


Figura II.1.1. Variación del módulo complejo G^* con la frecuencia para suspensiones CAS/HMP en ausencia y en presencia de diferentes porcentajes de CDs

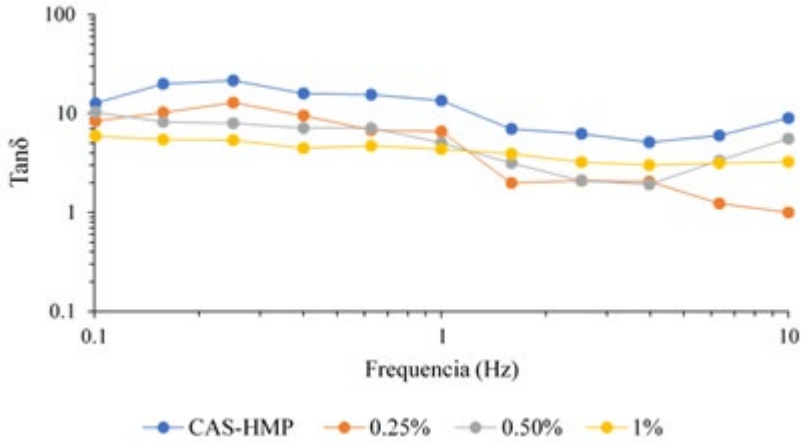


Figura II.1.2. Variación de $\tan(\delta)$ con la frecuencia para suspensiones CAS/HMP en ausencia y en presencia de diferentes porcentajes de CDs

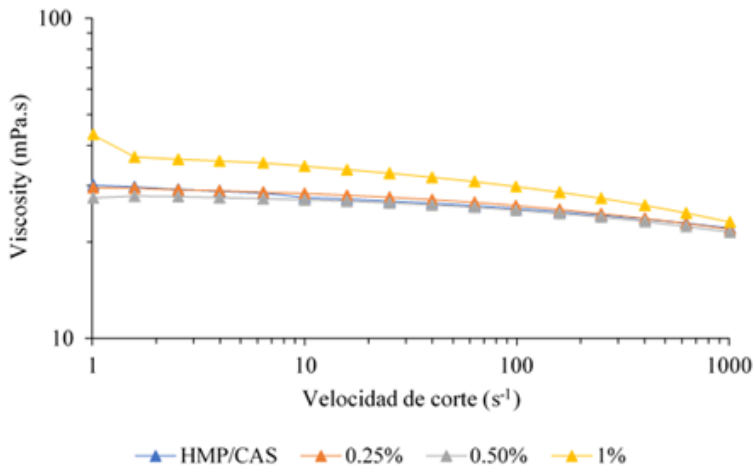


Figura II.1.3. Variación de la viscosidad frente a velocidad de cizalla para suspensiones CAS/HMP en ausencia y en presencia de diferentes porcentajes de CDs

II.2. Propiedades mecánicas de muestras de películas reforzadas con APCDs

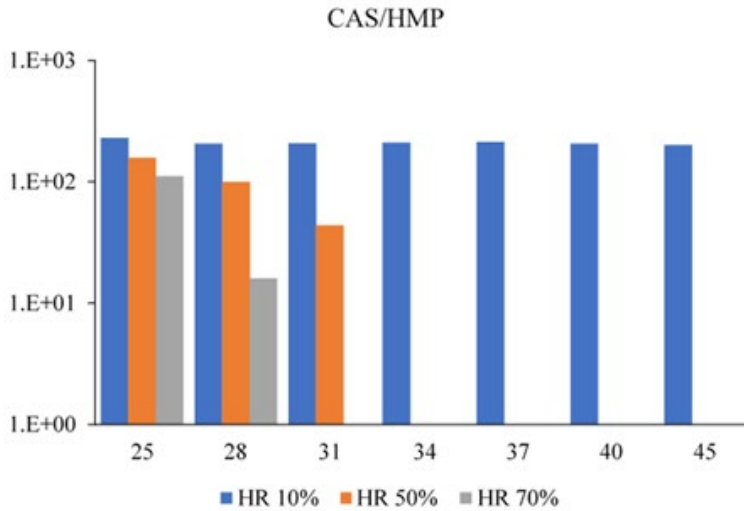


Figura II.2.1. Comportamiento reológico en función de la temperatura y la humedad relativa de películas de HMP-CAS.

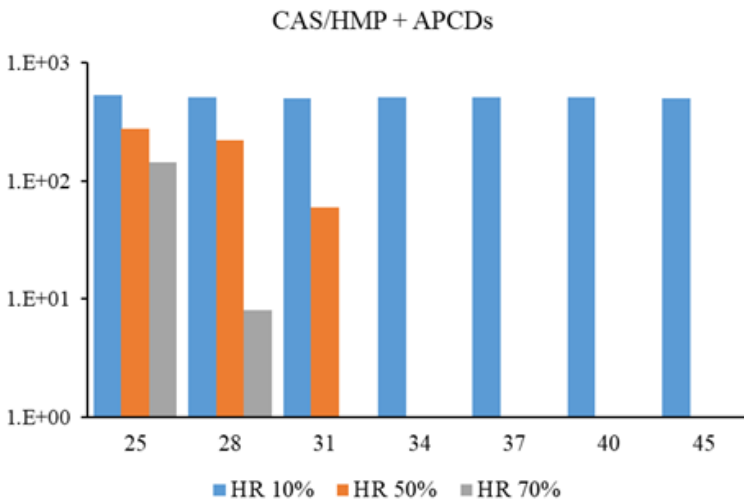


Figura II.2.2. Comportamiento reológico en función de la temperatura y la humedad relativa de películas de HMP-CAS + APCDs 1%

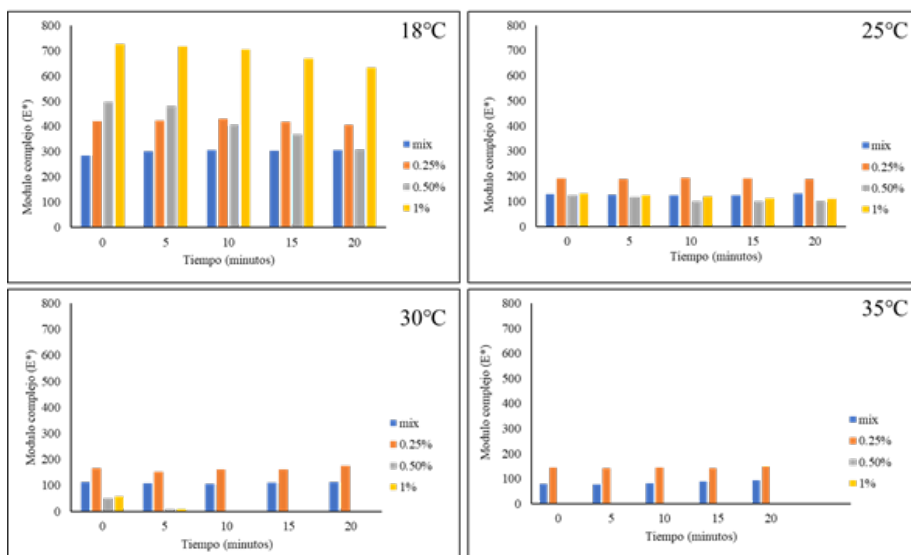


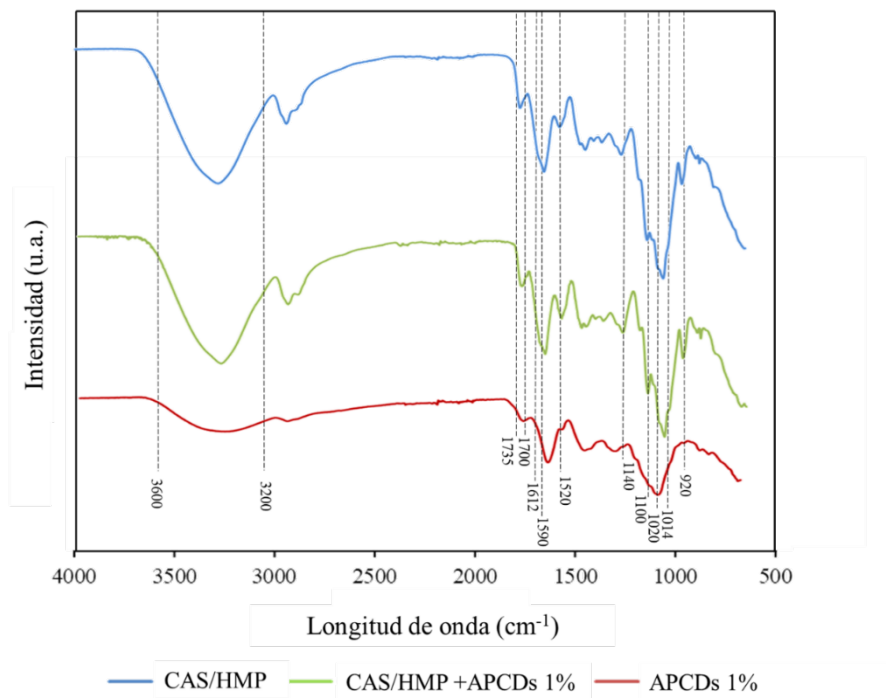
Figura II.2.3. Comportamiento reológico de películas CAS/HMP y CAS/HMP-APCDs en función del tiempo de exposición a diferentes temperaturas

ANEXO III

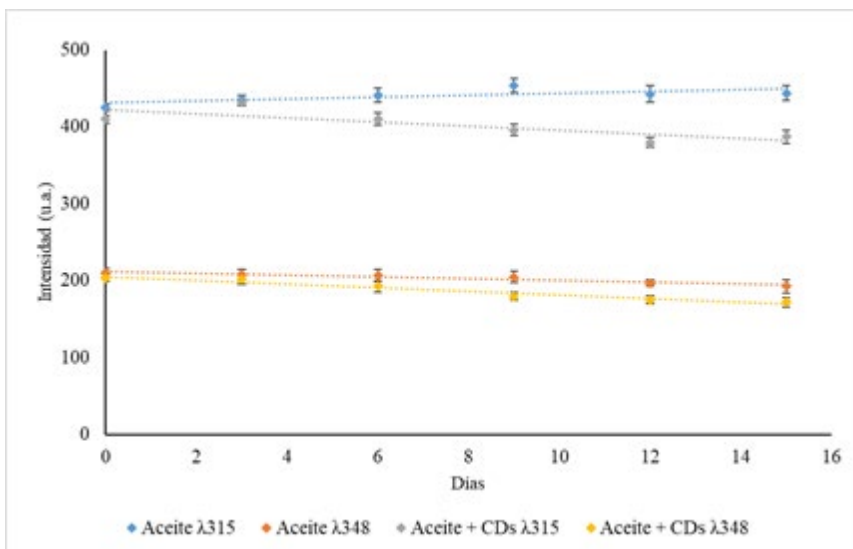
ANEXO III

Capítulo 4. Películas de caseína y pectina enriquecidas con puntos de carbono para la protección bioactiva antioxidante de alimentos

III.1. Espectros ATR-FTIR de APCDs, de películas CAS/HMP y películas CAS/HMP reforzadas con 1% APCDs



III.2. Estudio de liberación de APCDs contenidos en películas CAS/HMP-1%RCDs en contacto con aceites.



ANEXO IV

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

Oxidative Stability of Vegetal Oil-Based Lubricants

Clarissa Murru, Rosana Badía-Laíño,* and Marta E. Díaz-García

Cite This: *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2021, 9, 1459–1476

Read Online

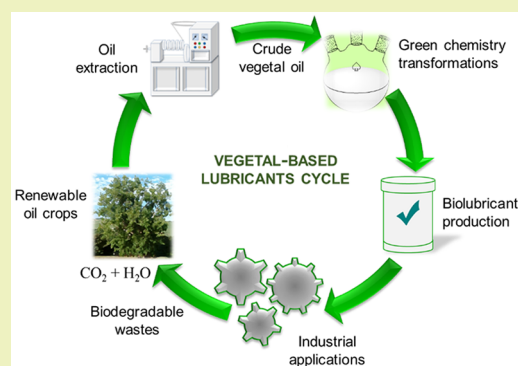
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: Lipids are widely distributed in nature and are one of the most important components of natural foods, synthetic compounds, and emulsions. To date, there is a strong social demand in the industrial sector for the use of sustainable products with a minimal environmental impact. Depending on their origin and composition, lipids can be employed as a plausible alternative as biodegradable lubricants in order to reduce the use of conventional mineral oil lubricants and mitigate their environmental impact. This perspective provides an overview of the advantages and constrains of vegetal oils under different lubrication regimes and the tribochemical reactions that can take place. Also, the different factors and pathways that influence their oxidation, the key role of moisture, and the changes of physical properties under pressure and temperature are reviewed. Special emphasis is devoted to the oxidation instability of fatty acids and vegetal oils and the physical and chemical approaches to improve oxidative and thermal stability are described in detail.

KEYWORDS: *Vegetal-based lubricants, Oxidative stability, Oxidation mechanisms, Antioxidant additives, Chemical modifications*



INTRODUCTION

Lipids are a major component of food, key functional constituents of cells in biological systems, and a primary source of fuel for living organisms. Commonly, lipids are defined as substances that are insoluble in water but soluble in organic solvents.¹ Due to the complexity and heterogeneity of lipids, an accurate definition is difficult, and different classification schemes have been used. So, lipids can be categorized based on their chemical backbone structure (simple or complex), their physical properties at room temperature (liquids as oils and solid as fats), their polarity (polar and neutral lipids), or their essentiality for humans (essential and nonessential). In 2005, Fahy et al.² proposed a novel definition and a comprehensive system of classification: lipids are small hydrophobic or amphiphilic molecules that may originate entirely or in part through condensations of thioesters and/or isoprene units, a definition that enables cataloguing lipids into eight categories (fatty acids, glycerolipids, glycerophospholipids, sphingolipids, sterol lipids, prenol lipids, saccharolipids, and polyketides), each containing distinct classes and subclasses of molecules. The proposed lipid classification is compatible with other existing lipid databases and expandable to new categories in the future.²

Fatty acids (FAs), the cornerstones in lipid structures, are carboxylic acids having either a straight saturated or unsaturated aliphatic chain. FAs can be classified according to the number of double bonds in the carbon chain: saturated FAs (SFAs) with the general formula R-COOH, monounsaturated (MUFAs, with one double bond), and polyunsaturated

FAs (PUFAs, with two or up to six double bonds). However, the number, position, and configuration of double bonds (cis, trans), location of branched chains, and any other structural peculiarity must be identified. Consequently, systematic terminology for FAs is troublesome for common use, and shorter options are widely used. The recommended nomenclature by the International Union of Pure and Applied Chemistry is technically clear and precise,³ but, for convenience, trivial or historical names are frequently used in scientific papers. O'Keefe⁴ have made an exhaustive discussion of FAs and lipids nomenclature and structure.

Lipid degradation affects a variety of products, including foods and industrial products such as lubricants. Food lipids are commonly divided into fats and oils depending on the origin of the lipid and its physical state at room temperature (RT). Fats are usually animal-based solids (lard, tallow) at RT due to their high content of SFAs. Although most vegetal lipids are found as liquids (oils) at RT, some can be found also as solids (palm, coconut) due to their high content of saturated and/or trans FAs.

In the lubricant industry, the primary role of lubrication is to reduce friction, wear, and heat between interacting surfaces in

Received: September 30, 2020

Revised: December 6, 2020

Published: January 19, 2021



relative motion by using a lubricating substance. Traditional industrial lubricants are quite diverse. So, petroleum-based lubricants such as mineral oils, complex mixtures of C₂₀–C₃₀ hydrocarbons, and other compounds (naphthenic, paraffinic, and aromatic species) are used in about 90%–95% of industrial applications due to their wide range of viscosities, low cost and availability, compared to natural oils. These mineral oils may present some drawbacks such as different composition depending on the petroleum source, volatilization of low-molecular weight components, nonbiodegradability, environmental pollution (C, N, and S oxides may be emitted to the atmosphere), and hazardous waste disposal. In contrast, synthetic lubricants can be purposely developed to specific applications by well-defined chemical reactions. Due to their composition, synthetic oils are less susceptible to oxidation, to breakdown under heat, to produce unwanted byproducts, and to emulsify.⁵

In the last 25–30 years, a general wake-up to climate change started, and as result, attention is focused to the innovation and development of biobased lubricants, considered nontoxic, abundant, and easily biodegradable. There are some significant biodegradable lubricants: highly unsaturated or high oleic vegetal oils, polyalkylene glycols, low viscosity poly- α -olefins, polyol esters, and dibasic acid esters. It is true that vegetal oil-based biolubricants are more expensive than mineral lubricants, but in contrast, they exhibit unique features such as a higher viscosity index, superior anticorrosion properties, higher flash point, good lubricity, greater biodegradability and less aquatic toxicity.⁶ Thus, vegetal oil-based biolubricants appear as a promising alternative to synthetic and mineral-oil based lubricants.

Environmentally friendly lubricants, as well as the additives used in them, must fulfill the standards of biodegradation, low toxicity, health, and safety. The EU Ecolabel, established in 1992 and recognized across Europe and worldwide, is a label of environmental excellence that is awarded to products and services meeting high environmental standards throughout their life cycle from raw material extraction to production, distribution, and disposal.⁷ In this sense, at least four lubricants have already been awarded with this label: CobiolubeAgri chain (developed to respond to requests regarding the lack of ecological lubricant for the agricultural industry), CobiolubeChain (chain lubricant that facilitates a hand saw or harvester work in an exceptionally economical, convenient, and safe way), CobiolubeSawmill (developed especially for conveyors that operate outdoors) from Jarmat Oy, Finland,⁸ and NYCOLUBE 210 (designed for the lubrication of two-stroke gasoline engines running with unleaded regular fuels) from NYCO SA, Belgium.⁹

In spite of their unique functional attributes, vegetal oils possess certain limitations for their use as biolubricants such as their poor thermal and oxidative stability, that is, their low resistance to those degradation process that can change their properties and their tribological performance such as formation of undesirable species due to oxidation processes, viscosity changes with temperature, and hydrolysis due to the presence of water, as well as poor low temperature properties. This perspective describes briefly some lubrication concepts, lubrication regimes, interaction mechanisms of FAs with metal surfaces, and self-assembled monolayer formations. Special emphasis is put on the poor oxidation stability of FAs and vegetal oils and the physical and chemical approaches to improve it.

LUBRICATION CONCEPTS

Friction, Wear, and Lubrication. Friction is the resistance force to tangential motion between two sliding or rolling surfaces in contact. The microscopic contact points between the contact surfaces are responsible for friction. In industrial applications, such as operation of mechanical systems with bearings and gears, frictional processes cause most of the mechanical energy to transform into heat with the concomitant temperature increase of the sliding bodies. These facts may have important influence on the tribological behavior of the system and failure of the sliding components. The magnitude of friction is usually expressed in terms of the coefficient of friction (COF), μ , which is the force, F , to slide divided by the normal load over the sliding bodies, W , (eq 1)

$$\mu = F/W \quad (1)$$

Research in tribology makes use of commercially available tribometers, with different configurations in order to replicate real systems.¹⁰ Most typical configurations are depicted in Figure 1.

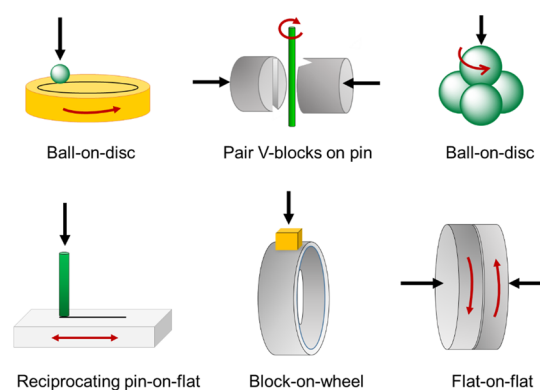


Figure 1. Schematic configurations of commercial tribometers. Normal load is pointed to by the black arrows.

Excessive friction causes wear, surfaces damage, and energy losses that are not renewable. Wear is defined as the progressive material loss from the surface of one or/and other contact surface. Wear mechanisms are classified according to the type of surface damage observed on worn surfaces: abrasion, adhesion, surface fatigue, delamination, tribochemical, and so on. The wear process can be described in three steps:¹¹ (a) detachment of particles from a body surface by any mechanism (adhesion, abrasion, etc.), (b) particles entrapped between the two bodies may circulate within the contact zone, creating a powder bed that keeps apart the surfaces thus reducing interactions, and (c) particles (debris) finally expelled from the contact zone while interaction between surfaces increases, wear forms, and the cycle begins again.

Lubrication Regimes. Oil-based lubricants may be used to provide a protective layer that reduces/minimizes the frictional force and wear between contacting surfaces in motion. The magnitude of the normal load between the surfaces in contact is responsible for different lubrication conditions or regimes: boundary, mixed, hydrodynamic, and elastohydrodynamic (EHL). The Stribeck diagram (Figure 2), a plot of a lubricated contact's friction coefficient vs the Hersey number, explains the different lubrication regimes. The Hersey number is a dimensionless function of all three tribological test conditions:

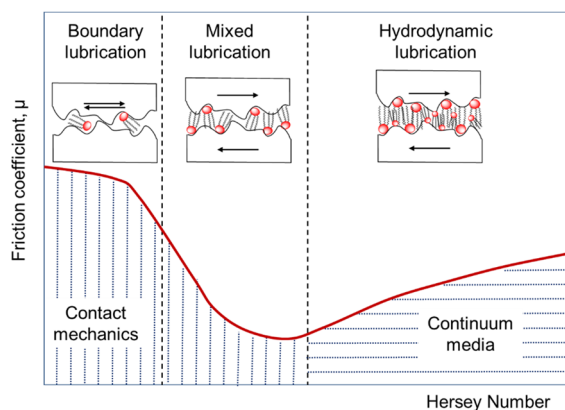


Figure 2. Stribeck curve illustrating different lubrication regimes and relations to coefficient of friction, speed, and lubricant viscosity.

sliding velocity and pressure, as well as temperature by means of viscosity $\eta(T)$.

For high values of the Hersey number, the COF increases linearly due to viscous dragging forces in the oil film. However, when the load increases or sliding velocity and/or viscosity decreases, the Hersey number falls. In these conditions, the wedge or layer of lubricant oil is sufficiently thick (normally $>1 \mu\text{m}$)¹² to avoid the opposite surfaces coming into contact. This situation, the hydrodynamic lubrication (HDL) regime, provides very low friction and a high resistance to wear. The elastohydrodynamic lubrication (EHL) is a particular form of HDL in which elastic deformation of surfaces and piezoviscous effects become significant. For even smaller values of the Hersey number, the lubricant film is further reduced. If the film thickness and the surface asperities are of similar dimensions, contact between the surfaces starts, and the COF increases as the Hersey number decreases. In these conditions of lower speed, higher load, or higher temperature, the lubricant viscosity decreases, and some asperities occasionally come into contact. The lubrication regime is termed mixed lubrication regime. Further reduction of the Hersey number results in a boundary lubrication regime in which most asperity contacts between the surfaces are due to a thinner lubricant film. Friction and wear under boundary conditions are the most severe as most of the load rests on asperities in physical contact.

Vegetal-based oils, as functional fluids (ester), are liquids at RT and can be used in all the regimes. Particularly, vegetal oils are effective as boundary lubricants due to the FA composition that allows strong interactions with the lubricated surfaces forming self-assembled tightly packed monolayers which provide ultralow friction.^{13,14} The formation of self-assembled monolayers of FAs on metal surfaces is a complex process in which physical adsorption, chemisorption, and tribochemical reactions on the surfaces may take place. Physical adsorption involves intermolecular forces (hydrogen bonds, van der Waals), and as no particular chemical functional groups are needed, all FAs may potentially form such layers. On the other hand, chemisorption involves sharing of valence electrons between the oil and the surface and can be an irreversible or partially irreversible mode of adsorption. Tribochemical reactions deal with the ability of vegetal-based oils to undergo chemical reactions by themselves or with other materials (water, oxygen, metal) in the friction zone. The adsorption mechanisms of FAs on materials of industrial interest have

been addressed from different points of view, due to their efficacy to protect surfaces in the boundary lubrication regime (high load, low sliding velocity) and also as friction modifiers of base lubricants. In practice, under boundary lubrication, different factors may influence the film structure and its protective tribological properties.

Nature of the Substrate Material. Different sliding surfaces have been used to study the boundary lubrication mechanisms of FAs, as the base components of vegetal-based oils. It seems that FAs attach to metal oxide surfaces through the carboxylate headgroup, while the long alkyl chains may be involved in intermolecular van der Waals interactions, which provide not only the molecular organization of the layer but also induce a high packing density (SAM, self-assembled monolayers). As most common metals are reactive, chemisorption is the form in which FAs interact with them. The strength of the chemical bonding between FAs and the metal surface depends on the reactivity of the metal.¹⁵ According to Bowden et al.,¹⁵ on Zn, Cd, and Cu surfaces, the percentage of a retained monolayer of lauric acid after washing was notably high in comparison with the poor retention of metals such as Mg or Cr. This study suggests that a reaction of lauric acid with the substrate has occurred for the former group of metals.

Tao¹⁶ showed that the metal substrate nature dominates the binding geometry of the headgroup and most likely the packing density. So, chemisorption of *n*-alkanoic acids, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, $n = 2-18$, on AgO surfaces involved the carboxylate group binding in a nearly symmetrically mode, while on the surface of Al_2O_3 and CuO the binding was asymmetric with tilt angles estimated between 15° and 25° from the surface normal. Also, infrared studies suggested that monolayers of *n*-alkanoic acids on AgO were more ordered than their counterparts on Al_2O_3 . However, Raman studies¹⁷ suggested just the contrary; a monolayer of stearic acid adsorbed to a smooth AgO surface is less ordered than the stearic acid layer on Al_2O_3 .

Despite the considerable research, with the chemisorption of FA on metal surfaces under boundary lubrication, the monolayer morphology is unclear due to the complexity of the interfacial processes involved. Ratoi et al.¹⁸ using ultrathin film interferometry to monitor the lubricant film thickness during rolling contact of bearing steel on glass observed that carboxylates of metals below iron in the electrochemical series (e.g., Cu, Pb) reacted to form thick iron carboxylate boundary films, while carboxylates of metals above iron (e.g., Zn, Al, Ca, Mg) did not form boundary films at all. Lim et al.¹⁹ have also explored the mechanism of stearic acid bonding on amorphous aluminum oxide (alumina) and on single-crystal C-plane aluminum oxide (sapphire) surfaces. Using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) confirmed the presence of aliphatic and carboxylic groups, while infrared spectroscopy provided key information about the different binding mode of the carboxylic acid head and the aluminum oxide surfaces; stearic acid binds to sapphire surfaces via a bidentate interaction of carboxylate through two oxygen atoms, while both bidentate and monodentate interactions may take place with alumina surfaces. Recent investigations by Simič and Kalin¹³ using atomic force microscopy (AFM) explained the monodentate form of FAs on a steel surface as due to the dissociation of the carboxylic acid into a carboxylate anion and a proton, possible due to a chemical reaction between the carboxylate anion and the surface metal atoms (typically positively charged). In the bidentate configuration the

carboxylate group is bound to the surface by both oxygen atoms.²⁰

Similar models also have been applied to the boundary lubrication at the nanoscale, a field of interest not only from a basic point of view but also due to the increasing demand in understanding the lubrication behavior of ultrathin lubricant films on smooth solid surfaces, particularly in high-density magnetic recording technology and micro/nanoelectromechanical systems (MEMS/NEMS).²¹ Over the past two decades, nanomaterials have been investigated and employed in tribological applications, in particular, in the development of efficient “nanolubricants” in which nanoparticles of metal oxides, metal sulfides, metals powders, and carbon-based nanomaterials have been of special interest.^{22,23} In fact, inorganic and carbon-based nanoparticles have been demonstrated to be promising additives due to their noteworthy capacity to reduce friction and wear and to improve oxidative stability. The main drawback of inorganic nanoparticles as lubricant additives is their poor ability to form a stable suspension in oil. Consequently, to tackle this obstacle, adequate surface modification of the nanoparticles has to be done. In this sense, vegetal oils have the capacity to provide the nanoparticle surface with a hydrophobic layer, compatible with the base lubricant thanks to their FA content. FAs bind strongly to surface metal oxide nanoparticles, and they are then an excellent choice as modifying agents. Among them, oleic acid, having a C18 tail with a *cis* double bond, is one of the most used, as it can form the kinks necessary for effective stabilization. Oleic acid provides the surface of a dense protective monolayer that renders nanoparticles in a highly uniform size range. In Figure 3, carboxylate binding modes proposed by Galoppini²⁴ have been recreated on the surface of a metal nanoparticle.

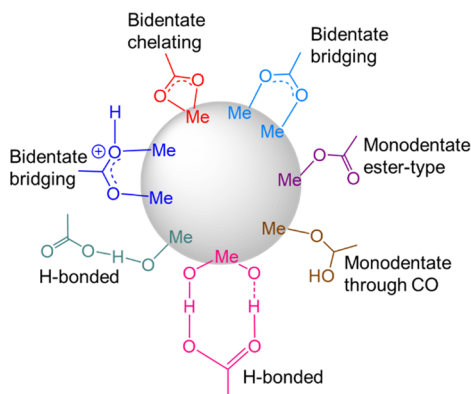


Figure 3. Interaction modes of the carboxylic group with the surface of a metal oxide/hydroxide nanoparticle.

Fatty Acid Unsaturation and *cis/trans* Conformation.

The FAs unsaturation degree has only a marginal effect on the chemisorption of FAs to the substrate as this process depends mostly on the interaction of the carboxylic headgroup and the substrate nature. However, the physically adsorbed amount and friction have been found to increase with the unsaturation degree of FAs. Campen et al.²⁵ have demonstrated that in the boundary lubrication regime the presence of stearic acid adsorbed on steel surfaces resulted in a COF that increased with $\log(\text{speed})$, characteristic of close-packed vertically oriented monolayers with linear configuration. Elaidic acid, the *trans* isomer of oleic acid, gave the same trend as stearic

acid. However, oleic acid gave a COF constant over the speed range assayed. Oleic acid, due to its *cis* arrangement, could not adopt a linear configuration and thus could not form close-packed monolayers. Consequently, the structure of the adsorbed film is dictated by the molecular structure of the FAs, which, in turn, may have a quantitative effect on the COF. On the other hand, the degree of molecular interaction plays an important role in boundary lubrication. The molecules of saturated FAs, like stearic acid, may align themselves in straight chains and be closely packed on the surface providing a strong protective layer. The presence of double bonds in FAs hinders rotation and pushes the chains to bend, resulting in a loosely packed monolayer with poor protective action.²⁶ Bowden and Tabor²⁷ took an important step forward in the understanding of boundary lubrication studying the effect of the number of stearic acid layers on stainless steel surfaces by means of the Langmuir–Blodgett (LB) technique. It could be observed that the lubrication effectiveness increased with increasing the number of films. The study also demonstrated that while a single monolayer of a stearic acid could reduce friction, the layers were not robust and required continuous replenishment.

Fatty acid chain length. The effectiveness of a boundary FAs lubricant depends on its chain length. Results from Castle and Bovington,²⁸ using a series of long chain carboxylic acids, have shown that measured boundary COFs decreased with increasing chain length (C12 to C24) and unsaturation level (0 to 3 inclusive). Also, it was shown that the durability of boundary FAs films increases with molecular weight in the range of 18–26 carbon atoms due to a stronger cohesion among the chains.²⁹

Tribochemical reactions. Under boundary lubrication regime, interaction between asperities results in high friction and severe wear, which encompass high temperature, triboemission and tribochemical reactions.³⁰ Triboemission is defined as an emission of electrons, charged particles, lattice components, photons, etc., under conditions of boundary friction conditions and/or surface damage caused by fracture processes. Figure 4 illustrates the triboemission process associated with the surface changes during friction.

Under a boundary lubrication regime, a high mechanical energy is developed, and it can be easily dissipated as thermal, chemical, optical, and electrical energies.³¹ A tribochemical reaction is a chemical reaction initiated by the absorption of mechanical energy which acts on the solid surfaces forming

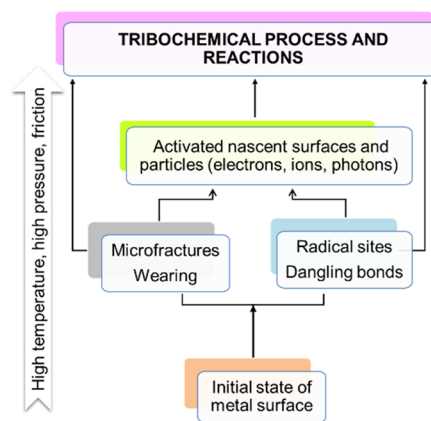


Figure 4. Processes associated with surface physical and chemical changes during friction.

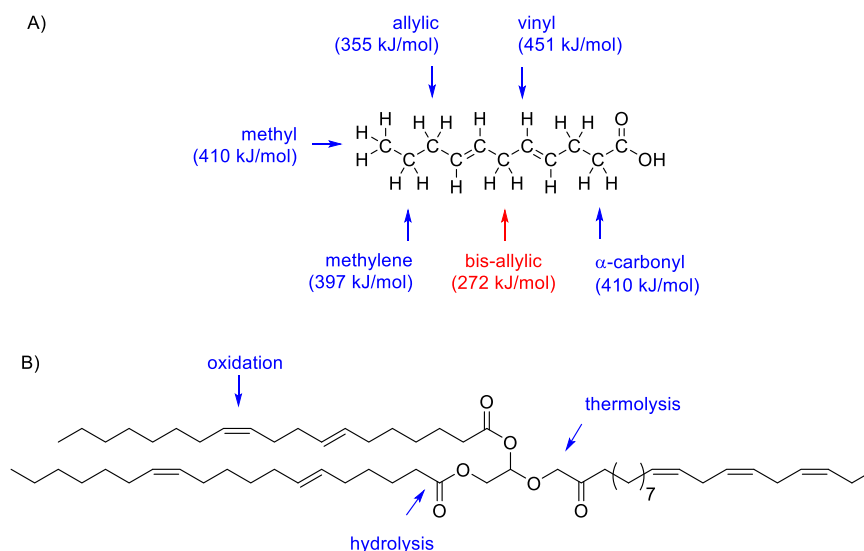


Figure 5. (A) Structure showing the dissociation energies (kJ/mol) of C–H bonds in fatty acids. (B) Physically and chemically attackable domains in TAGs.

active sites. Two types of activated sites can be generated upon friction: thermally activated sites and low-energy electron-activated sites. The low-energy electrons (exoelectrons) are spontaneously generated electrons (0–4 eV) from raw surfaces and/or emitted from activated surfaces. According to the model by Smith and McGill,³² with friction, metal–metal and metal–oxygen bonds are broken. The cleavage of the metal–oxygen bond produces electrons and leaves positively charged sites and an oxygen dangling bond on the surface. The electrons then interact with a water molecule releasing a hydrogen radical (H^\bullet) and a hydroxide anion (OH^-). Subsequently, the hydroxide groups neutralize the FAs, thus resulting in the formation of water and the corresponding carboxyl anions. Simultaneously, the hydrogen radicals combine themselves to form hydrogen molecules. Finally, the fatty carboxyl anions react with the surface positively charged metal cations to form soap. Upon friction, the monolayer structural integrity may stay constantly damaged by either chemical or tribochemical reactions within the contacting surface, all of which leads to the developing of thin coatings (tribofilms) that affect friction and wear behavior. The properties and thickness of the tribofilms are quite different from the starting monolayer and once formed and adhered to the surfaces may govern the tribological performance of the sliding contacts.

Achilles Heel of Vegetable Oils as Lubricants: Auto-Oxidation. Vegetable oils offer a great potential for developing innovative environmentally friendly lubricating products. Most of vegetable oils consist primarily of triacylglycerols (TAGs) (~98%),³³ the composition of which is specific to the origin of each oil. Most of the FAs in TAGs are straight chains of an even number of carbon atoms, in the range of C_4 – C_{22} . Natural FAs up to C_{18} are typically fully SFAs, with unsaturation or polyunsaturation being more common for higher carbon numbers. Some other minor components in vegetable oils include mono- and diacylglycerols (MAGs and DAGs), free fatty acids (FFAs), phosphatides, sterols, tocopherols and tocotrienols, pigments, and fatty alcohols.³⁴

Composition of biodegradable lubricants is particularly important in relation to their physical and/or chemical degradation. So, FFAs and FAs in triglycerides have the ability

for hydrogen abstraction as result of the presence of methylene and/or bis-allylic hydrogens with low bond dissociation energies (Figure 5A). On the other hand, in vegetable oils, fatty acids have mostly cis conformations with the content of trans fatty acids lesser than 4%.³⁵ The trans-configuration is thermodynamically more stable than the cis. For example, for linoleic acid ($\text{C}_{18}:2$), the C–H bond dissociation energy in the configuration $\text{C}_{18}:2\text{-}9\text{c}\text{-}12\text{c}$ is $328.0 \text{ kJ mol}^{-1}$, while it is $334.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ is for the $\text{C}_{18}:2\text{-}9\text{t}\text{-}12\text{t}$ configuration, a difference of 6.8 kJ mol^{-1} which indicates that oxidation takes place preferentially at cis double bonds.³⁶

Also, different polar bonds in TAGs are active sites making them easily attackable by humidity, oxygen, and other chemical and physical agents (Figure 5B). In particular, one of the main weakness is the degrees of unsaturated double bonds that function as active points for many reactions, with autoxidation of vegetable oils, a free radical chain reaction, is well known and includes three steps: initiation, propagation, and termination. The process is initiated by formation of TAGs or FA radicals and the most commonly form of atmospheric triplet oxygen, $^3\text{O}_2$, a radical with two unpaired orbitals in the molecule. However, this interaction is thermodynamically unfavorable due to different spin states unless oxygen is activated and converted to singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) or to a reactive oxygen species such as hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^\bullet), or superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$). An input of energy (heat, light, radioactive radiation) or the presence of natural sensitizers present in the oil may mediate the activation of oxygen. The initiation auto-oxidation step occurs with the abstraction of hydrogen atoms from TAGs and FAs, in the presence of reactive oxygen species (Figure 6A).

The hydrogen abstraction occurs preferentially at allylic hydrogens with the weakest C–H dissociation energies. As seen in Figure 6A, the abstraction of the hydrogen atom in the methylene group between two double bonds in FA is by far the most readily removed as only 272 kJ mol^{-1} are necessary. The reactivity order is then as follows: doubly allylic $\text{H} \gg$ singly allylic $\text{H} >$ $\text{H} \alpha$ -carbonyl $>$ H methylene farther down the acyl chain. The hydrogen abstraction leaves a carbon-centered lipid radical (R^\bullet) which is stabilized through a resonance molecular

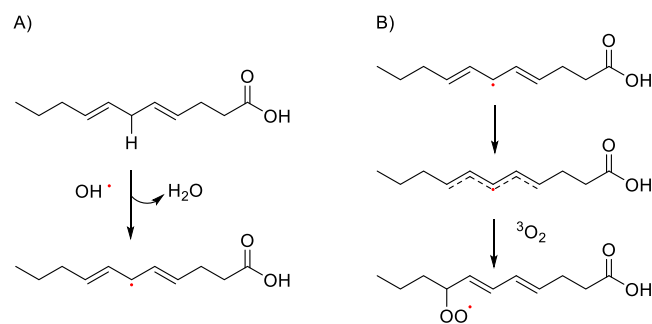


Figure 6. (A) Initiation process of lipid oxidation with the reactive oxygen hydroxyl radical. (B) Resonance system with formation of conjugated dienes and addition of oxygen to yield hydroperoxide radicals.

rearrangement (Figure 6B). The (R•) so formed reacts then with ³O₂ to form new radicals, the reactive alkyl peroxy radicals (R-O-O•) that can then remove hydrogen from another lipid molecule and react with hydrogen to form hydroperoxides (R-O-OH) and new free radicals (R•). As the reaction of peroxy radicals (R-O-O•) with the chain FA (RH) is slower than that of RH with ³O₂, that reaction determines the autoxidation reaction rate. Hydroperoxides may also break down to produce more free radicals, propagating the oxidation process. This second stage of the autoxidation process is the propagation step, and the succession of reactions can be repeated several times due to the proliferation of radicals. The termination of the free radical chain reactions takes place when the FA substrates diminish and the reaction among alkyl and peroxy radicals combine to give rise to many nonradical volatile and nonvolatile products.

Little work has been published about the impact of oxidation on the lubrication performance of vegetal oils. For the primary oxidation compounds of TAGs-based vegetal oils, Fox et al.³⁷ have shown that an increase in the hydroperoxides content during sunflower oil oxidation resulted in wear and friction increase, although it was uncertain which, the degradation of TAGs or the hydroperoxides themselves, had the higher impact. Also, during the lubrication process, hydroperoxides may be further degraded liberating not only small molecules but also condensation and/or corrosive products that subsequently increase the oil viscosity and/or may form sediments by polycondensation, all of which impair the lubricant properties of the oils. So, the higher the lubricant viscosity is, the greater the force against its resistance to flow between devices is. The small molecules liberated during decomposition of hydroperoxides (secondary stage of vegetal oil oxidation) may be volatile (e.g., aldehydes) and nonvolatile (e.g., short-chain hydrocarbons, alcohols, epoxides) compounds. Due to the low polarity and short chain length of volatile compounds, their impact on lubrication must be marginal. However, the polymerization of the high molecular weight compounds formed during the final stages of the oxidation process may lead to an increased viscosity and the formation of lacquer deposits, the two factors associated with engine damages.

Photo-Oxidative Degradation of Vegetal Oils. In the presence of UV light, another important oxidation pathway may accompany the auto-oxidation reaction, chlorophylls act as photosensibilizers while in the dark they act as antioxidant compounds. Upon absorption of light energy, chlorophylls are excited to a singlet excited state from which the triplet state

can be populated through a nonradiative intersystem crossing process. Triplet state chlorophylls react then with triplet oxygen producing singlet oxygen by energy transfer, thus chlorophylls returning to their ground singlet state.³⁸ Singlet oxygen can react directly with electron-rich double bonds giving rise to conjugated and nonconjugated hydroperoxides (“ene” reaction), and no alkyl-radicals are formed. It is worth stressing the different roles of oxygen in auto-oxidation (triplet oxygen) and photo-oxidation (singlet oxygen):³⁹ (a) Triplet oxygen does not directly react with double bonds, but singlet oxygen does. (b) Singlet oxygen oxidation proceeds through an Alder-ene reaction instead of a radical chain one. (c) The singlet oxygen reaction is quicker, and its rate is related to the number of double bonds instead of types of double bonds (conjugated or nonconjugated). (d) The reaction does not depend on the number of doubly activated allylic groups. Hydroperoxides formed by ¹O₂ oxidation are decomposed by the same mechanisms that the hydroperoxides are formed by ³O₂ in auto-oxidation, and the drawbacks for lubrication are also the same as already mentioned.

Thermo-Oxidative Degradation of Vegetal Oils.

Thermal stability is a critically important lubricant characteristic. During the lubrication process, mechanical energy is transformed into heat, which results in the increase of the temperature of the sliding bodies, particularly within the contact region where the temperature is highest.⁴⁰ So, most neat vegetal-based lubricants can only be used in low-performance applications with low thermal stress as the maximum operating temperature is restricted to 70 °C.⁴¹ On the other hand, at low temperatures, depending on both the plant species and the strain from which the oil was obtained, vegetal oils may exhibit poor cold flow behavior.

Although the temperature effect on the oxidative stability of vegetal oils has been studied for many years, the true reaction mechanisms of the thermal decomposition of TAGs is not clear due to its complexity. In studies performed by Nawar’s group,^{42–44} FFAs are thermally formed both in the presence and absence of moisture, with a release of shorter-chain and unsaturated FAs. This means that the oil becomes more acidic during degradation.

Bond cleavages may occur in any point of the TAG structure, with each scission producing a large variety of products (lactones, methyl ketones, hydrocarbons, and many other compounds) and free radicals that may initiate lipid oxidation chain reactions. At high temperatures, as a result of the degradation, the oil loses its lubricating properties (increase in lubricant viscosity), while the final products of thermal degradation eventually combine with each other to form oil-insoluble polymeric materials as sludge (insoluble in the bulk oil) or as varnish or lacquer (on metal surfaces).^{45,46}

The poor thermo-oxidative properties of vegetal oil lubricants are mainly due to the following: (a) Hydrolytic instability of the β-CH group on the glycerol group (Figure 5) that results in the ester linkage decomposition into FFAs and alcohols. The hydrolytic reaction rate increases at elevated temperature. (b) The temperature properties of vegetal oil-based lubricants are mainly dependent on the amount of PUFAs. Polyunsaturation leads to oxidation and polymerization reactions through a complex process that involves several short-lived species and several intermediate steps. (c) The presence of metals (e.g., iron, copper) catalyze the initiation of the oil degradation at much lower temperatures.

Metal Ion-Mediated Degradation of Vegetal-Based Lubricants. Crude vegetal oils may contain transition metals such as copper or iron, particularly in chelated form.⁴⁷ Without refining, vegetal oils contain relatively high amounts of copper and iron.^{48–50} These metals reduce the activation energy of the auto-oxidation process and may both initiate and catalyze the first degradation step producing reactive $^1\text{O}_2$ species from $^3\text{O}_2$ and hydroxyl radicals from hydrogen peroxide (Haber–Weiss reaction), while H_2O_2 can also form hydroxyl radicals by the Fenton reaction in the presence of Fe^{2+} .^{48,51} Also, metal ions (Cu^{2+} or Fe^{3+}) can catalyze the decomposition reaction of hydroperoxides to alkoxy-radicals, which may amplify and/or initiate *de novo* the lipid peroxidation. Fe^{2+} is more active than Fe^{3+} in decomposing hydroperoxides, with a reaction rate constant of $1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.⁵² According to Choe and Min,⁴⁸ copper accelerates hydrogen peroxide decomposition 50 times faster than ferrous ion (Fe^{2+}), and ferrous ion acts 100 times faster than ferric ion (Fe^{3+}).

Moisture Contamination. Unlike mineral oils, vegetal oils exhibit much higher water solubility. In order to set limits on moisture levels, the concept of relative saturation is useful. So, if 10 ppm moisture is considered adequate for a dry mineral oil (moisture saturation at 60 ppm at room temperature), then for a vegetal oil (1200 ppm water saturation at room temperature) the equivalent water content would be around 200 ppm. The concentration of water may vary from 300 to 400 ppm for mineral oils, while for synthetic biodegradable oils it ranges from 800 to 1000 ppm.⁵³

When dispersed in a lubricant, moisture is a contaminant that reduces the lube chemical stability and may damage the bearing surfaces. Water may enter the lubricant in different ways, such as absorption, condensation, combustion/oxidation/neutralization, and free water entry, and it can be present as dissolved, emulsified, and free water. The moisture from room air humidity in constant contact with the lubricant represents the lowest level of moisture contamination, the dissolved moisture. Up to a relative humidity of air of 100%, water molecules are dispersed, do not condense, and are not visible to the naked eye. If temperature decreases to a point that water molecules condense, then the lubricant becomes milky like (emulsified water). Free water is water that remains as a separated aqueous liquid phase in the lubricating oil. For a tribo-system, dissolved water is less damaging than emulsified water, while free water is the most damaging.^{54,55} Direct effects of water contamination in lubricants causes many problems to machinery life such as corrosion (chemical or electrochemical reaction between the metal surface and water),⁵⁶ water etching (due to byproducts from lubricant degradation), vaporous cavitation (due to instantaneous vaporization and condensing implosion of water),⁵⁷ and hydrogen embrittlement (under extreme conditions water dissociates to release hydrogen atoms which then permeate the metal causing pinning and embrittlement of the metal),⁵⁸ among other effects. Water contamination also has undesirable effects on the physical and chemical properties of the vegetal oil itself. As described above, the oxidation process in oils begins with an initiation step that requires a catalyst (metal ions, light, temperature, oxygen) and the accumulation of ROOHs responsible for propagation of the oxidation. The last 10 years have seen the emergence of new hypotheses to explain the water role in the oxidation process in oil related with the formation of reverse micelles: lipid hydroperoxides, due to their amphiphilic nature, self-assemble into roughly spherical arrangements (reverse

micelles) around trace amounts of water, placing the hydrophilic head (e.g., carboxyl, phosphate, polar groups) toward the water domain (aqueous core) and their hydrophobic tails (hydrocarbon chains) toward the bulk oil.⁵⁹

To date, there are convincing observations and excellent reviews that support the hypothesis that reverse micelles and/or lamellar structures are the natural nanoreactors where lipid oxidation takes place.^{60–63} In the presence of water contamination (along with the activity of lipase enzymes), hydrolysis of TAGs takes place, producing MAGs, DAGs, and FFAs, compounds that have been reported also as pro-oxidants in several works, in particular FFAs.^{64,65} A proposed mechanism for the pro-oxidant activity of minor components in oils (FFAs, MAGs, phospholipids) is based also on their amphiphilic nature. Reverse micelles are formed by amphiphilic molecules with a low hydrophilic–lipophilic balance (HLB), as is the case for minor components of oils: FFAs (HLB ≈ 1.0), DAGs (HLB ≈ 1.8), and MAGs (HLB $\approx 3.4–3.8$); however, phospholipids have intermediate HLB values (HLB ≈ 8.0), the reason that they form not only reverse micelles but also lamellar structures.⁶⁶ Subramanian et al.⁶⁷ reported the presence of reverse micelle structures in crude soybean oil and high-oleic sunflower oil containing 245 and 400 ppm water, respectively. The presence of reverse micelles in bulk oils creates oil–water interfaces where hydrophilic (e.g., metal ions) and amphiphilic (e.g., lipid hydroperoxides) pro-oxidants are driven into close contact with each other, resulting in increased lipid oxidation rates.^{68,69} What has not been supported by experimental data is the fact that if hydroperoxides have an active role in the formation of reverse micelles, then these compounds should exhibit a critical reverse micellar concentration. According to Brimberg and Kamal-Eldin,⁷⁰ lipid oxidation starts by pseudo-first-order slow buildup of hydroperoxides until reaching a critical concentration that triggers the oxidation of the oil passing from the induction to the propagation phase and the reaction rate change to a second-order reaction. The increase of reverse micelles containing hydroperoxides, water, and other amphiphilic molecules provides an interfacial nanoenvironment within the oil, acting as active mediators for oxidation reactions. As the concentration of hydroperoxides and water increases (as result of oxidation reactions), micelles become larger until a critical point upon which they disrupt and smaller micelles can be formed. Although there is much information about the deleterious tribological effects of water contamination in conventional and synthetic (bio)lubricants, there is not similar information published for vegetal oil-based lubricants yet.

Effect of Lubricant Oxidative and Thermal Degradation upon Viscosity. Viscosity is one of the most important physical properties of a lubricating oil as it plays a decisive role in the formation of an oil film at the interface between rubbing surfaces. As a result of oxidative and thermal degradation, a decrease in the oil viscosity should be expected due to the formation of different low molecular weight compounds and FFAs. However, most analytical tests reveal an increase in viscosity during the auto-oxidation and thermo-oxidative processes. This fact has been explained considering that when oil starts to oxidize, the amount of carboxylic acids increases. These acids are effective catalysts for aldol condensation reactions of aldehydes and ketones, thus converting the low-molecular weight carbonyl compounds into higher molecular weight oligomers and low molecular

weight polymers, which are responsible for the increased viscosity.⁷¹ As the reaction proceeds, insoluble oligomers, sludge, and varnish deposits are formed, ruining the lubricant oil performance.

■ STABILIZATION OF VEGETAL OILS

As seen above, vegetal oils are easily degradable, with this property both an advantage (e.g., environmentally friendly lubricants) and a drawback (e.g., limited direct lubrication applications due to poor oxidative/thermal stability). To overcome/minimize such weak points several chemical modifications can be performed.

Inhibitors of Oxidation. Some compounds, sulfur-based and aromatics, can retard/inhibit the oxidation of vegetal oils by radicals and peroxy radicals, extending their useful lifetime. As the oxidation inhibitors are consumed during lubrication, they must be used in most lubricant applications. There are different types of compounds to interrupt the oxidative degradation of oil lubricants:

- (a) *UV absorbers.* This type of compound protects oils against the effects of light, which is photo-oxidation (singlet oxygen quenchers). As this process does not involve radicals, no other antioxidants can perform the task. UV absorbers inhibit the photo-oxidation initial step due to their absorptivity, much higher than that of the vegetal oil chromophors. The UV energy absorbed is dissipated as heat. A problem with some absorbers is related with its secondary function as free-radical terminators, a process during which the absorbers are consumed. So, a compound purposely designed for free-radical scavenging should be added to conserve the absorber for its true function. Typical examples of vegetal UV absorbers are carotenoids, such lycopene, lutein, and zeaxanthin.
- (b) *Peroxide decomposers.* Also known as high-temperature antioxidants, this class of antioxidants decompose, via a nonradical path, hydroperoxides and peroxides as soon as they are formed during the propagation stage of the chain reaction. The products of decomposition are molecular compounds. The propagation is thus interrupted and ends in stable products. Common peroxide decomposers include trialkylphosphites and simple aromatic sulfur compounds. Most of these compounds also exhibit both antiwear and anticorrosion properties.
- (c) *Chain-breaking antioxidants.* This is the most important and effective group of antioxidants that inhibits/retards the radical propagation chain. These types of antioxidants scavenge the initial free radicals by two mechanisms: as electron acceptors (oxidizing agents) and electron donors (reducing agents). The final stable compounds are phenoxyl radicals that are unable to propagate the chain reaction. Examples of these antioxidants are α -tocopherol (vitamin E) and flavonoids. An important characteristic of chain-breaking antioxidants is their synergistic behavior when used in combination with other coantioxidants. For example, flavonoids may act in synergy with α -tocopherol.⁷²
- (d) *Metal deactivators.* In this class of oxidation quenchers, nitrogen compounds convert metal ions into catalytically inactive chelates. Typical examples include Schiff's bases thiazoles, oxamides, curcumin, phytic acid, and quercetin.

Water–Oil Interfaces and Antioxidants Effectivity.

The effectiveness of antioxidants is a topic that has attracted much attention, and often data have been explained taking into account (a) the hydrophobic–hydrophilic nature of the antioxidant and (b) extrapolating the data obtained in bulk oils to lipid dispersions. In the milestone work by Porter et al.,⁷³ it was observed that hydrophilic antioxidants were more effective than lipophilic antioxidants in bulk oils, a fact that resulted paradoxically in the reason for which they named such behavior as the “polar paradox”, while no mechanisms or explanations for it were postulated. Later, in other breakthrough publications by Frankel et al.,⁷⁴ the polar paradox was explained as due to an interfacial phenomenon and partition in the media. So, in bulk oils, hydrophilic (polar or partially fat-soluble) antioxidants have the ability to orientate themselves at the air–oil interface where surface oxidation occurs, thus protecting the system from oxidative changes, whereas hydrophobic antioxidants are more effective in relatively more polar media such as oil-in-water emulsions. At the same time, Koga and Terao⁷⁵ refused the hypothesis that the air–oil interface was the lipid oxidation site in bulk oils arguing that as air (dielectric constant = 1) is less polar than edible oils (dielectric constant = 3), any driving force would impel polar antioxidants to move toward the air–oil interface. In their study, they reported that α -tocopherol was an efficient free-radical scavenger in bulk oils containing a small amount of water (1%) due to its increased partitioning within the oil–water interface. More refined theories about the interfacial phenomenon followed including association structures such as reverse micelles and lamellar structures.⁶⁰ Many experimental works followed contradicting the polar paradox, as revisited in excellent reviews.^{76–78}

Experimental studies in oil–water dispersions demonstrated that the antioxidant properties were governed by their HLB, which determine not only their partition in association structures such as reverse micelles and lamellar structures but also their ability to self-aggregation and their interaction with oil minor components. In fact, oil nature also affects emulsion properties (e.g., size, viscosity, and stability) and the accessibility of the antioxidants and other bioactives incorporated.⁷⁹ Studies carried out by varying the hydrophobicity of antioxidants through esterification with alkyl chains of different lengths showed that esterified phenolic antioxidants obeyed the polar paradox hypothesis up to a critical point, C₈–C₁₂ chain length, beyond which a sudden decrease of antioxidant activity was observed. This fact has been named as the “parabolic effect” and more recently as the “cutoff effect”. The first mention of this effect was made by Laguerre,⁸⁰ and it is related to the molecular size of antioxidants showing low mobility due to steric hindrance which decreases their diffusibility toward the interface. Too-short or too-long hydrophobic chains in a homologous series of antioxidants do not guarantee an optimal antioxidant activity; below a given hydrophobicity threshold, antioxidants are located in the aqueous phase, not close enough to the lipid–water interface where oxidation takes place. However, when the hydrophobicity threshold has (critical medium-sized chains) antioxidants concentrated at the lipid–water interface, oxidation is efficiently hampered. Recently, Mitrus et al.⁸¹ investigating the effects of gallic acid and some of its alkyl derivatives on the oxidative stability of soybean O/W emulsions demonstrated that antioxidants accumulate in the interfacial region, where the effective concentration is 20–180

times higher than the stoichiometric concentrations. Beyond the cutoff point, the antioxidants are far from the interface and located within the bulk oil.⁸² In summary, there is an optimum point (cutoff effect) for each antioxidant that depends *inter alia* on its HLB and its concentration. Although much of the work devoted to the role of antioxidants within the interfaces in W/O and/or O/W emulsions in the field of foods, to our knowledge, such information is scarce if not missing for vegetal-based lubricants, as well as the relationship between the presence of reverse micelles in the W/O emulsions and the cutoff effect.

Natural Antioxidants. Due to increasing concern over environmental issues, the conventional antioxidants used in mineral oil-based lubricants should be replaced by others that are environmentally acceptable. Stabilizing vegetal oil-based lubricants under boundary lubrication conditions can be challenging due to the extreme conditions of temperature, friction, water, and oxygen, not only because the rate of the oil oxidation is quite high but also because the thermal stability of the antioxidant may be compromised. Notwithstanding, there is increasing interest in vegetal-based antioxidants to replace the applications of synthetic ones. There are many types of compounds with antioxidant properties that can be found in natural sources such as seeds of many fruits, vegetables, cereals, aromatic plants, and olive oil, among others. Natural antioxidants can function as singlet and triplet oxygen quenchers to inhibit photo-oxidation and auto-oxidation, respectively, as well as free radical scavengers and peroxide decomposers. Most of these natural antioxidants are phenolic compounds, which can be broadly classified into two classes: flavonoid and nonflavonoid polyphenols. At the same time, flavonoid polyphenols can be divided into different subclasses as a function of the degree of unsaturation and oxidation of the heterocyclic ring: anthocyanins, flavonols, flavanones, flavanols, flavones, and isoflavones.⁸³ Flavonoids and stilbenes are the largest group of polyphenols and may act as chain-breaking peroxy radical scavengers. Nonflavonoid antioxidants include ascorbic acid, plant pigments, carotenoids, and tocopherols. Carotenoids are the largest group of terpenes and function as singlet oxygen quenchers. The food industry has investigated the oxidative stability of vegetal oils for years, and despite that much of the research cannot be directly applicable to the tribology field, some of the fundamental principles are the same. So, much work devoted to the use of plant extracts containing phenolic compounds has been carried out due to their functional and nutritional effects, including antioxidant activity.

■ MODIFICATIONS OF VEGETAL OILS TO IMPROVE OXIDATIVE STABILITY

Selection of the most effective natural antioxidants for vegetal oil lubricants is not enough to rival the oxidative stability provided by mineral oil-based lubricants. Also, raw vegetal oils have chemical properties not suitable for specific lubrication applications due to their high saturated or PUFAs content, their low volatility, and high viscosity. Some of these properties can be modified by several approaches such as the following:

- **Blending.** Blending has been tested to improve the oxidative stability of vegetal oils. Li et al.⁸⁴ studied the blending of SBO with sea buckthorn, camellia, rice bran, sesame, and peanut oils (20% v/v), observing that the oxidative stability of oil blends was higher than that of

the raw soybean oil. It was ascribed to the change in the FAs and tocopherols profiles and the minor bioactive lipids present in the selected oils. Recently, Ali et al.⁸⁵ also observed that blends of SBO with rice bran oil (60% v/v) improved the oxidative stability of SBO under extreme thermal conditions (170 °C, 12 h heating) thanks to the significant amounts of tocotrienol, tocopherol, phytosterols, and other compounds in rice bran oil that reduced the generation of hydroperoxides. Also, as rice bran oil is richer in saturated FAs and MUFAs than SBO, the profile of the FA composition of the later could be modified, thus improving its thermal stability.

- **Genetic modification.** Genetic engineering technique goals include improving the oxidative and thermal stability of vegetal oils by altering the genetic properties of plants in order to increase the MUFAs content of the corresponding oil. A notable example by Burh et al.⁸⁶ is the development of soybean seeds with oleic acid contents greater than 85% of the total oil by down-regulating the expression of FAD2 genes along with genes that control the production of palmitic acid. Currently, Plenish high-oleic SBO is commercially available for biodegradable lubricant formulations produced by DuPont Pioneer.⁸⁷ High oleic soybeans are the only soybeans with genetically modified oil compositions that are now commercially used for industrial applications. More recently, Tsakraklides et al.⁸⁸ reported the genetic engineering of a strain of the yeast species *Yarrowia lipolytica* that produced oil highly enriched in MUFAs and devoid of PUFAs (oleate content > 90% of total FAs) with properties as good or better than petroleum-based oils.
- **Additivation.** Apart from the natural antioxidants, recently, nanoparticles with antioxidant activity have been used. In recent papers by Tan and co-workers,^{89,90} hydrophilic zeolite nanoparticles containing extra-framework Ca^{2+} ions have been used as effective antioxidant additives to enhance oxidative stability of palm oil-based lubricants. The antioxidant activity of these nanoparticles was ascribed to three effects: (a) selective adsorption of hydroperoxides, (b) stabilization of a thermodynamically unstable O–O–H group of hydroperoxides, and (c) reduction of oil acidity by neutralizing the acidic carboxylate compounds to $\text{COO}^-(\text{Ca}^{2+})_{1/2}$ salts. As a result of these processes, decomposition of hydroperoxides is delayed and, consequently, C=C cleavage and propagation steps are decelerated, while oil acidity is decreased. Zaarour et al.⁹¹ demonstrated that Linde Type L zeolite (LTL) nanocrystals (15–20 nm) prevented the depletion of ZDDP (zinc dialkyldithiophosphate, antiwear and antioxidant additive) at elevated temperature, thus extending its active life. At the same time, LTL adsorbed the secondary oxidation products generated, delaying the degradation of the lubricant. Ca^{2+} -LTL and K^+ -LTL zeolite nanoparticles were found to be promisingly eco-friendly antioxidants due to their capability to hinder palm oil oxidation. Recently, carbon dots (CDs) obtained from tea wastes and glutathione/citric acid exhibited good solubility in nonaqueous media and could be used as green antioxidant additives in an ISO 68 base lubricant oil.⁹² The use of antioxidant nanoparticles as green additives

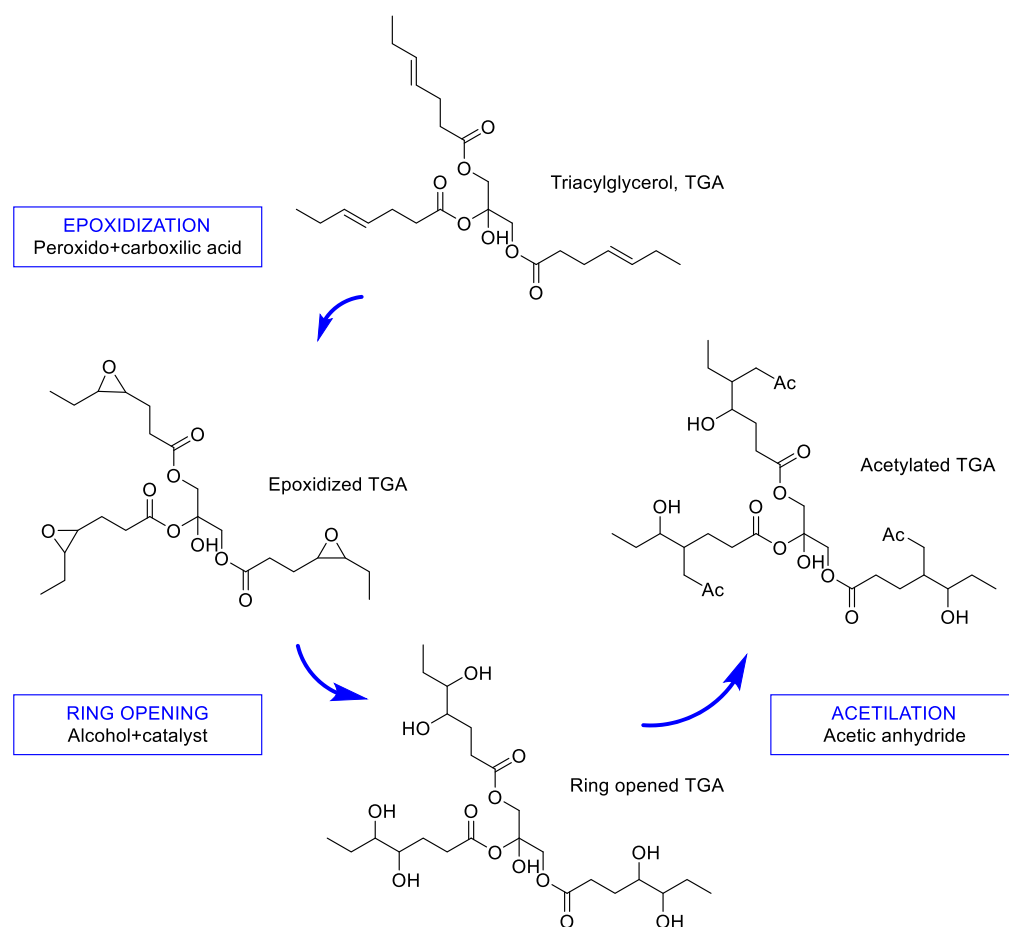


Figure 7. Epoxidation process of triacylglycerol (TAG) and formation of an acetylated product.

in lubricants is scarce, and many studies still remain, particularly those related with the cytotoxicity of the CDs or the synthesis procedures that focus on green chemistry.

- **Chemical modifications.** This is an advantageous way to both mitigate some of the limitations and improve some tribological characteristics of vegetal-based lubricants. The modifications may be carried out in two different ways: (a) reactions at the double bonds of the FA chain (selective hydrogenation, epoxidation, dimerization/oligomerization) and (b) reactions at the carboxyl groups of FAs/TAGs/esters (include esterification/transesterification and estolide formation). In the following, we describe the most important features of such chemical modifications.

Epoxidation. Epoxides (also known as oxiranes) are cyclic ethers with a reactive three-membered ring. Epoxidation of vegetal oils (also FFAs and esters) is the reaction through which the double bond in the unsaturated fraction is converted into epoxide groups by using peracids as epoxidizing agents. Organic peracids are formed by reacting acetic or formic acid with hydrogen peroxide in the presence of a strong acid (H_2SO_4 or H_3PO_4) to render performic acid (HCOOOH) and peracetic acid (CH_3COOOH), respectively.

Epoxidation can be carried out either by homogeneous or heterogeneous catalysis. In homogeneous catalysis, the peracids are generated in situ by mixing the hydrogen peroxide with the acids. With the aim to avoid (a) the corrosive nature of this reaction media, (b) undesirable side reactions due to

the epoxide ring opening, (c) cumbersome separation of acidic byproducts, (d) production of neutralized salts, and (e) low conversion, heterogeneous catalysis using ion exchange resins and transition metal-based catalysts ($\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$, $\text{MoO}_3\text{-Al}_2\text{O}_3$, MeReO_3 on Nb_2O_5 , etc.)^{93–95} are used for an environmental friendly and efficient process (Figure 7). Epoxidation can be also performed using enzymes such as *Candida antarctica* lipase B immobilized onto acrylic resins or silica. A review devoted to the chemoenzymatic epoxidation of FAs and vegetal oils has been recently published by Milchert et al.⁹⁶

The epoxidized vegetal oils are more thermally stable than the parent TAGs and have superior oxidative stability due to the removal of the bis-allylic protons, allowing them to be used as high temperature lubricants. Wu et al.⁹⁷ reported the epoxidation of rapeseed oil and its improved oxidation stability, with increased PP and lubricity as compared to neat oil. Epoxidized vegetal oils and epoxidized fatty esters/FAs can also be employed as antiwear/antifrictional additives for biodegradable vegetal oil lubes and synthetic esters, showing a better performance than conventional petroleum-based additives. Doll et al.⁹⁸ examined the physical properties relevant to lubricant applications, oxidation onset temperature, PP, and VI of SBO-based olefins and epoxides (Table 1).

Epoxidation of olefinic materials improved their oxidative stability and increased their adsorption to metal surfaces, compared to the corresponding neat olefins which, on the other hand, have better PPs and VIs. Naturally epoxidized TAGs can be found in natural oils from the two genera *Vernonia* (*Vernonia galamensis*) and *Euphorbia* (*Euphorbia*

Table 1. Physical Properties of Soybean Oil-Based Olefins and Their Epoxides

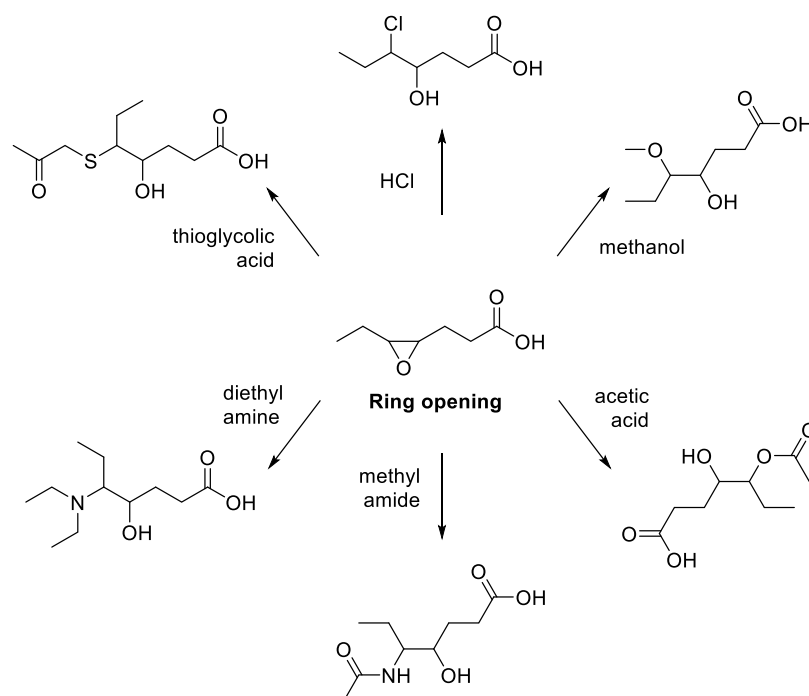
Samples	Oxidation onset temperature (°C)	Pour point (°C)	Viscosity index (mm ² s ⁻¹)
Neat olefins			
SBO	155	-9	225
Methyl oleate	177	-27	199
Methyl linoleate	139	-48	Undefined
Methyl linolenate	117	-60	Undefined
Epoxides			
Epo-SBO	199	3	142
Epo-methyl oleate	190	0	151
Epo-methyl linoleate	180	-1.5	132
Epo-methyl linolenate	131	-7.5	63

lagascae), which contain up to 70%–80% of vernolic acid (12S,13R-epoxy-9-cis-octadecenoic acid).^{99,100} One species of Euphorbia (*Bernardia pulchella*) from Brazil has been determined to contain more than 90% vernolic acid in the TAGs.¹⁰¹ In spite of the high content of vernolic acid of these natural oil sources, their use as potential substitutes of chemically epoxidized oils is still in its infancy. Further epoxidation of these natural oils increases the epoxy units per TAG molecule. Desalegn Zeleke¹⁰² reported the epoxidation of vernonia oil with a 78% yield as a promising intermediate for synthesis of biolubricants. Some significant advances are being developed by genetically engineering the biosynthesis of epoxy acids in oil seeds. Cahoon et al.¹⁰³ transferred into soybean seeds the capacity to produce high contents of vernolic acid. The expression of a cytochrome P450 epoxygenase from *Euphorbia lagascae* in somatic soybean resulted in an increase of vernolic acid up to 8% of the total FAs of the transgenic soybean embryos. Li et al.¹⁰⁴ cloned the epoxygenase SIEPX responsible for vernolic acid synthesis from seeds of *S. laevis* and two acyl-CoA (VgDGAT1 and VgDGAT2) responsible for

catalyzing TAG formation from *V. galamensis*, with the aim to develop transgenic soybeans able to co-express such enzymes. Co-expression of SIEPX and VgDGAT1 or VgDGAT2 increased accumulation of vernolic acid (up to a 25%) in soybean somatic embryos. Lubricant studies and/or applications of the oils from these epoxy-enriched seeds have yet to be performed. Oils from these soybean seeds with a high content of vernolic acid may open new opportunities for the “green” lubrication sector as they are expected to have improved stability and lubricity for metal surfaces. Looking forward to the future, it is not clear if these oils could be developed for commercial use, not only due to the elevated costs linked to the regulatory evaluation delays of genetically modified crops but also because of the secondary environmental concerns around its introduction.¹⁰⁵

The epoxidation of vegetal oils/esters/FAs is often the previous step to ring opening that results in the production of different compounds with applications in the formulation of biodegradable lubricants. Ring opening proceeds through the cleavage of one of the C–O bonds, initiated by either electrophiles or nucleophiles. Ring opening can proceed by either S_N2 or S_N1 mechanisms, depending on the nature of the epoxide and on the reaction conditions. Oxirane ring opening allows the introduction of heteroatoms and many different functional groups that can be used as base lubricants and additives. In Figure 8, different functionalities introduced by ring opening reactions are depicted.

In 2013, Sharma and Dalai¹⁰⁶ reported the simultaneous ring opening and esterification of epoxy canola oil in the presence of acetic anhydride and sulfated Ti-SBA-15 as the catalyst. Results demonstrated a 100% epoxy canola oil transformation to the esterified product, which in turn exhibited good tribological properties, such as an oxidative induction time of 56.1 h, a cloud point of -3 °C, a PP of -9 °C, and a kinematic viscosity at 100 °C of 670 cSt. Also, the biolubricant demonstrated excellent lubricity properties by a

**Figure 8.** Examples of oxirane ring opening for the introduction of different functionalities to produce biodegradable lubes.

wear scar of 130 μm . Kulkarni et al.¹⁰⁷ reported the epoxidation of mustard oil by using performic acid and nanoalumina as a catalyst and the subsequent acid-catalyzed ring opening with 2-ethylhexanol (2-EH). The 2-EH esters of epoxidized mustard oil have pour points of $-35\text{ }^\circ\text{C}$ and an enhanced VI. Harry-O'kuro et al.¹⁰⁸ explored the syntheses of formyl esters of three epoxidized vegetal oils in order to examine those physical characteristics related with their suitability as lubricant candidates. The epoxy ring opening process for formyl ester generation was mild and was followed by a simultaneous condensation reaction of the putative α -hydroxy formyl intermediate to yield vicinal diformyl esters from the epoxy group. Results demonstrated that three polyformyl esters from milkweed, soy, and pennycress exhibited low CoF and a correspondingly low wear scar. More recently, Borugadda and Goud¹⁰⁹ reported the epoxidation of waste cooking oil and waste cooling oil FA-methyl ester and the epoxides hydroxylated (ring opening) using various alcohols using sulfuric acid (homogeneous catalysis) and the ion-exchange resin IR-120 (heterogeneous catalysis). Tribologically significant properties such as PP, thermo-oxidative stability, rheology, and biodegradability were improved.

Selective Hydrogenation. Hydrogen atoms in double bonds are bis-allylic protons and thus highly reactive. Elimination of such double bonds by selective/partial hydrogenation a fraction of PUFAs can be transformed into MUFAs, thus improving the oxidative stability and low-temperature properties of the oils. The hydrogenation of fats and oils is a complex process, as along with the addition of hydrogen to double bonds, dehydrogenation processes may occur. Consequently, stereoisomeric acids may be formed. It is not an easy task to control the entire reaction uniformly and selectively to avoid formation of saturates or trans products with high PPs, even by using different catalysts or by varying the reaction conditions. In fact, catalytic partial hydrogenation of TAGs always generates some trans isomers. The key for "good" selective and partial hydrogenation (unsaturation degree reduced as much as possible while limiting cis–trans and functional isomerization) is the adequate selection of the catalyst.

Traditionally, the hydrogenation process proceeds by flushing hydrogen gas into a reactor containing vegetal oil at high pressure (70–420 kPa) and temperatures ranging from 150 to 225 $^\circ\text{C}$ using a nickel catalyst on a silicate support. A natural silicate-diatomite nickel catalyst has been shown to be selective for monounsaturated oleic acids during SBO and sunflower oil hydrogenation in an industrial reactor at high temperature (165–200 $^\circ\text{C}$) and hydrogen pressure (0.05–0.2 MPa).¹¹⁰ However, copper catalysts have been shown to have higher selectivity for hydrogenating linoleic acid during SBO hydrogenation, and this fact has been used to increase the SBO stability by selective hydrogenation of linolenic acid. Trasarti et al.¹¹¹ reported the liquid-phase hydrogenation of SBO using copper catalysts, which exhibited unique properties for obtaining proper lubricants due to the selective hydrogenation of unsaturated linolenic (C18:3) and linoleic (C18:2) FAs to unsaturated oleic acid (C18:1), while saturated stearic acid (C18:0) was not formed. Although the advantages provided by Ni and Cu catalysts, such as low cost, easy removal from oils by filtration, and selectivity and some drawbacks such as the isomerization of natural cis to trans bonds during Ni-catalyzed hydrogenation and low activity at temperatures below 120 $^\circ\text{C}$,

noble metal catalysts (e.g., Pd, Pt, and Ru) are usually employed due to their high activity in small amounts at low temperature and the possibility of reuse.^{112–114} Each noble metal catalyst exhibits particular characteristics in selectivity, reactivity, and trans isomerization during hydrogenation of vegetal oils. It has been accepted that Pt catalysts produce the least amount of trans FA during hydrogenation, less than 8%, while conventional hydrogenation produces hydrogenated oils containing from 25 to 45% trans FAs. Also, the catalyst amount when using noble metal catalysts is about 1/10 to 1/40 of Ni catalysts in conventional hydrogenation. In contrast, the catalysis time is longer using noble metal catalysts due to the low reaction temperature and the low amount of catalyst employed.¹¹⁵ At the present time, no data have been documented in the oil industry for some drawbacks of using noble metal catalysts (particularly, Pt) such as the need to recover the catalytic activity of the material, loss of part of the material during the process, or reuse of the catalyst.

Dimerization/Oligomerization. Dimerization/oligomerization methods are another technologically viable options to eliminate the double bonds of unsaturated FAs and FA esters. In general, PUFAs can be easily dimerized by heat treatment, while a catalyst is needed for dimerization of MUFAs. In the case of thermal dimerization at temperatures about 300 $^\circ\text{C}$, side reactions of FFAs such as decarboxylation and anhydride formation result in low yield. For this reason, thermal dimerization is better performed using methyl-ester and TAGs than FFAs.¹¹⁶ Traditionally, oligomerization of FAs has been performed by two catalytic approaches: (a) homogeneous catalysis using alkali or alkaline metal salts, iodine, Lewis acids (e.g., SnCl_4), and Brønsted acids (e.g., resin in H^+ form) as catalysts and (b) heterogeneous catalysis, more environmentally friendly, using materials such as kaolinite, bentonite, and montmorillonite.^{117,118} Dimer acids can be synthesized by two identical or different unsaturated C_{18} FAs such as oleic acid, linoleic acid, tall oil, and other unsaturated FAs by reaction at about 210–250 $^\circ\text{C}$ in the presence of montmorillonite as the catalyst resulting in a mixture of cyclic and linear C_{36} -dicarboxylic acids and C_{54} -trimer FAs, as well as C_{18} -monomeric FAs (mixture of saturated, unsaturated, straight chain, and branched). It is assumed that the mechanism through which the reaction proceeds over clays is a combination of Diels–Alder addition (one FA acts as the diene and the other as the dienophile), isomerization, conjugation, and hydration/dehydration reactions. Diesters based on short-chain linear diacids (C_6 – C_{12}) exhibit low viscosity, high polarity, high VIs, and low PPs while, in comparison, esters obtained from C_{36} dimer acids have higher viscosity and lower polarity, and due to residual unsaturation and branching, thermal and oxidative stability are lower. However, Armylisas et al.¹¹⁹ reported the synthesis of four short-chain dimerate esters (dibutyl, dihexyl, di(2-ethylhexyl), and dioctyl dimerate) and their evaluation as lubricant base stocks. Results demonstrated that the materials exhibited high VIs and significantly low PPs, less than $-42\text{ }^\circ\text{C}$ for the di(2-ethylhexyl) dimerate, which was ascribed to the branching of the side chain. Also, the esters showed oxidative stability, attributed to the hydrogenation of residual double bonds.

Esterification/Transesterification. Alcoholysis of TAGs is used to prepare alkyl esters, the most used method to modify the carboxyl group of the FAs. Esterification involves FFAs of natural oils reacting with long-chain alcohols to form the corresponding esters. During transesterification, glycerol

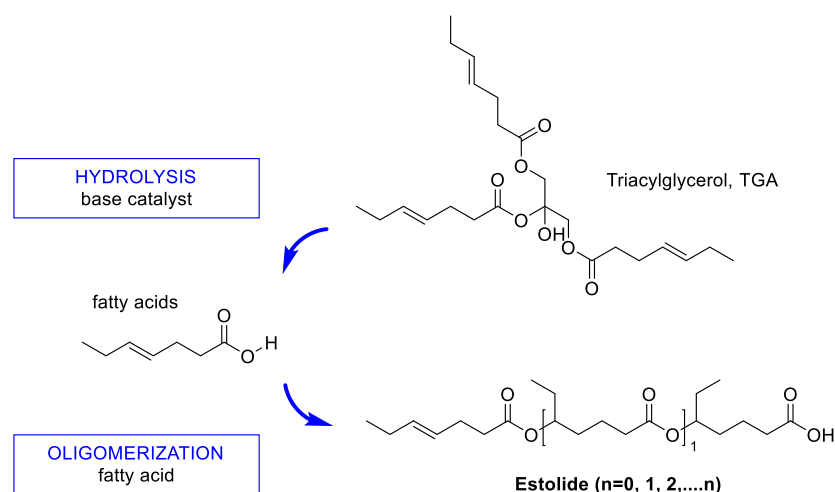


Figure 9. Process of formation of an estolide.

moieties of the TAGs are replaced by long- and/or branched-chain alcohols. The transesterification process for green lubricant synthesis can be chemically or enzymatically catalyzed. A good example of these reactions include the transesterification of palm oil. The reaction proceeds in two-steps:¹²⁰ (a) The FFAs and the TAGs are reacted with methanol in the presence of a basic catalyst to produce palm oil methyl esters. (b) The resulting palm oil methyl esters are reacted in the presence of a catalyst such as sodium methoxide (minimizes saponification of esters) with a polyhydric alcohol (e.g., trimethylolpropane, TMP) to produce the corresponding polyol esters and methanol. During the transesterification process, the ester group of palm methyl ester is replaced by the hydroxy group of TMP. An advantage of using polyhydric alcohols is the absence of β -hydrogen, which results in the enhancement of thermal and oxidative stability of the lubricant at high temperatures.¹²¹ Afifah et al.¹²² described the development of a green lubricant from palm stearin, a byproduct of palm oil, by enzymatic transesterification using *Candida antarctica* lipase B as the catalyst and methanol in a solvent-free system at a maximum yield around 95%. The chemical modification of palm stearin resulted in improvement in both physicochemical and tribological properties, such as superior VI (>120) and friction properties over commercial mineral oil-based lubricants.

In general, the polyol esters formed by transesterification of vegetal oils show good biodegradability, possess high lubricity, provide corrosion protection, and have good oxidative stability, high VI, and good shear stability. The transesterification process results in a reduction of the intramolecular forces among the TAGs and FAs, thus reducing the viscosity of the product. Also, with removal of the polyunsaturation, the increase in the chain length, and branching of alkyl chains as a result of transesterification, improved PPs are observed when compared with the unmodified oil, thus meliorating its low-temperature performance.

The problem of oxidative stability, among the FAs esters, is minimal when saturated low molecular weight FAs are involved. Wang et al.¹²³ demonstrated that TMP triesters of C_6 , C_8 , and C_{10} FAs showed reduced viscosity ($23.3 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$), a quite low PP ($-45 \text{ }^\circ\text{C}$), and high flash point ($248 \text{ }^\circ\text{C}$), along with a remarkable oxidation stability demonstrated by an oxidation induction time of 38 h at $130 \text{ }^\circ\text{C}$, attributed to the elimination of $\text{C}=\text{C}$ double bonds and β -H atoms. The use of

saturated FAs of higher molecular weight is not practical due to the high melting point of esters. From an environmental point of view, the results presented by Makarevicine and Janulis¹²⁴ are interesting; rapeseed oil ethyl esters were more rapidly biodegradable in a water environment than rapeseed oil methyl esters, highlighting the importance of using ethyl esters over the methyl ones.

Estolide Formation. An estolide is formed through the condensation of the carboxylic acid group of one FA and the unsaturation of another FA, thus forming oligomeric esters (Figure 9). Estolides can be also formed by addition of a FA to a hydroxy containing FA. The extent of oligomerization (average number of FAs added to the base FA) is represented by the estolide number (EN).

The conventional chemical synthesis of estolides requires high temperatures ($200\text{--}210 \text{ }^\circ\text{C}$) or strong acids as catalysts which results in a low selectivity, coloring, bad odor, and unwanted byproducts that may cause equipment corrosion and acid effluents. Consequently, mild enzymatic synthesis has been described as a plausible alternative, and some enzymes such as *Avena sativa* L., *Rizopus oryzae* lipase, *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 lipase, or *Thermomyces lanuginose*, among others, have been used.^{125,126}

Natural estolides have been reported to occur in plants that produce hydroxy FAs such as ricinoleoyl estolides from castor oil or TAG estolides in several plant genus like *Physaria*, *Heliophila amplexicaulis*, *Lesquerella*, *Nerium*, *Sapium sebiferum*, *Trewia nudiflora*, and *Avena sativa*. The best known of the hydroxy acids of the seeds of some of these plants are those found in lesquerella oil in which 55%–60% corresponds to the hydroxy FA lesquerolic (14-hydroxy-cis-11-eicosenoic acid) and 2%–4% to the auricollic acid (14-hydroxy-cis-11-cis-17-eicosenoic acid) and the ricinoleic acid D-(–)12-hydroxy-octadec-cis-9-enoic acid) which comprises up to 90% of castor oil (from *Ricinus communis*).¹²⁷ The content of estolides in these natural sources is low and from a commercial point of view not attractive; however, synthetic estolides that mimic the natural ones can be commonly produced from the hydroxy moiety of lesquerella or castor oil. The properties of the synthetic estolides can vary widely by choice of capping FAs and the degree of estolide formation (capping) from single capped molecules to fully capped oils containing up to six ester linkages.

In general, the estolides exhibit improved lubricity, high VI, and low PP. The ester linkage of estolides is more resistant to hydrolysis than that of TAGs, thus having higher hydrolytic stability and exhibiting improved physical properties to be used as biolubricants. Although the oxidative stabilities of estolides are rarely informed, in a recent paper by Hoong et al.,¹²⁸ it was reported that lauric acid capped estolide from oleic acid and branched with secondary amines to obtain estolide amides exhibited a high oxidative stability with an oxidation onset temperature of 205 °C, significantly higher than that of vegetal oil-based lubricants.

CONCLUSIONS

With the increasing global industrialization, the lubricant market in combination with consumer demand for high quality eco-friendly lubricants have driven the development of new technologies such as the production of biodegradable lubricants from natural resources such as vegetal oils. Vegetal oils are effective as boundary lubricants due to their fatty acids composition that allows strong interactions with the lubricated surfaces, but also, they are easily (bio)degradable, with this property being both an advantage and a drawback. Vegetal lubricant oils are subject to oxidation more easily than mineral or synthetic lubricants. Remarkable advances have been made in organic synthesis, catalysis, and biotechnology to ameliorate the oxidative and thermal stability of vegetable oils, including, for example, transesterification, epoxidation, or estolide formation. Although the stabilization or modification of vegetal oils can make them a real alternative to replace, total or in part, mineral lubricants, thus being a response to the current need for biodegradable and easily disposable lubricants, most studies are still produced on a laboratory scale. The use of biolubricants is still small, and only a few have the “eco-label”. To advance the research for new eco-friendly lubricants, further studies are needed in the following areas: (a) evaluation of inexpensive and environmental friendly oil extraction processes in order to scale-up at the industrial level (use–reuse cycle), (b) development of inexpensive and environmentally friendly additives (e.g., use of vegetable wastes to extract antioxidants or to produce functional nanoparticles) that improve both the chemical and tribological properties, (c) deep characterization of the chemical stability of eco-friendly additives, such as natural antioxidants, under working conditions, and (d) improvement of the chemical processes and uses of nonedible vegetal oils as suitable feedstock to produce renewable biolubricants at prices competitive with those of synthetic and mineral oils.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Rosana Badía-Laiño – Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Oviedo 33006, Asturias, Spain; orcid.org/0000-0002-9489-2198; Email: rbadia@uniovi.es

Authors

Clarissa Murru – Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Oviedo 33006, Asturias, Spain

Marta E. Díaz-García – Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Oviedo 33006, Asturias, Spain

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acssuschemeng.0c06988>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Biographies



Clarissa Murru is a biotechnologist specialized in the area of food biotechnology. She achieved her B.Sc. degree at the Università degli Studi di Cagliari (Italy) and earned her M.Sc. degree at the Universidad de Oviedo (Spain) where she is currently a Ph.D student. Her research is mainly focused on the synthesis and characterization of chemically active nanoparticles obtained from wasted organic materials and their industrial applications. In her latest work, she investigated the use of antioxidant nanoadditives in lubricant oil samples in order to increase their useful life. In collaboration with the Technical University of Denmark, she recently worked on the fabrication of innovative nontoxic biofilms as possible substitutes of plastic packaging in the food industry. Also among her scientific interests are the use of artificial neural networks to develop fast and practical models capable of recognizing oil and food samples based on their optical properties. In 2020, Clarissa was awarded second place in the IMFAHE's Idea competition (Nodal Award/Shark Tank Edition, University of Aveiro) and an Erasmus Fellowship from the University of Oviedo.



Rosana Badía-Laiño received her B.Sc. in chemistry from the National University of La Plata, Argentina. She obtained her Ph.D. in analytical chemistry in 1997 at the University of Oviedo, Spain, under the supervision of Prof. Marta E. Díaz-García, on luminescent chemical sensors for the control of polluting species in waters. After completing her postdoctoral trainings in different institutions, such as Tijuana (Mexico), Cranfield (United Kingdom), Madrid (Spain), and Oviedo, developing optical sensors and molecular imprinting sensing phases, she became associated professor at the University of Oviedo in 2008. Her research is mainly focused on the development and applications

of functional nanomaterials, molecular imprinted sol–gel materials, optical biomarkers, luminescence spectroscopy, and chemical sensors. She is currently the head of the Department of Physical and Analytical Chemistry at the University of Oviedo.



Marta Elena Díaz-García received her B.Sc. and Ph.D. from the University of Oviedo and moved to Loughborough University (U.K.) in 1983 as a postdoc student to work with Professor J. N. Miller on analytical fluorescence. In 1988, she was promoted to associate professor and then to professor in analytical chemistry in 1992. Since 2018, she has been an emeritus professor at the University of Oviedo, where she continues doing research. As an author of more than 170 peer-reviewed articles, reviews, and book chapters, her major scientific interests encompass the development and applications of chemical sensors, luminescence techniques, luminescent nanomaterials, micellar media, and molecularly imprinted polymers.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge financial support from the Ministerio de Economía y Competitividad and European Regional Development Fund (MINECO/FEDER), Project #RRT12018-099756-B-100. C. Murru acknowledges FICYT (Foundation for the Promotion in Asturias of the Applied Scientific Research and Technology), Project FC-GRUPINI-DI/2018/000131, for financial support.

REFERENCES

- (1) Cammack, R.; Atwood, T.; Campbell, P.; Parish, H.; Smith, A.; Vella, F.; Stirling, J., Eds.; *Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed.; Oxford University Press, Oxford, UK, 2006.
- (2) Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H., Jr; Murphy, R. C.; Raetz, C. R.; Russell, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; Van Nieuwenhze, M. S.; White, S. H.; Witztum, J. L.; Dennis, E. A. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 839–862.
- (3) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. The Nomenclature of Lipids (Recommendations 1976) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *Biochem. J.* **1978**, *171*, 21–35.
- (4) O'Keefe, S. F. Nomenclature and Classification of Lipids. In *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 4th ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, 2017, Chapter 1.
- (5) Bart, J. C. J.; Gucciardi, E.; Cavallaro, S. Science and Technology. In *Biolubricants*, 1st ed.; Woodhead Publishing Series in Energy; Woodhead Publishing, 2013; Chapter 7.
- (6) Cecilia, J. A.; Ballesteros Plata, D.; Alves Saboya, R. M.; Tavares de Luna, F. M.; Cavalcante, C. L.; Rodriguez-Castellon, E. An Overview of the Biolubricant Production Process: Challenges and Future Perspectives. *Processes* **2020**, *8*, 257.
- (7) European Commission. EU Ecolabel. <https://ec.europa.eu/environment/ecolabel/> (accessed November 24, 2020).
- (8) Jarmat. <https://www.jarmat.fi/> (accessed November 24, 2020).
- (9) European Commission. EU Ecolabel Personal care products - NYCOLUBS 210. <http://ec.europa.eu/ecat/product/en/931275/-nycolube-210> (accessed November 24, 2020).
- (10) Menezes, P.; Ingole, S. P.; Nosonovsky, M.; Kailas, S. V.; Lovell, M. R., Eds.; *Tribology for Scientists and Engineers: From Basics to Advanced Concepts*, 1st ed.; Springer Science + Business Media: New York, 2013.
- (11) Karama, M.; Delbé, K.; Denape, J. *Tribological Aspects in Modern Aircraft Industry*, Eds.; Trans Tech Publications, 2015.
- (12) Kutz, M., Ed.; *Engineers' Handbook: Materials and Mechanical Design*, 3rd ed.; John Wiley & Sons, 2016; Vol. 1.
- (13) Simič, R.; Kalin, M. Adsorption mechanisms for fatty acids on DLC and steel studied by AFM and tribological experiments. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, *283*, 460–470.
- (14) Fox, N. J.; Tyrer, B.; Stachowiak, G. B. Boundary Lubrication Performance of Free Fatty Acids in Sunflower Oil. *Tribol. Lett.* **2004**, *16*, 275–281.
- (15) Bowden, F. P.; Gregory, J. N.; Tabor, D. Lubrication of Metal Surfaces by Fatty Acids. *Nature* **1945**, *156*, 97–101.
- (16) Tao, Y. T. Structural comparison of self-assembled monolayers of n-alkanoic acids on the surfaces of silver, copper, and aluminum. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4350–4358.
- (17) Thompson, W. R.; Pemberton, J. E. Characterization of Octadecylsilane and Stearic Acid Layers on Al₂O₃ Surfaces by Raman Spectroscopy. *Langmuir* **1995**, *11*, 1720–1725.
- (18) Ratoi, M.; Bovington, C. H.; Spikes, H. A. *Mechanism of Metalcarboxylate Friction Modifier Additive Behavior*; International Tribology Conference, Nagasaki, 2000.
- (19) Lim, M. S.; Feng, K.; Chen, X.; Wu, N.; Raman, A.; Nightingale, J.; Gawalt, E. S.; Korakakis, D.; Hornak, L. A.; Timperman, A. T. Adsorption and Desorption of Stearic Acid Self-Assembled Monolayers on Aluminum Oxide. *Langmuir* **2007**, *23*, 2444–2452.
- (20) Sahoo, R. S.; Biswas, S. K. Frictional response of fatty acids on steel. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *333*, 707–718.
- (21) Liamas, E.; Connell, S. D.; Ramakrishna, S. N.; Sarkar, A. Probing the frictional properties of soft materials at the nanoscale. *Nanoscale* **2020**, *12*, 2292–2308.
- (22) Shafi, W. K.; Raina, A.; Ul Haq, M. I. Friction and wear characteristics of vegetable oils using nanoparticles for sustainable lubrication, Tribology-Materials. *Tribol.-Mater., Surf. Interfaces* **2018**, *12*, 27–43.
- (23) Chimeno-Trinchet, A.; Fernández-González, A.; García Calzón, J. A.; Díaz-García, M. E.; Badía Laíño, R. Alkyl-capped copper oxide nanospheres and nanoprolates for sustainability: water treatment and improved lubricating performance. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2019**, *20*, 657–672.
- (24) Galoppini, E. Linkers for anchoring sensitizers to semiconductor nanoparticles. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 1283–1297.
- (25) Campen, S.; Green, J. H.; Lamb, G.; Atkinson, D.; Spikes, H. On the increase in boundary friction with sliding speed. *Tribol. Lett.* **2012**, *48*, 237–248.
- (26) Weller, D. E., Jr.; Perez, J. M. A study of the effect of chemical structure on friction and wear: Part 2-Vegetable oils and esters. *Lubr. Eng.* **2001**, *57*, 20–26.
- (27) Bowden, F. P.; Tabor, D. *Friction and Lubrication of Solids*; The Clarendon Press, Oxford, 1950.
- (28) Castle, R. C.; Bovington, C. H. The behaviour of friction modifiers under boundary and mixed EHD conditions. *Lubr. Sci.* **2006**, *15*, 253–263.
- (29) Zisman, W. A. Friction, Durability and Wettability Properties of Monomolecular Films on Solids. In *Friction and Wear*; Davies, R., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1959.
- (30) Warsaw, C. K.; Furey, M. J.; Ritter, A. L.; Molina, G. J. Triboemission as a basic part of the boundary friction regime: A review. *Lubr. Sci.* **2002**, *14*, 223–254.

- (31) Mori, S. Boundary lubrication from the viewpoint of surface chemistry - Role of nascent surface on tribochemical reaction of lubricant additives. *JTEKT Eng. J. Eng. Ed* **2011**, No. 1008E, 1–12.
- (32) Smith, H. A.; McGill, R. M. The Adsorption of n-Nonadecanoic Acid on Mechanically Activated Metal Surfaces. *J. Phys. Chem.* **1957**, *61*, 1025–1036.
- (33) Scrimgeour, C. Chemistry of Fatty Acids. In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 6th ed.; Six Volume Set; Shahidi, F., Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- (34) Technical Committee of the Institute of Shortening and Edible Oils, Inc *Food Fats and Oils*, 10th ed.; Institute of Shortening and Edible Oils: WA, 2016.
- (35) Song, J.; Park, J.; Jung, J.; Lee, C.; Gim, S. Y.; Ka, H.; Yi, B. R.; Kim, M. J.; Kim, C.; Lee, J. H. Analysis of Trans Fat in Edible Oils with Cooking Process. *Toxicol. Res.* **2015**, *31*, 307–312.
- (36) Li, C.; Ma, G.; Yao, Y.; Liu, W.; Zhou, H.; Mu, H.; Wang, S. Mechanisms of isomerization and oxidation in heated trilinolein by DFT method. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 9870–9877.
- (37) Fox, N. J.; Simpson, A. K.; Stachowiak, G. W. Sealed capsule differential scanning calorimetry an effective method for screening the oxidation stability of vegetable oil formulations. *Lubr. Eng.* **2001**, *57*, 14–20.
- (38) Min, D. B.; Boff, J. M. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2002**, *1*, 58–72.
- (39) Bacellar, I. O. L.; Baptista, M. S. Mechanisms of Photosensitized Lipid Oxidation and Membrane Permeabilization. *ACS Omega* **2019**, *4*, 21636–21646.
- (40) Kennedy, F. E. Frictional Heating and Contact Temperatures; In *Modern Tribology Handbook*; Bhushan, B., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2001; Vol 2, Chapter 6.
- (41) Maleque, M. A.; Masjuki, H. H.; Sapuan, S. M. Vegetable-based biodegradable lubricating oil additives. *Ind. Lubr. Tribol.* **2003**, *55*, 137–143.
- (42) Nawar, W. W. Thermal degradation of lipids. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, *17*, 18–21.
- (43) Nawar, W. W. Thermal Decomposition of Lipids: An Overview. *ACS Symp. Ser.* **1989**, *409*, 94–104.
- (44) Crnjar, E. D.; Witchwoot, A.; Nawar, W. W. Thermal oxidation of a series of saturated triacylglycerols. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 39–42.
- (45) Gatto, V.; Moehle, W.; Cobb, T.; Schneller, E. Oxidation Fundamentals and Its Application to Turbine Oil Testing. *J. ASTM Int.* **2006**, *3*, 13498.
- (46) Rudnick, L. R. *Lubricant Additives: Chemistry and Application*; Marcel Dekker, Inc, New York, 2003.
- (47) Decker, E. A. Antioxidant Mechanism. In *Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 2nd ed.; Akoh, C. C.; Min, D. B., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2002.
- (48) Choe, E.; Min, D. B. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2006**, *5*, 169–186.
- (49) Kamboh, M. A.; Memon, S.; Zardari, L. A.; Nodeh, H. R.; Sherazi, S. T. H.; Yilmaz, M. Removal of toxic metals from canola oil by newly synthesized calixarene-based resin. *Turk. J. Chem.* **2018**, *42*, 918–928.
- (50) Saleh, M. I.; Murray, R. S.; Chin, C. N. Ashing techniques in the determination of iron and copper in palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1988**, *65*, 1767–1770.
- (51) Costello, M. T. *Lubricant Additives: Chemistry and Application*, 2nd ed.; Rudnik, L. R., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2009; Chapter 17.
- (52) Halliwell, B.; Murcia, M. A.; Chirico, S.; Aruoma, O. I. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: What they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1995**, *35*, 7–20.
- (53) IMCA. *Understanding Biodegradable Lubricants: An Introduction to "Green" Oil in Hydraulic Systems Offshore*; International Marine Contractors Association (IMCA), 2014.
- (54) Eachus, A. C. The trouble with water. *Tribol. Lubr. Technol.* **2005**, *61*, 34–38.
- (55) Cyriac, P. M.; Lugt, R.; Bosman, R. Impact of Water on the Rheology of Lubricating Greases. *Tribol. Trans.* **2016**, *59*, 679–689.
- (56) Costello, M. T. Corrosion Inhibitors and Rust Preservatives. In *Lubricant Additives, Chemistry and Applications*, 3th ed.; Rudnick, L. R., ed.; CRC Press, 2017; .Chapter 21.
- (57) Li, X. S.; Song, Y.; Hao, Z.; Gu, C. Cavitation Mechanism of Oil-Film Bearing and Development of a New Gaseous Cavitation Model Based on Air Solubility. *J. Tribol.* **2012**, *134*, 031701.
- (58) Lynch, S. Hydrogen embrittlement phenomena and mechanisms, Corrosion Review. *Corros. Rev.* **2012**, *30*, 105–123.
- (59) Chaiyasit, W.; Mc Clements, D. J.; Weiss, J.; Decker, E. A. Impact of Surface-Active Compounds on Physicochemical and Oxidative Properties of Edible Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 550–556.
- (60) Chaiyasit, W.; Elias, R. J.; Mc Clements, D. J.; Decker, E. A. Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, *47*, 299–317.
- (61) Ghnimi, S.; Budilarto, E.; Kamal-Eldin, A. The New Paradigm for Lipid Oxidation and Insights to Microencapsulation of Omega-3 Fatty Acids. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, *16*, 1206–1218.
- (62) Kittipongpittaya, K.; Panya, A.; Cui, L.; Mc Clements, D. J.; Decker, E. A. Association Colloids Formed by Multiple Surface Active Minor Components and Their Effect on Lipid Oxidation in Bulk Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2014**, *91*, 1955–1965.
- (63) Chen, B.; Mc Clements, D. J.; Decker, E. A. Minor Components in Food Oils: A Critical Review of their Roles on Lipid Oxidation Chemistry in Bulk Oils and Emulsions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 901–916.
- (64) Budilarto, E. S.; Kamal-Eldin, A. The supramolecular chemistry of lipid oxidation and antioxidation in bulk oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2015**, *117*, 1095–1137.
- (65) McClements, D. J.; Decker, E. A. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 1270–1282.
- (66) McClements, D. J. *Food Emulsion: Principles, Practice and Techniques*, 2nd ed.; CRC Press, Boca Raton, FL, 2004.
- (67) Subramanian, R.; Ichikawa, S.; Nakajima, T.; Kimura, T.; Maekawa, T. Characterization of phospholipid reverse micelles in relation to membrane processing of vegetable oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2001**, *103*, 93–97.
- (68) Chen, B.; Panya, A.; Mc Clements, D. J.; Decker, E. A. New Insights into the Role of Iron in the Promotion of Lipid Oxidation in Bulk Oils Containing Reverse Micelles. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 3524–3532.
- (69) Kittipongpittaya, K.; Panya, A.; Mc Clements, D. J.; Decker, E. A. Impact of Free Fatty Acids and Phospholipids on Reverse Micelles Formation and Lipid Oxidation in Bulk Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2014**, *91*, 453–462.
- (70) Brimberg, U. I.; Kamal-Eldin, A. On the kinetics of the autoxidation of fats: influence of pro-oxidants, antioxidants and synergists. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, *105*, 83–91.
- (71) Bruce, R. W. *Handbook of Lubrication and Tribology, Vol. II: Theory and Design*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2012.
- (72) Sonam, K. S.; Guleria, S. Synergistic Antioxidant Activity of Natural Products. *Ann. Pharmacol. Pharm.* **2017**, *2*, 1086.
- (73) Porter, W. L.; Black, E. D.; Drolet, A. M. Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 615–624.
- (74) Frankel, E. N.; Huang, S.-W.; Kanner, J.; German, J. B. Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1054–1059.
- (75) Koga, T.; Terao, J. Phospholipids Increase Radical-Scavenging Activity of Vitamin E in a Bulk Oil Model System. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1450–1454.
- (76) Shahidi, F.; Zhong, Y. Revisiting the Polar Paradox Theory: A Critical Overview. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3499–3504.

- (77) Zhong, Y.; Shahidi, F. Antioxidant Behavior in Bulk Oil: Limitations of Polar Paradox Theory. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 4–6.
- (78) Laguerre, M.; Lecomte, J.; Villeneuve, P. The Use and Effectiveness of Antioxidants in Lipids Preservation: Beyond the Polar Paradox. In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*; Elsevier, 2015; Chapter 14.
- (79) Qian, C.; Decker, E. A.; Xiao, H.; McClements, D. J. Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. *Food Chem.* **2012**, *135*, 1440–1447.
- (80) Laguerre, M.; López Giraldo, L. J.; Lecomte, J.; Figueroa-Espinoza, M. C.; Baréa, B.; Weiss, J.; Decker, E. A.; Villeneuve, P. Chain Length Affects Antioxidant Properties of Chlorogenate Esters in Emulsion: The Cutoff Theory Behind the Polar Paradox. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11335–11342.
- (81) Mitrus, O.; Zuraw, M.; Losada-Barreiro, S.; Bravo Díaz, C.; Paiva-Martins, F. Targeting Antioxidants to Interfaces: Control of the Oxidative Stability of Lipid-Based Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 3266–3274.
- (82) Laguerre, M.; Bily, A.; Roller, M.; Birtić, S. Mass Transport Phenomena in Lipid Oxidation and Antioxidation. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2017**, *8*, 391–411.
- (83) Brodowska, K. M. Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *Eur. J. Biol. Res.* **2017**, *7*, 108–123.
- (84) Li, Y.; Ma, W.-J.; Qi, B.-K.; Rokayya, S.; Li, D.; Wang, J.; Feng, H.-X.; Sui, X.-N.; Jiang, L.-Z. Blending of soybean oil with selected vegetable oils: impact on oxidative stability and radical scavenging activity. *Asian Pac J. Cancer Prev* **2014**, *15*, 2583–2589.
- (85) Ali, M. A.; Islam, M. A.; Othman, N. H.; Noor, A. M.; Ibrahim, M. Effect of rice bran oil addition on the oxidative degradation and fatty acid composition of soybean oil during heating. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* **2019**, *18*, 427–438.
- (86) Buhr, T.; Sato, S.; Ebrahim, F.; Xing, A.; Zhou, Y.; Mathiesen, M.; Schweiger, B.; Kinney, A.; Staswick, P. Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. *Plant J.* **2002**, *30*, 155–163.
- (87) de Maria, G.; Plenish, T. M. High oleic soybean oil. The first biotech soybean product with consumer nutrition benefits. *Agro. Food Ind. Hi-Tech* **2013**, *24*, 10–11.
- (88) Tsakraklides, V.; Kamineneni, A.; Consiglio, A. L.; MacEwen, K.; Friedlander, J.; Blitzblau, H. G.; Hamilton, M. A.; Crabtree, D. V.; Su, A.; Afshar, J.; Sullivan, J. E.; LaTouf, W. G.; South, C. R.; Greenhagen, E. H.; Shaw, A. J.; Brevnova, E. E. High-oleate yeast oil without polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 131.
- (89) Tan, K. H.; Awala, H.; Mukti, R. R.; Wong, K. L.; Ling, T. C.; Mintova, S.; Ng, E. P. Zeolite nanoparticles as effective antioxidant additive for the preservation of palm oil-based lubricant. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2016**, *58*, 565–571.
- (90) Tan, K. H.; Awala, H.; Mukti, R. R.; Wong, K. L.; Rigaud, B.; Ling, T. C.; Aleksandrov, H. A.; Koleva, I. Z.; Vayssilov, G. N.; Mintova, S.; Ng, E. P. Inhibition of Palm Oil Oxidation by Zeolite Nanocrystals. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 4655–4663.
- (91) Zaarour, M.; El Siblani, H.; Arnault, N.; Boullay, P.; Mintova, S. Zeolite Nanocrystals Protect the Performance of Organic Additives and Adsorb Acid Compounds during Lubricants Oxidation. *Materials* **2019**, *12*, 2830.
- (92) Murru, C.; Badía-Laiño, R.; Díaz García, M. E. Synthesis and Characterization of Green Carbon Dots for Scavenging Radical Oxygen Species in Aqueous and Oil Samples. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1147.
- (93) Mudhaffar, B.; Salimon, J. Epoxidation of Vegetable Oils and Fatty Acids: Catalysts, Methods and Advantages. *J. Appl. Sci.* **2010**, *10*, 1545–1553.
- (94) Borugadda, V. B.; Goud, V. V. Epoxidation of Castor Oil Fatty Acid Methyl Esters (COFAME) as a Lubricant base Stock Using Heterogeneous Ion-exchange Resin (IR-120) as a Catalyst. *Energy Procedia* **2014**, *54*, 75–84.
- (95) Lewandowski, G.; Musik, M.; Malarczyk-Matusiak, K.; Sałaciński, L.; Milchert, E. Epoxidation of Vegetable Oils, Unsaturated Fatty Acids and Fatty Acid Esters: A Review. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2020**, *17*, 412–422.
- (96) Milchert, E.; Malarczyk, K.; Klos, M. Technological Aspects of Chemoenzymatic Epoxidation of Fatty Acids, Fatty Acid Esters and Vegetable Oils: A Review. *Molecules* **2015**, *20*, 21481–21493.
- (97) Wu, X.; Zhang, X.; Yang, S.; Chen, H.; Wang, D. The study of epoxidized rapeseed oil used as a potential biodegradable lubricant. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 561–563.
- (98) Doll, K. M.; Sharma, B. K.; Erhan, S. Z. Friction Reducing Properties and Stability of Epoxidized Oleochemicals. *Clean: Soil, Air, Water* **2008**, *36*, 700–705.
- (99) Perdue, R. E.; Carlson, K. D.; Gilbert, M. G. *Vernonia galamensis*, Potential new crop source of epoxy acid. *Econ. Bot.* **1986**, *40*, 54–68.
- (100) Krewson, C. F.; Scott, W. E. *Euphorbia lagascae* Spreng., an abundant source of epoxyoleic acid; Seed extraction and oil composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1966**, *43*, 171–174.
- (101) Spitzer, V.; Aitzetmüller, K.; Vosmann, K. The seed oil of *Bernardia pulchella* (Euphorbiaceae) —A rich source of vernolic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 1733–1735.
- (102) Desalegn Zeleke, T. Epoxidation of Vernonia Oil in Acidic Ion Exchange Resin. *Am. J. Appl. Chem.* **2017**, *5*, 1–6.
- (103) Cahoon, E. B.; Ripp, K. G.; Hall, S. E.; McGonigle, B. Transgenic Production of Epoxy Fatty Acids by Expression of a Cytochrome P450 Enzyme from *Euphorbia lagascae* Seed. *Plant Physiol.* **2002**, *128*, 615–624.
- (104) Li, R.; Yu, K.; Hatanaka, T.; Hildebrand, D. F. Vernonia DGATs increase accumulation of epoxy fatty acids in oil. *Plant Biotechnol. J.* **2010**, *8*, 184–195.
- (105) Smyth, S. J. Genetically modified crops, regulatory delays, and international trade. *Food Energy Secur.* **2017**, *6*, 78–86.
- (106) Sharma, R. V.; Dalai, A. K. Synthesis of bio-lubricant from epoxy canola oil using sulfated Ti-SBA-15 catalyst. *Appl. Catal., B* **2013**, *142–143*, 604–614.
- (107) Kulkarni, R. D.; Deshpande, P. S.; Mahajan, S. U.; Mahulikar, P. P. Epoxidation of mustard oil and ring opening with 2-ethylhexanol for biolubricants with enhanced thermo-oxidative and cold flow characteristics. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *49*, 586–592.
- (108) Harry-O'kuru, R. E.; Biresaw, G.; Tisserat, B.; Evangelista, R. Synthesis of Polyformate Esters of Vegetable Oils: Milkweed, Pennycress, and Soy. *J. Lipids* **2016**, *2016*, 3128604.
- (109) Borugadda, V. B.; Goud, V. V. Hydroxylation and hexanoxylation of epoxidized waste cooking oil and epoxidized waste cooking oil methyl esters: Process optimization and physico-chemical characterization. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *133*, 151–159.
- (110) Jovanovic, D.; Radovic, R.; Mares, L.; Stankovic, M.; Markovic, B. Nickel hydrogenation catalyst for tallow hydrogenation and for the selective hydrogenation of sunflower seed oil and soybean oil. *Catal. Today* **1998**, *43*, 21–28.
- (111) Trasarti, A. F.; Segobia, D. J.; Apesteguía, C. R.; Santoro, F.; Zaccheria, F.; Ravasio, N. Selective Hydrogenation of Soybean Oil on Copper Catalysts as a Tool Towards Improved Bioproducts. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**, *89*, 2245–2252.
- (112) Van Aelst, J.; Philippaerts, A.; Bartholomeeusen, E.; Fayad, E.; Thibault-Starzyk, F.; Lu, J.; Schryvers, D.; Ooms, R.; Verboekend, D.; Jacobs, P.; Sels, B. Towards biolubricant compatible vegetable oils by pore mouth hydrogenation with shape-selective Pt/ZSM-5 catalysts. *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6*, 2820–2828.
- (113) Shomchoam, B.; Yoosuk, B. Eco-friendly lubricant by partial hydrogenation of palm oil over Pd/ γ -Al₂O₃ catalyst. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *62*, 395–399.
- (114) Hossain, M. A.; Mohamed Iqbal, M. A.; Julkapli, N. M.; San Kong, P.; Ching, J. J.; Lee, H. V. Development of catalyst complexes for upgrading biomass into ester-based biolubricants for automotive applications: a review. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 5559–5577.

(115) Gupta, M. K. *Practical Guide to Vegetable Oil Processing*, 2nd ed.; Academic Press and AOCS Press, Elsevier: London, 2017; Chapter 7, pp 171–215.

(116) Tolvanen, P.; Mäki-Arvela, P.; Kumar, N.; Eränen, K.; Sjöholm, R.; Hemming, J.; Holmbom, B.; Salmi, T.; Murzin, D. Y. Thermal and catalytic oligomerisation of fatty acids. *Appl. Catal., A* **2007**, *330*, 1–11.

(117) Yang, Q. J.; Chen, S. H.; Liu, C. R.; Wang, J. H.; Lou, J. Z.; Zhou, C.; Zhu, T. H.; Huang, D. P. Research on Dimerization of Oleic Acid Catalyzed by Organic Montmorillonite. *Adv. Mater. Res.* **2013**, *791–793*, 120–123.

(118) Wang, Z.; Lu, X.; Liang, X.; Ji, J. Improving the Stability and Efficiency of Dimeric Fatty Acids Production by Increasing the Brønsted Acidity and Basal Spacing of Montmorillonite. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2020**, *122*, 1900342.

(119) Armylisas, A. H. N.; Fauzi, S. H. N.; Mohd, N. K.; Yeong, S. K.; Zainab, I.; Azwadi, C. S. N. Excellent Properties of Dimer Fatty Acid Esters as Biolubricant Produced by Catalyst- and Solvent-Free Esterification. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2019**, *121*, 1900228.

(120) Yahayaa, M. S.; Raof, N. A.; Ibrahim, Z.; Ahmad, A.; Gomes, C. Modifications Required for Palm Oil to be Qualified as a Mechanical Lubricant. *Int. J. Manuf Mater. Mech Eng.* **2019**, *9*, 50–66.

(121) Yunus, R.; Fakhru'l-Razi, A.; Ooi, T. L.; Iyuke, S. E.; Perez, J. M. Lubrication properties of trimethylolpropane esters based on palm oil and palm kernel oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 52–60.

(122) Afifah, A.N.; Syahrullail, S.; Wan Azlee, N. I.; Che Sidik, N. A.; Yahya, W.J.; Abd Rahim, E. Biolubricant production from palm stearin through enzymatic transesterification method. *Biochem. Eng. J.* **2019**, *148*, 178–184.

(123) Wang, K.; Wang, F.; Li, J.; Huang, Z.; Lou, Z.; Han, Q.; Zhao, Q.; Hu, K. Synthesis of trimethylolpropane fatty acid triester as a high performance electrical insulating oil. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *142*, 111834.

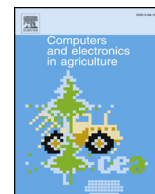
(124) Makareviciene, V.; Janulis, P. Environmental effect of rapeseed oil ethyl ester. *Renewable Energy* **2003**, *28*, 2395–2403.

(125) Khaskheli, A. A.; Talpur, F. N.; Ashraf, M. A.; Cebeci, A.; Jawaid, S.; Afridi, H. I. Monitoring the *Rhizopus oryzae* lipase catalyzed hydrolysis of castor oil by ATR-FTIR spectroscopy. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *113*, 56–61.

(126) Sun, S.; Guo, J. Enhanced Ricinoleic Acid Preparation Using Lipozyme TLIM as a Novel Biocatalyst: Optimized by Response Surface Methodology. *Catalysts* **2018**, *8*, 486.

(127) Isbell, T. A.; Cermak, S. C. Synthesis of triglyceride estolides from lesquerella and castor oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2002**, *79*, 1227–1233.

(128) Hoong, S. S.; Arniza, M. Z.; Mariam, N.M.D.N.S.; Armylisas, A. H. N.; Yeong, S. K. Synthesis and physicochemical properties of novel lauric acid capped estolide esters and amides made from oleic acid and their evaluations for biolubricant basestock. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *140*, 111653.



Original papers

Artificial Neural Network and Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy to identify the chemical variables related to ripeness and variety classification of grapes for Protected. Designation of Origin wine production



Clarissa Murru, Christian Chimeno-Trinchet, Marta Elena Díaz-García (Professor), Rosana Badía-Laíño (PhD), Alfonso Fernández-González (PhD)*

Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, C/ Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Artificial neural networks
Grapes
Connection weight algorithm
ATR-FTIR

ABSTRACT

The vineyard grown in the territories included in the Protected Designations of Origin (PDO) classification of the European Union, present unique organoleptic properties of colour, aroma and flavour. Development of techniques for identifying grape varieties or ripeness among other characteristics, are key interesting for the PDO control and quality.

Attenuated total reflectance (ATR) allows fast recording spectra without sample pre-treatment, thus avoiding undesired physical and/or chemical changes of the sample. This method works in a rapid, non-destructive and easy-to-use way. The fast-fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis of five grape varieties (*Albarín blanco*, *Mencia*, *Verdejo negro*, *Albarín negro* and *Carrasquín*) used for wine production of PDO *Vino de Cangas* provided information enough for the identification of grape class using artificial neural networks (ANN).

Despite the statistical similitude of the FTIR spectra among different grapes and maturity state, ANN resulted to be a helpful tool for classifying grape samples according to the variety or to their ripeness degree. Furthermore, compounds present in grapes that can most influence such classification can be outlined from the ANN. In this context, pectin and polysaccharides are especially significant in variety and ripeness identification, whereas polyphenols and fructose provide useful information for ripeness degree classification of grapes.

1. Introduction

Commonly, viticulture is restricted to territories where the exposition to the sun lasts for long periods of the year. This makes the countries around the Mediterranean Sea outstanding places for grape culture and wine industry, thus becoming the most famous producers and exporters of wine. Spain is known for being a sunny country which dedicates huge extensions of terrain to viticulture, having seventy-five different Protected Denominations of Origin (PDO) for wine.

Polyphenolic compounds constitute an important aspect in the quality of grapes and wines and can be found in high concentrations in the skin of fruits, having important and different roles as secondary metabolites (Crozier et al., 2006). Polyphenolic compounds can be divided into two groups: non-flavonoid (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids and stilbenes) and flavonoid compounds (anthocyanins, flavan-3-ols and flavonols). Among the flavonoid compounds,

anthocyanins are the family of polyphenols responsible for colour in grapes and young wines, while flavan-3-ols (monomeric catechins and proanthocyanidins) are mainly responsible for the astringency, bitterness and structure of wines (Singleton and Essau, 1969). For its part, flavonols (quercetin, myricetin, kaempferol, isorhamnetin and their glycosides), contribute to bitterness. In grape berries, flavonols are the most abundant phenolic compounds in grape skins, while grape seeds are rich in flavan-3-ol (Rodríguez-Montealegre et al., 2006). The concentration of phenolic compounds in grapes depends on the variety of grapevine and it is influenced by viticultural and environmental factors (Broussaud et al., 1999).

Another important group of chemicals that provide useful information for characterization of different varieties of fruit are those located in the skin cell wall. The primary cell wall of plants mainly consists of various polysaccharides (pectins, hemicelluloses and cellulose) and comparably, smaller amounts of structural glycoproteins,

* Corresponding author.

E-mail address: fernandezgalfonso@uniovi.es (A. Fernández-González).

phenolic esters, minerals and enzymes (Szymanska-Chargot and Zdunek, 2013). Plant cell walls and their constitutive polysaccharide networks are vital with regard to the mechanical properties of the plant organ, such as stiffness or strength.

Chemometric techniques coupled to Near Infrared (NIR), FTIR or ATR-FTIR have been successfully applied for identifying plant leaves (Da Luz, 2006), for studying adulteration of cumin seed oil (Arslan et al., 2019) or grape nectars (Miaw et al., 2018), for determining the geographic origin of chardonnay grapes (Gambetta et al., 2019), for classifying different brands of fruit wines (Kumar et al., 2019) or for identifying apples used in the production of cider (Fernández-González et al., 2014).

The aim of the present work is to use the absorption bands in the mid-IR region, which reveals information about the type of molecules present in the grape skins in a fast, powerful and non-destructive way. The basis of the measurements relies on the wavelength-dependent interaction of light with the skin grape components. The FTIR technique, coupled with the use of chemometric procedures to extract the information from the IR spectrum (Kumar et al., 2019; Fernández-González et al., 2014), provides an accurate, reliable method suitable for discriminating grape varieties despite the quite similar composition of their skins. Also, FTIR-chemometrics, may provide important information for assessing ripeness degree classification of grapes.

Results obtained demonstrate that FTIR coupled to chemometrics allows the consistent identification of several grape varieties used for the production of PDO *Vino de calidad de Cangas (Wine Cangas Quality)*, which must be exclusively made with the admitted and/or authorized grape varieties, as the listed in the legislation (Table 1) (Boletín Oficial del Principado de Asturias, 2008). The sample grapes used in this work come from a small vineyard in northern Spain (Cangas de Narcea, Asturias), endowed with an especial microclimate and soil suitable for viticulture. The wines derived from this vineyard own PDO according to the classification of the European Union (Boletín Oficial del Principado de Asturias, 2008; Commission delegated regulation (EU), 2014) and present unique organoleptic characteristics in terms of colour, aroma and flavour, looking clean, bright and a right alcohol/acidity balance.

2. Materials and methods

2.1. Grape samples and leaves collection

Grapes of five varieties *Albarín blanco (AB)*, *Mencía (MN)*, *Verdejo negro (VN)*, *Albarín negro (AN)* and *Carrasquín (CQ)* were kindly provided by “Bodegas Vidas” cellar.

Every week (along 3 weeks) three different clusters of three different plants (nine clusters) were collected for every variety. Three different grapes were collected from every cluster, yielding 27 grapes

per variety and week (a total of 135 grapes per week). During the third week, grapes from varieties AB and VN could not be collected due to the industrial needs of the vineyard.

Leaves for every variety were collected every week along three weeks. A single leaf was taken every time from three different plant to avoid its further damage.

2.2. Instrumentation

A Varian 670-IR spectrometer equipped with a DLaTGS detector and a diamond-based Golden Gate ATR device was used for all the measurements. Mathematical data processing and calculations were performed with MatLab R2018a from Mathworks.

2.3. Measurement protocol

Grapes were thoroughly washed with distilled water prior to analysis. A thin skin layer was cut using a scalpel and the external part brought into close contact with the ATR diamond. Every grape skin was sampled three times and its spectrum was recorded from 600 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} with resolution 4 cm^{-1} (average of 16 scans). A final number of 1053 spectra were recorded. Leaves were analysed without any previous treatment taking the FTIR spectra in different points of their surface. A total number of 135 spectra were recorded. Unused grapes and leaves were frozen for future needs.

2.4. Artificial Neural Network (ANN) training

Data were randomly selected between training (85%) and test (15%) datasets. Performance of ANN was checked with cross-validation (15%) of training dataset. The selected ANN for this work is a two-layer feed-forward network with a simple perceptron with sigmoidal activation, and the network was trained with a scaled conjugate gradient backpropagation. Four different ANN were trained: for classifying grapes (Gr-ANN), for identifying ripeness (Ri-ANN) and for identifying the grape variety and ripeness from the leaf spectra (LeGr-ANN and LeRi-ANN), each of which consisted on an input layer with forty variables, a hidden layer with 10 neurons and an output layer with 5 components (Gr-ANN and LeGr-ANN) or 3 components (Ri-ANN and LeRi-ANN). In the context of this work, ripeness means the number of weeks passed since the first sampling (week 1). Forty different mid-IR peaks were selected, whose areas were used as input variables. These peaks were selected taking into account the absorption maxima at which the main chemical components of the grape skin absorbed IR radiation. Every peak was normalized with the MatLab *mapminmax* function, so the input data were in the range $[-1, 1]$. Every spectrum was taken as the average of 16 scans, providing a good signal-to-noise ratio. Furthermore, the use of peak areas instead of heights contributed to minimize the effect of the noise in the signal. Consequently, no further noise-reduction protocol was followed so as not to overload the system with calculations.

3. Results and discussion

The mid-IR spectra provide precise information about the chemical groups present in the skin of the grapes. In this case the peaks of the spectra obtained (Fig. 1) correspond to the following functional groups: 2916 and 2849, stretching (CH_2); 1733, stretching ($\text{C}=\text{O}$) ester; 1687 stretching ($\text{C}=\text{O}$) acid; 1629 stretching (COO^-); 1470, 1386 and 761 bending (CH_2); 1210 and 825 ring vibration; 1060 glycosidic bond ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$); 960 bending ($\text{C}-\text{O}$). The spectra of the different varieties of grapes were very similar to the naked eye. In order to check whether this similitude was statistically significant, a study of the correlation coefficient of every variety pair was carried out with the aim to evaluate if the spectral difference for every variety pair was significantly different from zero.

Table 1
Varieties of grapes allowed in PDO “Vino de Calidad de Cangas”.
The varieties used in this study appear in bold.

Accepted varieties	Albarín blanco Albillo Garnacha tintorera Mencía Picapoll blanco Extra Verdejo negro
Authorized varieties	Albarín negro Carrasquín Godello Gewurztraminer Merlot Pinot noir Syrah

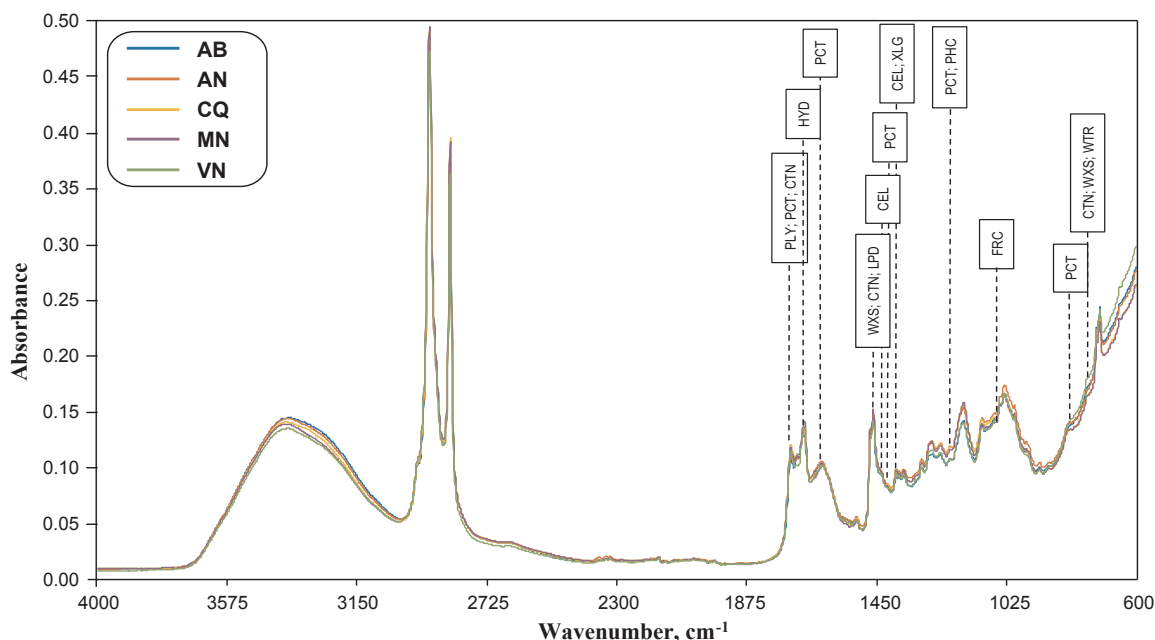


Fig. 1. Mean spectra of the grape skin of the five tested varieties in this work: albarín blanco (AB), albarín negro (AN), carrasquín (CQ), mencia (MN) and verdejo negro (VN). Cellulose (CEL), cutin (CTN), fructose (FRC), hydroxycinnamic acids (HYD), lipids (LPD), pectins (PCT), phenolic compounds (PHC), polyesters (PLY), water (WTR), waxes (WXS) and xyloglucan (XLG).

In a first step, the correlation coefficient as suggested by Varmuza et al. (Varmuza et al., 2003) was determined (Eq. (1)) and the probability p associated to the Student's t value was then calculated from that correlation coefficient.

$$\text{COR}_{a-b} = \frac{z_a z_b}{\|z_a\| \|z_b\|} \quad (1)$$

where z_a and z_b are the mean-centred absorbance spectra calculated according to Eq. (2):

$$\vec{z}_a = \vec{x}_a - \vec{1} \cdot \bar{x}_a \quad (2)$$

In which x_a the vector containing the absorbances of compound a , $\vec{1}$ the vector (1, 1, 1, ...) and \bar{x}_a the mean value of the absorbances of compound a . The degrees of freedom are the number of wavenumbers scanned, 1765.

Using Li's approach (Li et al., 2006), the null-hypothesis ($H_0 =$ 'the spectra are not correlated') is discarded if p value falls below 0.05. Results are collected in Table 2.

The probability associated for the t -values shown in Table 2 are below 10^{-5} in every case and, consequently it is possible to discard the null-hypothesis of not being correlated. These results could be understood taking into account that the chemical composition of the grapes skin is correlated in the different grape varieties, even in AB which is

Table 2
Similitude of IR absorbance spectra of the different varieties of grapes according to COR and Student's t .

COR t	AN	CQ	MN	VN
AB	0.9973 <i>13.5841</i>	0.9984 <i>17.4448</i>	0.9983 <i>17.2682</i>	0.9959 <i>11.0407</i>
AN		0.9985 <i>18.2114</i>	0.9985 <i>18.3300</i>	0.9964 <i>11.7384</i>
CQ			0.9996 <i>35.3545</i>	0.9933 <i>8.6135</i>
MN				0.9941 <i>9.1972</i>

Italics show the associated t -values.

the only one white grape in the study.

Once confirmed that the different varieties are all correlated, the next step was to guess whether the spectra could be considered statistically undistinguishable or not. For doing that, a statistical study of the spectral differences between each possible variety pair was carried out. If two spectra are similar, the mean value of the absorbance differences, as defined in Eq. (3), should be 0.

$$\text{Dif}_{a-b} = (\vec{a} - \vec{b}) \quad (3)$$

However, spectral differences didn't follow a normal distribution according to the Kolmogorov-Smirnov test and, therefore, Student's t was not applicable. Alternatively, we applied a Wilcoxon Signed Rank test to check whether the median was 0 for all possible variety pairs (avoiding self-comparisons). For each possible combination it resulted to be $p < 10^{-5}$ except for pair MN-VN, with $p = 0.476$. This means that the spectral differences of every variety pair had a median significantly different from zero, with the exception of MN-VN.

With these results in mind, a good chance for recognizing the grape variety using an ANN (Gr-ANN) was expected. To tackle it, four different ANN, one at every ripeness status (1 week, 2 weeks or 3 weeks) and a fourth (pooling together all the data) were assayed. The results collected in Tables S1 (Supplementary Information) represent the matches (percentage of grapes correctly classified) and reliability (percentage of the grapes classified into a variety, which really belongs to it, or 100 - percentage of false positives) for the test dataset classification at three different stages of ripening, as well as the area under ROC curve AUC (Table 3). Unfortunately, no AB or VN grapes could be collected the last week due to the industrial needs of the vineyard.

In all the cases, the area under ROC curve (AUC) value is over 0.96, indicating a good performance of the classification. It is worth noting that a diminution of the global performance of the network was observed when the ripeness of the grape was not taken into consideration (83.3% average matches) when compared to the performance for every week separately (90.6%, 87.7% and 95.2% average matches). In order to identify the origin of this effect, we trained a second ANN (Ri-ANN) to evaluate the ripeness degree regardless of the grape variety, whose results are summarised in Tables 4 and S2.

Our overall success rates in the grape classification of 91.2%

Table 3
Results of the classification of the training dataset for every variety at different ripeness states.

Gr-ANN		AB	AN	CQ	MN	VN	Average
1st week	Matches	76.9%	100%	100%	91.7%	84.6%	90.6%
	Reliability	83.3%	90.9%	86.7%	91.7%	100%	90.5%
AUC (1st week)		0.9979	0.9980	0.9917	0.9993	0.9994	
2nd week	Matches	100%	77.8%	75.0%	85.7%	100%	87.7%
	Reliability	94.4%	63.6%	90.0%	92.3%	100%	88.1%
AUC (2nd week)		0.9997	0.9625	0.9739	0.9690	0.9997	
3rd week	Matches	–	92.9%	100%	92.9%	–	95.2%
	Reliability	–	100%	80.0%	100%	–	93.3%
AUC (3rd week)		–	0.9816	0.9798	0.9840	–	
All pooled together	Matches	95.5%	70.3%	81.0%	77.4%	92.3%	83.3%
	Reliability	87.5%	81.3%	81.0%	66.7%	100%	83.3%
AUC (all)		0.9981	0.9585	0.9456	0.9591	0.9971	

Table 4
Results of the identification of the ripening week regardless of grape variety.

Ri-ANN		1st week	2nd week	3rd week
Mixed varieties	Matches	88.7%	83.1%	80.0%
	Reliability	85.5%	83.1%	84.2%
Area under ROC curve		0.9844	0.9562	0.9758

(average of weekly classification) or 83.3% (pooling all weeks together) as well as the success rate for identifying the ripeness degree of 83.9% is better than the success rates obtained by Gambetta et al. for identifying the geographical origin of Chardonnay grapes (81–83%) (Gambetta et al., 2019). Although better results can be found in the literature too (success rate 97.2%) (Arana et al., 2005), they are not directly comparable to ours as the classification was carried out just for only two varieties (Viura and Chardonnay) instead of five as in the present work. Cozzolino et al. (2012) in a two-case classification (Chardonnay and Riesling) also present poorer results (86%) when using the grape juice instead of the grapes themselves.

The success rate of the Ri-ANN was lower than that of Gr-ANN, thus suggesting a stronger dependence of the IR spectra on the grape variety rather than on the ripeness degree. This fact was expectable considering the chemical changes that the grape skin may suffer over the short period of three weeks. On the other hand, since the whole pool of 40 variables were used in Gr-ANN and Ri-ANN, it was possible that those variables influencing more the ripeness degree were contributing to mask the variety identification and vice-versa. For this reason, new approaches were carried out to evaluate which experimental variables were influencing the most every trained ANN.

Several algorithms have been described with this purpose, being the Connection Weight Algorithm as proposed by Olden et al. (Olden et al., 2004) one of the most accurate. The Connection Weight Algorithm was carried out independently for each output neuron (that is, each target variety). Details are collected in Tables S3 and S4. When analysing the three Gr-ANN trained with a controlled ripeness degree, the critic variables resulted to be 35, 33, 27, 24, 16, 5 and 3; when checking the Gr-ANN trained with all the grape samples regardless of the ripeness degree, the variables selected were 35, 3, 36, 33, 5 and 2. Variables 35, 33, 5 and 3 were common to both lists, suggesting that they had the most weight in the variety identification. Finally, we classified the variables according to the number of times they appear considering all the classifications together (1st week, 2nd week, 3rd week and all Gr-ANN) finding as main variables 35, 33, 3, 5, 36, 27 and 16 (sorted in decreasing importance). Similarly, the application of the Olden's Connection Weight Algorithm to the Ri-ANN showed that the ripeness-related variables were 6, 30, 19 and 9. Table 5 summarises these variables and their assignation to chemical compounds in grape skin (Kumar et al., 2019; Nogales-Bueno et al., 2017; Szymanska-Chargot and Zdunek, 2013; Socrates, 2001; sdfs.db.aist.go.jp, 2019; Heredia-Guerrero et al., 2014; Medina-Plaza et al., 2016). The peak at

Table 5
Chemical assignation of the main influencing variables (Kumar et al., 2019; Nogales-Bueno et al., 2017; Medina-Plaza et al., 2016).

Variable #	Associated to	Wavenumber	Compound
3	Variety	1733 cm ⁻¹	Polyesters, pectins, cutin
5	Variety	1687 cm ⁻¹	Hydroxycinnamic acids
6	Ripeness	1629 cm ⁻¹	Pectin
9	Ripeness	1386 cm ⁻¹	Cellulose, Xyloglucan
16	Variety	1210 cm ⁻¹	Possibly pectin or phenolic compounds
19	Ripeness	1063 cm ⁻¹	Fructose
27	Variety	761 cm ⁻¹	Probably cutin and waxes; possible water
30	Ripeness	1470 cm ⁻¹	Waxes, cutin, lipids
33	Variety	1417 cm ⁻¹	Carboxylate (pectin ester group)
35	Variety	825 cm ⁻¹	Pectin
36	Variety	1433 cm ⁻¹	Cellulose

1210 cm⁻¹ (variable #16) was not easy to assign, but considering the FTIR spectra accessible from the *Spectral Database for Organic Compounds SDBS* (SDBS, 2019), apple pectin exhibits intense absorption at 1250 cm⁻¹ and citrus pectin at 1210 cm⁻¹, it was plausible that the grape absorption at 1210 cm⁻¹ arose from pectin too, although other authors assign this band to phenolic compounds (Cozzolino et al., 2012). The IR band corresponding to variable #27 is that at 761 cm⁻¹. Although this band is difficult to assign too, it is quite close to the δ (CH₂) rocking from cutin and waxes as reported by Heredia-Guerrero et al. (Heredia-Guerrero et al., 2014) and can also be assigned to water, according to Cozzolino et al. (Cozzolino et al., 2012). Fructose, with an absorption peak at 1070 cm⁻¹ has also been described as the most contributing variable to the identification of the geographical origin of Chardonnay grapes by Gambetta et al. (Gambetta et al., 2019). Fructose, at 1070 cm⁻¹, together with water, at 780 cm⁻¹, and phenolic compounds, at 1256 cm⁻¹, seem to play also an important role in the identification between Chardonnay and Riesling varieties in grape juices according to Cozzolino's work (Cozzolino et al., 2012). These wavenumbers are consistent with the variables shown in Table 5. It is clear that pectin has a strong influence both in the variety identification and in the ripeness degree. Polyphenols and sugar (fructose) are closely related to the ripeness degree as already described (Medina-Plaza et al., 2016), and appear as important variables in our results too.

Once identified the main variables, the network was trained again using only the most influencing variables (35, 33, 3, 5, 36, 27 and 16 for Gr-ANN and 6, 30, 19 and 9 for Ri-ANN), but less satisfactory results were obtained (best match rate for Gr-ANN 74.4%, best reliability for Gr-ANN 79.2%; best match rate for Ri-ANN 82.5%, best reliability for Ri-ANN 64.4%). Despite using the most representative variables, a drastic reduction in the number of them impaired the success rate.

Once found which variables were mainly involved in the classification, we tried to understand the confusion matrixes of Gr-ANN

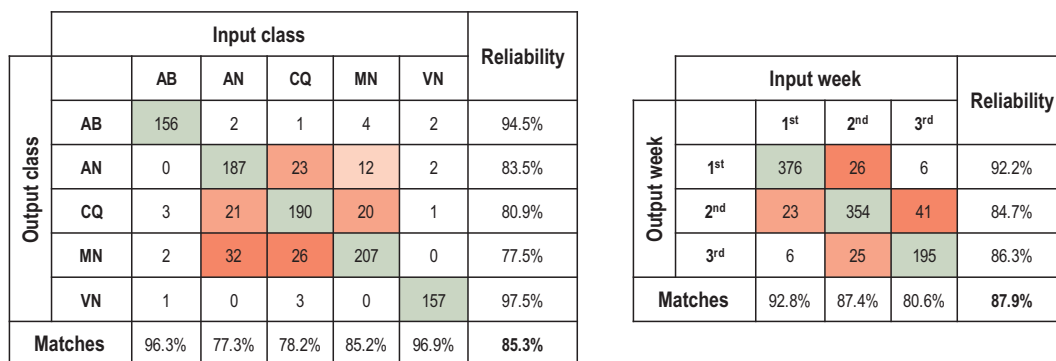


Fig. 2. Confusion matrixes considering training, validation and test datasets for Gr-ANN (left) and Ri-ANN (right). Red colour remarks worst results. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 6
Variables in common in the different varieties.

Variety	Shares	Details
AB	3 vars with 3 varieties	AN (#33 and #36), CQ (#3), MN (#3)
AN	4 vars with 3 varieties	AB (#33 and #36), MN (#35), VN (#2 and #35)
CQ	2 vars with 3 varieties	AB (#3), MN (#3) and VN (#5)
MN	2 vars with 4 varieties	AB (#3), AN (#35), CQ (#3) and VN (#35)
VN	3 vars with 3 varieties	AN (#2 and #35), CQ (#5) and MN (#35)

(regardless of ripeness state) and Ri-ANN. These matrixes were prepared with the whole dataset (training, validation and test data) and are shown in Fig. 2. The main confusions occur with varieties AN, CQ and MN which are more frequently misclassified than VN and AB. It is important to state that AN is the worst identified variety (poorest number of matches) and MN the most wrongly chosen (poorest reliability). These facts could be explained considering that AN is the variety which shares more variables with other varieties (5 variables with three

Table 7
Results of the classification of the training dataset for the leaves.

LeGr-ANN		AB	AN	CQ	MN	VN
Leaves	Matches	50.0%	75.0%	41.7%	50.0%	40.0%
	Reliability	25.0%	54.5%	44.5%	66.7%	66.7%
Area under ROC curve		0.8677	0.8588	0.8198	0.9021	0.7875

Table 8
Results of the identification of the ripening week regardless of grape variety obtained from the leaves.

LeRi-ANN		1st week	2nd week	3rd week
Mixed varieties	Matches	80.0%	54.4%	22.2%
	Reliability	63.2%	42.9%	100.0%
Area under ROC curve		0.8891	0.7955	0.8510

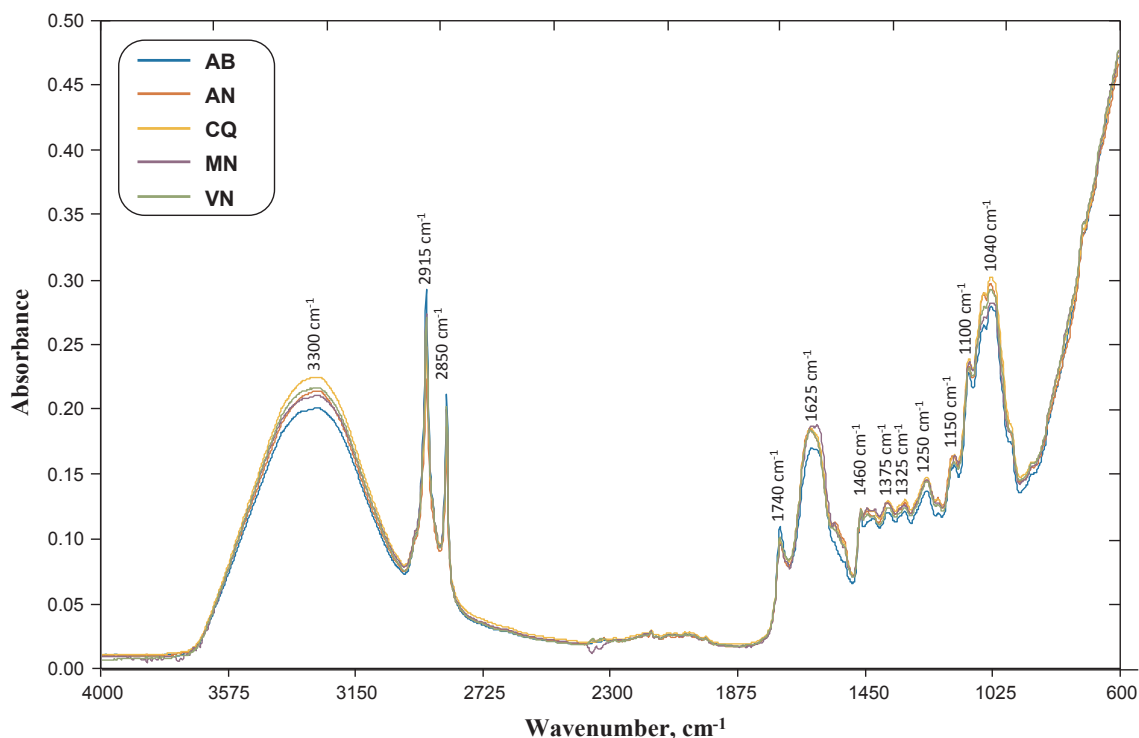


Fig. 3. Mean spectra of the leaves of the five tested varieties in this work: Albarín Blanco (AB), Albarín Negro (AN), Carrasquín (CQ), Mencia (MN) and Verdejo Negro (VN).

different varieties, see Table 6) and, therefore, it is more likely to be misclassified. On the other hand, MN is the only variety which has at least one variable in common with the others (Table 6). Sharing a variable with every variety makes easier for them to be included in a given category (poor reliability).

Concerning the confusion matrix for the Ri-ANN, it was clear that every week was mistaken with each other in a similar extent with the exception of weeks 1st and 3rd. This was easily explained if we notice that every variety share with each other just two variables: 1st and 2nd share #6 and #19, 2nd and 3rd share #6 and #9 and 1st and 3rd share #6 and #30. However, as shown in Table S4, variables #6 and #30 are the two with the most weight in their respective weeks.

So as to get more information, the possibility of identification of the grape variety through the FTIR spectrum of the leaves was evaluated. Since the chemical composition of the leaves was not expected to change with the fruit ripeness, results regarding this identification were expected to be poor. Mean spectra of the leaves of the five different vines are shown in Fig. 3. Similarly, to the statistical analysis of the grapes, leaves showed a high correlation degree (details in Table S5) with probabilities below 10^{-5} which allow discarding the null-hypothesis of not being correlated. As in the case of grapes, the spectral difference between two varieties yielded non-normal distributions according to the Kolmogorov-Smirnov test, so we performed again a Wilcoxon signed rank test. Every possible combination showed a p value below 10^{-3} with the exception of AN-VN ($p = 0.0569$), CQ-VN ($p = 0.7033$) and MN-VN ($p = 0.1400$). This implies that these pairs are very similar, without a statistically significant difference. With this information, poorer results than those obtained with the grapes were expected.

The results in Tables 7 and S6 collect the matches (percentage of leaves correctly classified) and reliability (percentage of the leaves classified into a variety, really belongs to that variety, 100-percentage of false positives) for the test dataset classification without considering the degree of maturity, as well as the area under ROC curve.

Finally, we wanted to check whether the leaves change enough during the maturation of the grape to obtain the ripeness degree of the fruit from the IR-spectrum of the leaf. We trained then a new ANN with the IR data obtained from the leaves (LeRi-ANN) whose results are shown in Tables 8 and S7.

No further studies on the LeGr-ANN and LeRi-ANN were performed due to the poor results obtained in the above experiments.

4. Conclusions

Despite being statistically similar, the FTIR spectra of the grape skin retain information enough to enable the identification of the grape variety using Artificial Neural Networks. ANN resulted to be a good choice for identifying the grape varieties involved in the *PDO Vino de Calidad* de Cangas production as well as the ripeness degree. The use of Olden's Connection Weight Algorithm allowed identifying the most influencing wavenumbers and chemical compounds, indicating that pectin was important for both identification of variety and the ripeness degree. As expected, fructose played an important role in the ripeness degree while polyphenols do not seem to affect the identification of the samples. Similar studies on the grape leaves did not yield relevant results because the chemical composition evolution of the studied plants was not as different as the one of the grapes in the collection time range.

Acknowledgements

Authors would like to acknowledge Beatriz Pérez-García and *Bodegas Vidas* wine cellar for providing the leaves and grapes for this study. We would like to acknowledge the Ministerio de Economía y Competitividad and European Regional Development Fund (MINECO/FEDER) by the financial support under the project MAT2015-66747-R.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.104922>.

References

- Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., 2006. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing, Oxford, England.
- Singleton, V.L., Essau, P., 1969. *Phenolic Substances in Grapes and Wine and Their Significance*. Academic Press, New York.
- Rodríguez-Montealegre, R., Romero-Peces, R., Chacón-Vozmediano, J.L., Martínez-Gascuña, J., García-Romero, E., 2006. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Compos. Anal.* 19, 687–693. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.05.003>.
- Broussaud, F., Cheynier, V., Asselin, C., Moutounet, M., 1999. Flavonoid compositional differences of grapes among site test plantings of Cabernet franc. *Am. J. Enology Vitic.* 50, 277–284.
- Szymanska-Chargot, M., Zdunek, A., 2013. Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process. *Food Biophys.* 8, 29–42. <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9279-7>.
- Da Luz, B.R., 2006. Attenuated total reflectance spectroscopy of plant leaves: a tool for ecological and botanical studies. *New Phytol.* 172, 305–318. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01823.x>.
- Arslan, F.N., Akin, G., Elmas, S.N.K., Yilmaz, I., Jannsen, H.G., Kenar, A., 2019. Rapid detection of authenticity and adulteration of cold pressed black cum seed oil: a comparative study of ATR-FTIR spectroscopy and synchronous fluorescence with multivariate data analysis. *Food Control* 98, 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.055>.
- Miaw, C.S.W., Sena, M.M., De Souza, S.V.C., Callao, M.P., Ruisánchez, I., 2018. Detection of adulterants in grape nectars by attenuated total reflectance Fourier-transform mid-infrared spectroscopy and multivariate classification strategies. *Food Chem.* 266, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.006>.
- Gambetta, J.M., Cozzolino, D., Bastian, S.E.P., Jeffery, D.W., 2019. Classification of chardonnay grapes according to geographical indication and quality grade using attenuated total reflectance mid-infrared spectroscopy. *Food Anal. Methods* 12 (1), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1355-2>.
- Kumar, K., Giehl, A., Patz, C.D., 2019. Chemometric assisted Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic analysis of fruit wine samples: optimizing the initialization and convergence criteria in the non-negative factor analysis algorithm for developing a robust classification model. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 209, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.10.024>.
- Fernández-González, A., Montejo-Bernardo, J.M., Rodríguez-Prieto, H., Castaño-Monllor, Z., Badía-Laiño, R., Díaz-García, M.E., 2014. Easy-to-use analytical approach based on ATR-FTIR and chemometrics to identify apple varieties under Protected Designation of Origin (PDO). *Comput. Electron. Agric.* 108, 166–172.
- Boletín Oficial del Principado de Asturias 287, 27173–27181, 2008.
- Commission delegated regulation (EU) No 664/2014, 2014. Official Journal of the European Union, L 179/17.
- Varmuza, K., Karlovits, M., Demuth, W., 2003. Spectral similarity versus structural similarity: infrared spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* 490, 313–324.
- Li, J., Hibbert, D.B., Fuller, S., Vaughn, G., 2006. A comparative study of point-to-point algorithms for matching spectra. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 82 (1–2), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.05.015>.
- Arana, I., Jarén, C., Arazuri, S., 2005. Maturity, variety and origin determination in white grapes (*Vitis vinifera* L.) using near infrared reflectance technology. *J. Near Infrared Spectrosc.* 13, 349–357. <https://doi.org/10.1255/jnirs.566>.
- Cozzolino, D., Cynkar, W., Shah, N., Smith, P., 2012. Varietal differentiation of grape juice based on the analysis of near- and mid-infrared spectral data. *Food Anal. Methods* 5, 381–387. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9249-6>.
- Olden, J.D., Joy, M.K., Death, R.G., 2004. An accurate comparison of methods for quantifying variable importance in artificial neural networks using simulated data. *Ecol. Model.* 178, 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2004.03.013>.
- Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Rooney, A., Hernández-Hierro, J.M., Heredia, F.J., Byrne, H.J., 2017. Linking ATR-FTIR and Raman features to phenolic extractability and other attributes in grape skin. *Talanta* 167, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.008>.
- Szymanska-Chargot, M., Zdunek, A., 2013. Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process. *Food Biophys.* 8, 29–42. <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9279-7>.
- Socrates, G., 2001. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, third ed. Wiley.
- Spectral database for organic compounds SDBS, https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi, compounds ID 2656 and 2695. Last accessed 22/03/2019.
- Heredia-Guerrero, J.A., Benítez, J.J., Domínguez, E., Bayer, I.S., Cingolani, R., Athanassiou, A., Heredia, A., 2014. Infrared and raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Front. Plant Sci.* 5 (305), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00305>.
- Medina-Plaza, C., de Saja, J.A., Fernández-Escudero, J.A., Barajas, E., Medrano, G., Rodríguez-Méndez, M.L., 2016. Array of biosensors for discrimination of grapes according to grape variety, vintage and ripeness. *Anal. Chim. Acta* 947, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.10.032>.
- Spectral Database for Organic Compounds SDBS, https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi (last accessed 5 april 2019).



Article

Synthesis and Characterization of Green Carbon Dots for Scavenging Radical Oxygen Species in Aqueous and Oil Samples

Clarissa Murru , Rosana Badía-Laiño and Marta Elena Díaz-García *

Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain; murrucarlissa@uniovi.es (C.M.); rbadia@uniovi.es (R.B.-L.)

* Correspondence: medg@uniovi.es

Received: 14 October 2020; Accepted: 16 November 2020; Published: 19 November 2020



Abstract: Carbon dots (CDs) due to their unique optical features, chemical stability and low environmental hazard are applied in different fields such as metal ion sensing, photo-catalysis, bio-imaging and tribology, among others. The aims of the present research were to obtain CDs from vegetable wastes (tea and grapes) as carbon sources and to explore their potential properties as radical scavengers. CDs from glutathione/citric acid (GCDs) were synthesized for comparison purposes. The CDs were investigated for their chemical structure, morphology, optical and electrical properties. The antioxidant activity has been explored by DPPH and Folin-Ciocalteu assays in aqueous media. Due to their solubility in oil, the CDs prepared from tea wastes and GCDs were assayed as antioxidants in a mineral oil lubricant by potentiometric determination of the peroxide value. CDs from tea wastes and GCDs exhibited good antioxidant properties both in aqueous and oil media. Possible mechanisms, such as C-addition to double bonds, H-abstraction and SOMO-CDs conduction band interaction, were proposed for the CDs radical scavenging activity. CDs from natural sources open new application pathways as antioxidant green additives.

Keywords: carbon dots; green synthesis; green antioxidants; luminescent nanoparticles; antioxidant activity; water and oil solubility

1. Introduction

The emergence of carbon dots (CDs) has attracted much attention due to their unique luminescent properties, their chemical stability, their low toxicity and low environmental hazard. A broad range of technological applications such as optical sensing [1], bioimaging [2], tribology [3] or photocatalysis [4], among others, have been extensively explored. Furthermore, due to their ability for scavenging reactive oxygen species, CDs demonstrate significant potential, particularly for biological applications [5–7]. CDs can be prepared from different natural resources such as albumin, chitosan, gelatin, peels of fruits, grains or other plant matters as well from vegetable wastes (e.g., apple or grape pomace), which make them “green” nanoparticles, as described in several excellent reviews devoted to the synthesis of CDs from green biomass wastes, their surface modification to improve their physico-chemical properties and their applications in bioimaging, biosensing, catalysis, forensics and optoelectronics [8–12]. The study of CDs as antioxidant nanoparticles is still in its infancy and some examples are exemplified in Table 1, in which it could be observed that most of precursors used to produce CDs with antioxidant properties are vegetal-based materials. Only a few of such CDs have been applied to real samples, particularly to in vitro evaluate cells viability and protection under oxidative stress. Besides, the method commonly used to prepare these CDs is the hydrothermal (HT) synthesis.

Table 1. Carbon dots with antioxidant properties, precursors and applications.

Carbon Precursor	Dopants	Synthesis Method	Methods	Application	EC50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Ref.
Garlic	-	HT 200 °C, 3 h Autoclave	DPPH Fenton	-	80	[13]
Coriander leaves	-	HT 240 °C, 4 h	DPPH	-	15	[14]
Coconut husk	-	HT 200 °C, 3 h. Autoclave	DPPH	-	60	[15]
Coconut shell	-	HT 200 °C, 3 h Autoclave	DPPH	-	25	[16]
Selenocystine	-	HT 60 °C, 24 h	ESRS DEMPO	MDA-MB-231 cells viability	-	[17]
BSA	Ce(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	Bio-mineralization pH 12, 55 °C, 8 h	Methyl Violet	VSMC and 7721 cells viability	-	[18]
Tea waste	Ethylene-diamine	HT 150 °C	Fenton Pyrogallol	-	80 (hydroxyl radical), 24.2 (superoxide radical)	[19]
1,4-phenylene-diamine	Phosphoric acid + Mn(OAc) ₂	HT 220 °C, 10 min Microwave	DPPH Fenton NBT enzymatic	B15F1, HeLa and HEL cells viability	6.55 (DPPH) 6.44 (*OH) 4.30 (O ₂ ^{•-})	[20]
Phloroglucinol + phenol	-	HT 260 °C, 5 h Autoclave	Fenton	rADSC cells viability	-	[21]
Citric acid	Mercapto-ethylamine + sodium selenite	HT 150 °C, 2.5 h	DPPH Fenton DTNB	-	-	[7]
Cumin seeds	-	HT 250 °C, 6 h Autoclave	DPPH	-	1.2	[22]
<i>Thymus vulgaris</i> L. essential oil	-	HT 200 °C, 15 h Autoclave	DPPH	-	23.43	[23]
Lutein	Ethylene-diamine	HT 140 °C, 12 h Autoclave	DPPH ROSUP DCFH-DA	NCI-H1299 cells viability	-	[24]
EDTA	Ce(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O Pr(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	HT 200 °C, 8 h	Fenton ESRS	MEF and PATU 8988 cells viability	-	[25]

DEMPO = 5,5'-dimethylpyrroline N-oxide; DCFH-DA = 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DPPH = 1,1-Diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine; DTNB = 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; ESRS = Electron Spin Resonance Spectrometry; HT= hydrothermal NBT = nitro blue tetrazolium; ROSUP = (ROS reagent, as a positive control for ROS level for cells).

Research efforts have yet to be made to utilize such scavenging ability in other fields such as food industry (e.g., packing films), cosmetics, pharmacy, industry and lubrication. In the particular case of oil lubricants (mineral, synthetic or vegetal-based), one of the degradation processes common to them is their reaction with atmospheric oxygen, not only during their fabrication or storage but particularly during use. Once the lube is oxidized, the quality requirements are no longer met, which results in economic and energy losses as well as possible machinery failure owing to an increase of friction and wear between the moving surfaces. Eco-friendly additives are being developed to improve the

low oxidative stability of lubes, particularly of biodegradable vegetal-based lubricants due to their unsaturated fatty acid composition [26].

The aim of the present work was to develop CDs using vegetable wastes (tea and grape pomaces) as carbon source and glutathione/citric acid as comparative CDs model. The CDs were systematically investigated in detail over their morphology, spectroscopic properties and electronic properties. Besides, their antioxidant activity has been explored by DPPH and Folin-Coicelteau assays in aqueous media. The solubility of these CDs in oily media was explained by the presence of reverse micelles and, as proof of the concept, the CDs prepared from tea wastes were assayed as green antioxidant additives in a mineral base oil, for the first time. Results showed that the CDs from tea wastes have good antioxidant properties in oil media when compared with CDs from grape pomace. The possible radical scavenging activity mechanisms were outlined for both aqueous and oil media. These results, along with the unique optical properties of CDs, excellent photostability, low toxicity and environmental friendliness [27] may open a way for designing new luminescent CDs with improved antioxidant properties for biomedical, bioimaging, chemical and industrial applications.

2. Materials and Instrumentation

2.1. Chemicals

The base oil (ISO-68) employed in this study was kindly supplied by REPSOL (Madrid, Spain). Tea leaves were purchased from local markets. Glutathione, citric acid, gallic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH reagent), chloroform, glacial acetic acid, potassium iodide and sodium thiosulfate were obtained from Sigma-Aldrich Co. (Barcelona, Spain). Folin-Ciocalteu's phenol reagent was purchased from Merck (Madrid, Spain). The grape pomace was supplied by the Bodegas Vidas winery (Cangas de Narcea, Asturias, Spain). Green tea bags of the brand Hacendado were obtained from a local supermarket (Mercadona). Deionized Millipore water (MQW) was used throughout the experimental work.

2.2. Instrumentation

Carbon dots samples were characterized using UV-visible spectroscopy with a Lambda 900 UV/VIS/NIR spectrophotometer (Perkin Elmer Spain, Madrid, Spain). Photoluminescence emission spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter from Agilent Technologies (Las Rozas, Madrid, Spain), equipped with a xenon flash lamp. Absorption and photoluminescence spectra were registered using 1-cm quartz cells. Luminescence quantum yields (QY) were measured directly by absolute measurement system on a FS5 fluorometer (Edinburgh Instruments, Livingston, UK) equipped with an integrating sphere module and the calculation was performed by the instrument's FluOracle[®] software. Morphological details and size determination of CDs were determined by using a High Resolution Transmission Electron Microscope (JEM-2100F, 200 kV, JEOL, Fresing, Germany). The average diameter and the standard deviation were determined from digitalized images using a ImageJ Tool software. Attenuated total reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) spectra were collected on a Varian 670-IR spectrometer (Varian, Madrid, Spain) equipped with a Golden Gate ATR device. The spectra were scanned between 600 and 4000 cm^{-1} . The spectral resolution was 4 cm^{-1} at 2000 cm^{-1} as the average of 32 scans. Background was collected with the ATR crystal exposed to air.

2.3. Synthesis of Carbon Dots

2.3.1. Glutathione/Citric Acid CDs

Glutathione-based CDs (GCDs) were synthesized by a hydrothermal method as described by Díaz-Faez et al. [28] with some modifications: 1 g of glutathione and 1 g of citric acid were thoroughly mixed in a silica crucible and then 10 mL of MQW were added to form a clear solution that was

then heated in an oven for 5 h at 180 °C. During the heating process, several aliquots of MQW (1 mL water every 30 min) were added to avoid the product to scorch. Once cooled at room temperature an orange-brownish gel was obtained which was then dissolved in 10 mL MQW. The obtained CDs were purified by dialysis using a tube membrane (MWCO, 3.5 kDa) against MQW during 24 h. The dialyzed solution was freeze-dried by a vacuum freeze dryer. Finally, the glutathione-based CDs obtained were stored at 2 °C for further use. The synthesis yield resulted to be 5.4%. Stock dispersions in Milli-Q water containing 0.54 mg mL⁻¹ were prepared for further characterization and use. Citric acid/glutathione based CDs were taken as reference CDs along this work for two reasons: i) the presence of N and S heteroatoms (provided by glutathione) that improve their photoluminescence properties (e.g., high quantum yield) [28,29] and ii) due to the GCDs demonstrated antioxidant activity [30]. The synthesis was performed in triplicate.

2.3.2. Tea Waste-Based CDs

The tea-based CDs were synthesized by a carbonization method using the waste green tea leaves as a carbon source. After preparing green tea infusions, the contents of three bags were air dried at room temperature and then grounded into a fine powder. Two g of ground tea powder was transferred into a Teflon beaker and heated at 200 °C for 6 h in an oven. Once cooled at room temperature, the black powder obtained was dispersed in MQW and gently stirred overnight. The mixture was filtered through 100 µm filter paper and centrifuged at 12,000 rpm to remove larger particles. The supernatant liquid was filtered by a 0.22 µm microfiltration membrane and the solution was purified by dialysis using a tube membrane (MWCO, 3.5 kDa) against MQW during 24 h. Finally, the concentrated solution was freeze-dried by a vacuum freeze-dryer. The obtained CDs are hereafter named as TCDs and were stored at 2 °C until further use. The synthesis yield resulted to be 5%. Stock dispersions in Milli-Q water containing 0.52 mg·mL⁻¹ were prepared for further characterization and use. The synthesis was done in triplicate.

2.3.3. Grape Pomace-Based CDs

For the synthesis of CDs from grape pomace, two different routes were addressed. In the first case (hydrothermal-assisted process), 2 g of grape pomace were added to 20 mL of 1 M NaOH solution. The mixture was transferred into a 50 mL Teflon-lined stainless-steel autoclave and heated to 180 °C for 4 h in an oven. Once the mixture was cooled at room temperature, the reaction product was centrifuged at 5000 rpm for 15 min to remove any precipitate. The supernatant was dialyzed against MQW through a dialysis bag for 4 days. Finally, the purified solution was freeze-dried and the CDs (named as P1CDs) stored until further use. The synthesis yield resulted to be 6%. In the second process (open vessel) 2 g pomace were transferred into Teflon beaker and heated at 180 °C for 4 h in an oven. Every 30 min 1 mL MQW was added to avoid complete carbonization. The reaction product was suspended in MQW, centrifuged and dialyzed as described above. The solution was freeze-dried and the CDs (named as P2CDs) stored at 2 °C until further use. The synthesis yield resulted to be 2.5%. Stock dispersions in Milli-Q water of P1CDs 0.56 mg mL⁻¹ and P2CDs 0.58 mg mL⁻¹ were prepared for further characterization and use. The syntheses were performed in triplicate.

2.4. Measurement of Total Reducing Capacity: Folin-Ciocalteu Procedure

The Folin-Ciocalteu (FC) method, known also as the total phenolic assay, provides the reducing capacity of a material and it is usually expressed as phenolic content. External calibration was done using different concentrations of gallic acid. In brief, 250 µL of working dispersions of the different CDs were mixed with 100 µL of FC reagent (mixture of phosphotungstic acid, H₃PW₁₂O₄₀ and phosphomolybdic acid, H₃PMo₁₂O₄₀), 250 µL Na₂CO₃ 7.5% w/v and MQW up to a final volume of 10 mL. The mixture was gently mixed and after 30 min reaction at room temperature in the dark, absorbance was measured at 765 nm against a reagent blank. Measurements were carried out in

triplicate and data presented as the average. The reducing capacity was calculated as mg of gallic acid equivalents per mL by using a gallic acid calibration curve.

2.5. DPPH Free Radical Scavenging Assay

The DPPH free radical scavenging assay was carried out according to the following protocol: 1 mL of ethanolic solution of DPPH (100 μ M) was added to a given volume of the different CDs dispersions. The mixture was shaken and after standing for 30 min in the dark, the absorbance at 517 nm was measured to determine the concentration of the remaining free DPPH \bullet radical. All tests were performed in triplicate and MQW was used as a blank control. The scavenging efficiency of the three kinds of CDs for DPPH \bullet was calculated using the Equation (1):

$$\text{DPPH inhibition \%} = [(A_c - A_s) \times 100 / A_c] \quad (1)$$

where A_c is the absorbance of the control and A_s is the absorbance of the sample.

2.6. Determination of the Lubricant Oil Peroxide Value

The peroxide value (PV) is a measure of the degree of peroxidation and allows to determine the amount of total peroxides which oxidizes potassium iodide. The iodine released by the peroxides is then volumetrically determined by a standard solution of sodium thiosulfate and the equivalence point determined potentiometrically using a combined Pt (sensing ring) and Ag/AgCl 3 M KCl, 3M KNO₃ reference electrode. A pH/ion-meter GLP 22 (Hach Lange Spain, S.L.U., Barcelona, Spain) with an accuracy ± 0.2 mV was used for redox potential measurements. The thiosulfate solution was added using a micropipette. The PV in presence of CDs as antioxidant additives was performed according the following procedure: three oil samples were prepared, two containing 0.25% *w/v* of carbon dots (GCDs or TCDs) and one without CDs was used as blank. The samples were heated during 15 days with moderate stirring under oxygen atmosphere and raising the temperature to 75 $^{\circ}$ C to allow a slow formation of reactive chemical species. To evaluate the PV, 10 g of each sample were weighed and dissolved in 50 mL of a mixture of Cl₃CH/glacial acetic acid (3:2 *v/v*). Then, 0.5 mL of saturated solution of KI aqueous solution was added. The mixture was gently stirred up to the finish of the analysis. The Pt-Ag/AgCl combined electrode was immersed into the two-phase system and stable redox-potentials were measured after each addition of 0.005M sodium thiosulfate. Similar operations were performed for the blank solution. The PV was calculated using Equation (2):

$$PV = \frac{(V - V_0) \times C_t \times F \times 1000}{m} \quad (2)$$

where V and V_0 are the volumes of the sodium thiosulfate standard solution additions to the analyzed lubricant oil sample and to the blank, respectively. F is the correction factor of the sodium thiosulfate solution. C_t is the molar concentration of the standard solution of sodium thiosulfate and m is the weight (g) of the lubricant oil sample.

3. Results and Discussion

3.1. Morphological Characterization

All the as-prepared CDs were highly water soluble as well as in ethanol. The particle size and morphology of the CDs were characterized by HRTEM. As can be seen in Figure 1a the GCDs are mostly monodispersed with an average diameter size of 6 ± 0.8 nm, while TCDs are smaller with an average diameter size of 3.5 ± 0.6 nm (Figure 1b). Also the inset HRTEM image in Figure 1b clearly shows the presence of both an amorphous phase and a crystalline graphite phase with a lattice spacing of 0.19 nm, that closely matches with that of in-plane lattice spacing (010) of graphene ($d_{100} = 0.213$ nm) [31,32] and points out the crystallinity of these TCDs. The P1CDs (Figure 1c) and P2CDs (Figure S1) are

also monodisperse with particle diameters between 3 and 5 nm, with an average size of 4 ± 0.8 nm (Figure 1c).

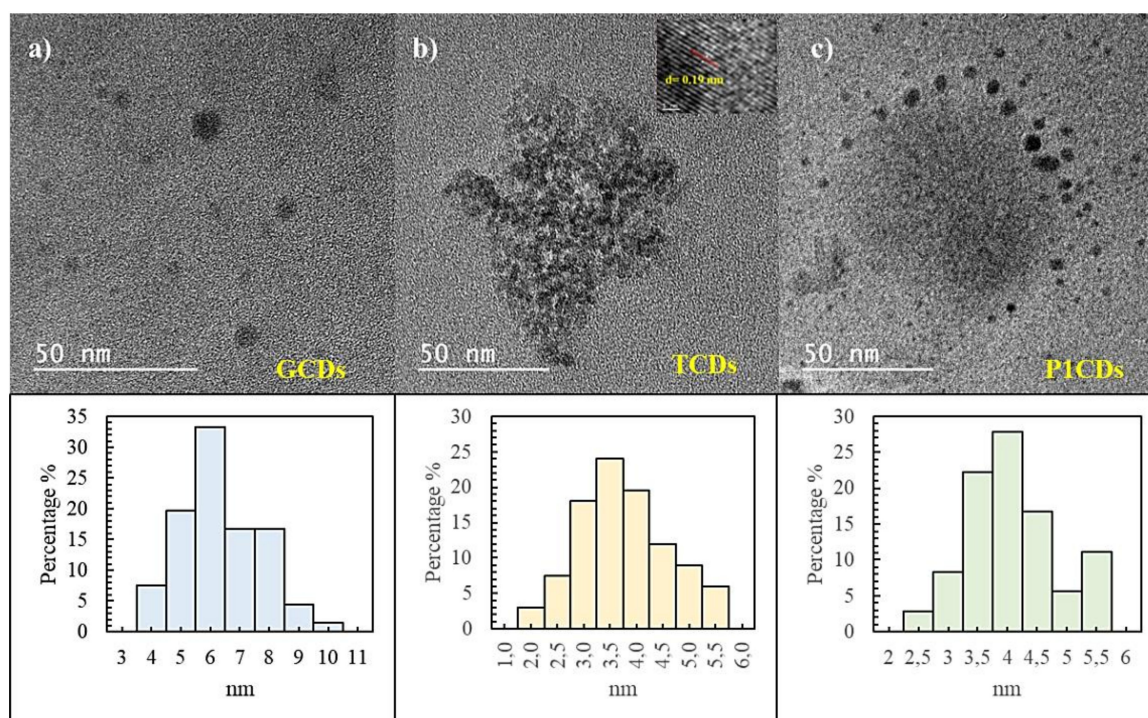


Figure 1. HR-TEM images of (a) GCDs, (b) TCDs and (c) PICDs samples and their corresponding size distribution histograms; $n = 118$ TCDs, $n = 106$ GCDs, $n = 144$ PICDs.

3.2. Characterization of Functional Groups

The chemical structure of the CDs was also characterized by ATR-FTIR analysis. The broad bands at $3150\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ in all CDs samples were ascribed to -OH stretching and N-H bonds stretching (Figure 2). In the case of GCDs the transitions displayed at 1700 , 1165 and 1070 cm^{-1} were assigned to ester COO^- vibrations. Also, other groups were identified: amide (-ONH-, 1652 cm^{-1}), carbonyl ($\text{C}=\text{O}$, 1695 and 1322 cm^{-1}), amine (combination of C-N stretching band and N-H bending at 1540 cm^{-1}), CH_3 out of plane bending (1390 cm^{-1}) and stretching vibration bands due to S-H and C-S bonds at 2530 cm^{-1} and 771 cm^{-1} , respectively.

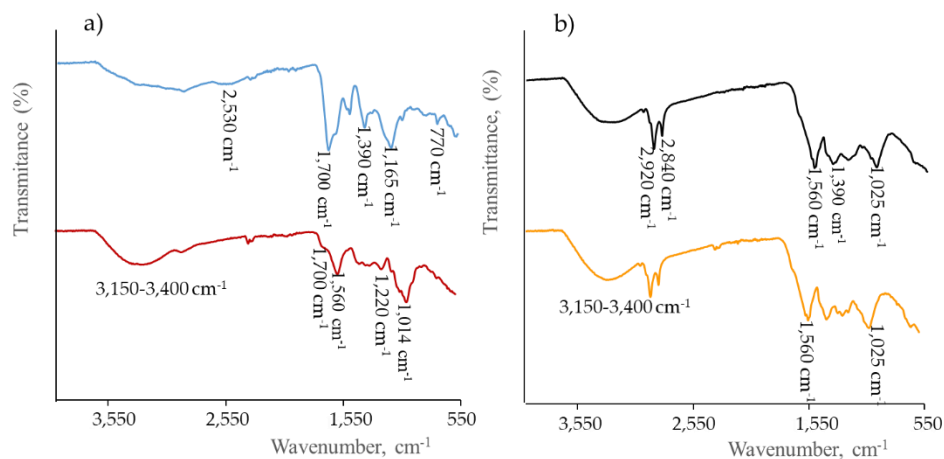


Figure 2. FTIR spectra comparison of: (a) GCDs (—) and TCDs (—); (b) PICDs (—) and P2CDs (—).

P1CDs and P2CDs spectra show a broad peak from 3600 cm^{-1} to 3200 cm^{-1} which relates to the O-H and N-H bonds stretching present in lignocellulose components of the grape pomace [33]. The peaks around 2840 cm^{-1} and 2920 cm^{-1} , also observed in the TCDs spectra, were attributed to symmetric and asymmetric stretching of C-H bonds in methyl and methylene groups. The band at 1560 cm^{-1} attributed to aromatic C=C vibrations was also observed in both P1CDs and P2CDs spectra, as well as the band at 1390 cm^{-1} due to CH_3 out of plane bending attributed to polysaccharide structure. The band at 1220 cm^{-1} was assigned to alkyl aryl ethers ($-\text{OCH}_3$) and the band at 1025 cm^{-1} was attributed to vibrations of C-6 of cellulose [34]. In the case of TCDs, the peak at 1600 cm^{-1} was ascribed to the vibration of the amide I (N-H bending), the peak at 1014 cm^{-1} to C-O groups in polysaccharides and the peak at 1700 cm^{-1} to simple ketones and carboxylic groups. It is worth mentioning that some of these bands, due to the composition of the starting materials to prepare the CDs, may be overlapped by the bands of graphene/graphite generated during their synthesis. For example, for graphene oxide the IR strong broad-band centered at $\sim 3430\text{ cm}^{-1}$ has been assigned O-H stretching vibrations, the peaks around 2925 and 2845 cm^{-1} attributed to sp^2 and sp^3 C-H stretching bands, the peak at 1620 cm^{-1} assigned to the aromatic C=C stretching, that at about 1400 cm^{-1} to the O-H deformation and the 1260 cm^{-1} peak to C-OH stretching [35,36].

3.3. Spectrophotometric and Luminescent Optical Properties

The study of the optical properties of the CDs was carried out in detail. In Figure 3, the UV-Vis absorption spectrum of GCDs shows a typical absorption band at 347 nm ascribed to $n-\pi^*$ transitions (C=O bonds) and a shoulder around 240 nm attributed to $\pi-\pi^*$ transitions (C-C bonds with sp^2 hybridization). This spectrum differs from those of the other CDs for which the peak at about 350 nm was not observed. However, compared with that of GCDs, a slight red shifting was observed for the 240 nm absorption shoulder: to 258 nm in P1CDs, to 265 nm in TCDs and to 275 nm in P2CDs, which may indicate that this band, or in turn, the relative amount of sp^2 C, are affected by the chemical composition of the CDs.

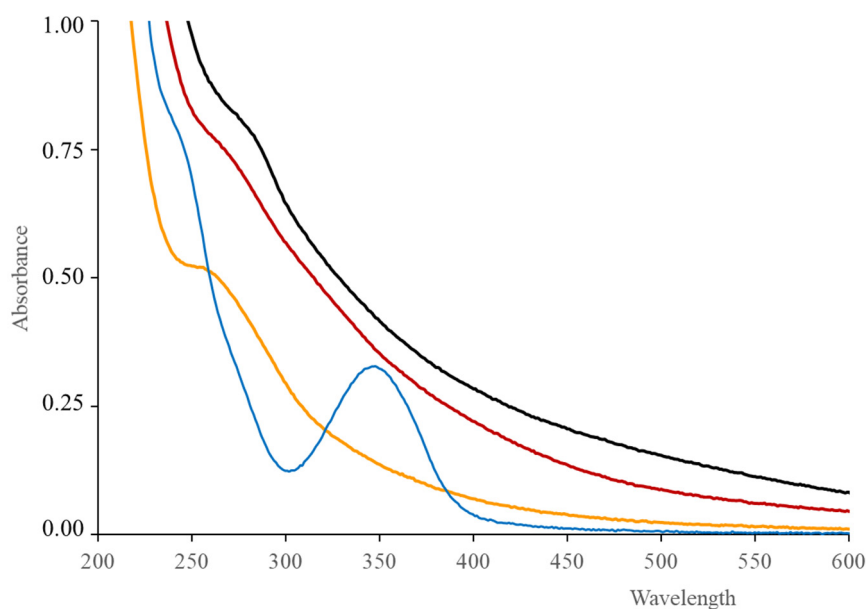


Figure 3. Optical absorption spectra of GCDs (—), TCDs (—), P1CDs (—) and P2CDs (—) in aqueous solution.

From the analysis of the absorption spectra, the bandgap (E_g) for the different CDs was estimated using the Tauc's law for direct transitions [37] (Equation (3)):

$$(\alpha h\nu)^2 = k (h\nu - E_g) \quad (3)$$

where α is the absorption coefficient, $h\nu$ the energy of the incident light and k is a constant. E_g was estimated from the graphical representation of $(\alpha h\nu)^2$ vs $h\nu$ by extrapolating the straight line to $(\alpha h\nu)^2 = 0$ (Figure 4). The E_g values are recorded in Table 2.

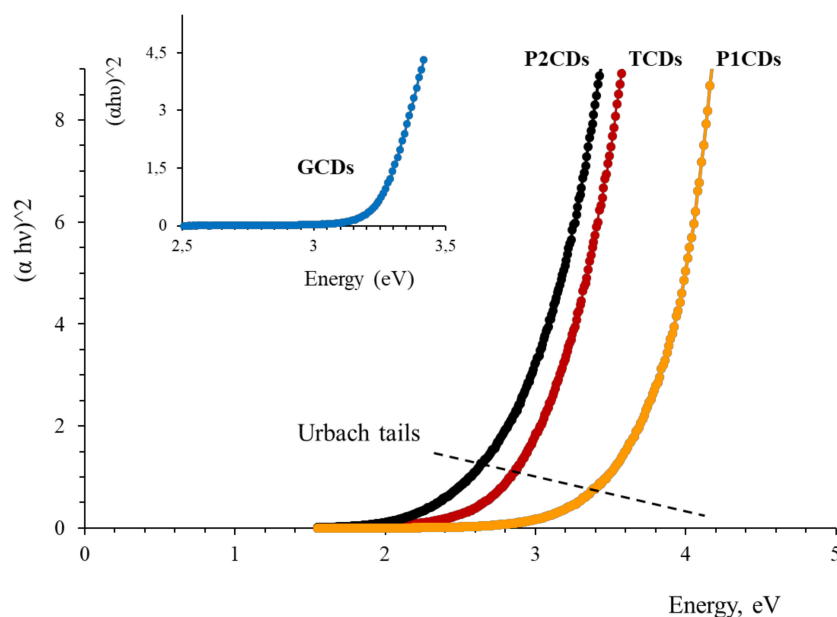


Figure 4. Tauc plots for estimation of the CDs bandgap.

The absorption edge of the CDs was not abrupt and an exponential zone, called Urbach tail, can be observed below the optical bandgap (Figure 4). These tails have been ascribed, to disorders, defects and thermal vibrations in the lattice of the material [38,39]. Urbach tails are associated with absorption bands of localized electronic centers in semiconductor crystals. The absorption coefficient near the band edge depends in an exponential manner on the photon energy and obeys the Equation (4):

$$\alpha(h\nu) = \alpha_0 \exp (h\nu/E_u) \quad (4)$$

where α_0 is a constant and E_u is the Urbach energy (see Supplementary Material). The value of E_u can be estimated by taking the reciprocal of the slopes of the linear segment in the lower photon energy region of the $\ln(\alpha)$ vs $h\nu$ curve. With the aim to evaluate the structural quality of the synthesized CDs, E_u were estimated using the above relation (Figures S2–S5). Results are collected in Table 2. The small value of E_u for GCDs indicates that these nanoparticles exhibit a nanostructure with less defects than the rest. TCDs, with the highest E_u , may have a nanostructure more amorphous and richer in defects.

3.4. Luminescence Properties

In Figure S6 the excitation and emission spectra of the synthesized CDs are shown. GCDs exhibit an intense emission band centered at 418 nm upon excitation at 350 nm. Taking the photoluminescence spectra of GCDs as reference, we can observe that while the maximum excitation wavelength of P1CDs remained at ca. 350 nm the maximum emission slightly shifted to 432 nm for P1CDs. In Table 2 the spectral characteristics of all the synthesized CDs and the spectral shifts respect to the GCDs are collected. Fluorescence spectra of TCDs and P2CDs are shown in Figure S6. Also, in comparison with the spectral characteristics of GCDs, the maximum excitation of P2CDs shifted to the blue

(318 nm) and the maximum emission wavelength was at 440 nm with a very weak fluorescence intensity. The synthesis procedure of P2CDs must be behind the poor photoluminescent behaviour of these nanoparticles, as proposed in different works [40,41]. Begheri et al. [42] have suggested that during the thermal treatment, along with CDs more carbonized carbon particles (MCCPs) may also be formed as a major by-product, which have quenching effects on the photoluminescence of the CDs. The full width at half maximum (FWHM) of the emission band was used to evaluate both the homogeneity of the CDs [43] and the synthesis reproducibility. So, the fluorescence emission band of GCDs with its maximum intensity at 418 nm presented a FWHM of (126 ± 4.5) nm. In the case of TCDs, the maximum emission wavelength appeared at 430 nm and the band has a FWHM of (116 ± 5.4) nm and, finally, the emission band of P1CDs was accompanied by a broader FWHM of (157 ± 8) nm and an emission maximum at 423 nm. The low standard deviations observed in the FWHM indicate a high reproducibility of the corresponding synthesis.

Table 2. Optical and electronic properties of the CDs.

Carbon Dots	Bandgap, eV	Urbach Energy, meV	λ_{exc} , nm	λ_{em} , nm	$\Delta\lambda$, nm	QY, %
GCDs	3.25	337	350	418	-	55.7
TCDs	3.50	626	350	430	$\Delta\lambda_{em} = 22$	4.50
P1CDs	3.90	583	350	423	$\Delta\lambda_{em} = 5$	2.76
P2CDs	3.10	486	318	440	$\Delta\lambda_{ex} = 32$ $\Delta\lambda_{em} = 10$	0.65

The quantum yield (QY) value is a measure of the quality of the synthesized CDs. The absolute QY of all CDs fabricated are collected in Table 2. The highest QY is observed for GCDs while those of the rest of CDs are clearly lower. These findings correlate to the presence of the C=O, C-OH and nitrogen groups in TCDs, P1CDs and P2CDs (see FTIR analysis) which introduce surface and/or core traps, formation of dangling bonds and increased structural disorder (increase in E_u energies), all of which may reduce the probability of radiative transitions (low QYs). Besides, the low QY for the P2CDs compared with that of P1CDs could be explained by higher amounts of -COOH groups at the edge of sp^2 -conjugated π -domains of P2CDs, owing to their synthesis was performed in the absence of NaOH. The reduction of -COOH groups (and their conversion to -COONa) resulted in a reduction of non-radiative electronic transitions which, in turn, enhanced the quantum yield [44]. On the other hand, the glutathione precursor used to create the GCDs introduced nitrogen and sulphur groups (see FTIR spectra in Figure 2), thus acting as an effective surface passivating agent [45]: the amount of disorder could be reduced (low band tail structural disorder E_u), S-H and C-S bonding defect states in the band gap were created and radiative transitions significantly increased [46], thus GCDs exhibiting a comparatively high QY.

3.5. pH Surface States Influence on Luminescence Properties

In order to investigate the surface state effects (functional groups, particularly amine and carboxylic) on the photoluminescence properties of the CDs, the luminescence spectra were recorded within the pH range 1 to 12, using different buffer solutions: pH 2–4: (0.1 M glycine in 0.1M NaCl) + (0.1 M HCl). pH 5–8: 0.1 M KH_2PO_3 + (0.1 M Na_2HPO_3) and pH 8–12: (0.1 M glycine in 0.1 M NaCl) + (0.1 M NaOH). The final ionic strength of the measured solutions ranged from 0.32 to 0.36 M, so that its contribution to the photoluminescence of the CDs was expected to be marginal. Taking P1CDs as an example, Figure 5 shows that the fluorescence intensity did not show any significant change as the pH changed from 4 to 8 and then it decreased sharply from pH 8 to pH 12. A similar behavior has been observed for the rest of CDs. Below pH 4, the amino groups on the surface were easily protonated [47] and a slight decrease of the P1CDs emission was observed. At pH > 8, deprotonation of surface groups (amino N, C=O) was responsible for the decrease of the emission intensity. These observations indicated the fluorescence intensity depended on the surface state of the CDs. In the near/neutral pH

range, the emission was practically constant, probably due to isoelectric situation among the surface groups. Furthermore, it was observed that the position of the emission peak centered at 423 nm did not change with the pH change. In the particular case of GCDs, the influence of pH was similar to that observed in our previous work [28]: within pH 3–8 the GCDs fluorescence smoothly increased and then decreased drastically as result of ionization of the functional groups present on the GCDs.

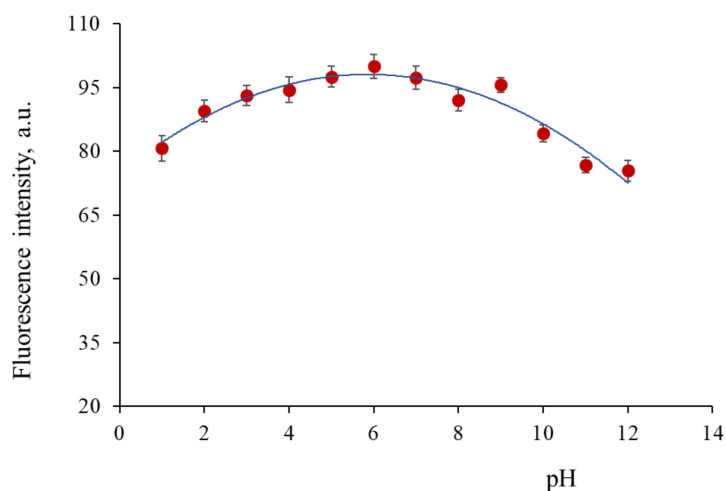


Figure 5. Fluorescence intensity changes upon pH variation in P1CDs.

3.6. Spectrophotometric Study of Antioxidant Activity

The Folin-Ciocalteu assay measures the total antioxidant capacity expressed as total phenolic content (TPC), although it does not necessarily reflect the total amount of phenols. The Folin-Ciocalteu method is a colorimetric electron transfer assay in which the redox reactions can take place not only with phenolic compounds but also with other compounds like reducing sugars or ascorbic acid [48]. The TPC of the different CDs was expressed as gallic acid equivalent (GAE), i.e., mg gallic acid mL⁻¹, and results showed that P2CDs had the highest antioxidant capacity (0.17 mg mL⁻¹ GAE), followed by TCDs (0.12 mg·mL⁻¹) which may due to the high content of phenolic compounds (phenolic acids, flavan-3-ols, flavonols) present in the precursor materials. On the contrary GCDs and P1CDs were the samples with the lowest antioxidant capacity with 0.03 and 0.02 mg mL⁻¹ GAE, respectively. The antioxidant activity was measured using the DPPH radical scavenging colorimetric assay based on the radical scavenging activity of antioxidants against the stable DPPH• radical in methanol. When the free radical DPPH• is reduced to hydrazine (a stable diamagnetic molecule) a color change is observed from purple (DPPH• absorption at 517 nm) to yellow (hydrazine). The percentage scavenging effect of DPPH• versus concentration of CDs were plotted in Figure 6. It was found that the DPPH activity of CDs was dose dependent. At 375 µg·mL⁻¹ CDs concentration, the DPPH radical scavenging activity of TCDs, GCDs and P1CDs resulted to be 75%, 56% and 46%, respectively. The trend observed for P2CDs was different: there was an increase of the DPPH activity up to a concentration of 180 µg·mL⁻¹ (62 %) and then slowly decreased to 49% at a concentration of 500 µg·mL⁻¹.

The correlation of TPC with antioxidant activity showed that TCDs and P2CDs with a high TPC had also a high DPPH radical scavenging activity in comparison with P1CDs with the lowest TPC. On the other hand, the average effective scavenger concentration (EC₅₀) measurement was calculated in order to recognize the necessary amount of CDs to reduce 50% of the initial DPPH. The EC₅₀ values were taken in the range of linear relationship between CDs concentration and DPPH inhibition percentage in order to avoid errors associated to the plateau or decreasing regions. The EC₅₀ values obtained were 50 µg·mL⁻¹ for TCDs, 75 µg·mL⁻¹ for P2CDs, 175 µg·mL⁻¹ for GCDs while P1CDs barely reached a 45% inhibition. These results clearly indicated that TCDs have a greater antioxidant activity than the pomace derived CDs or the GCDs.

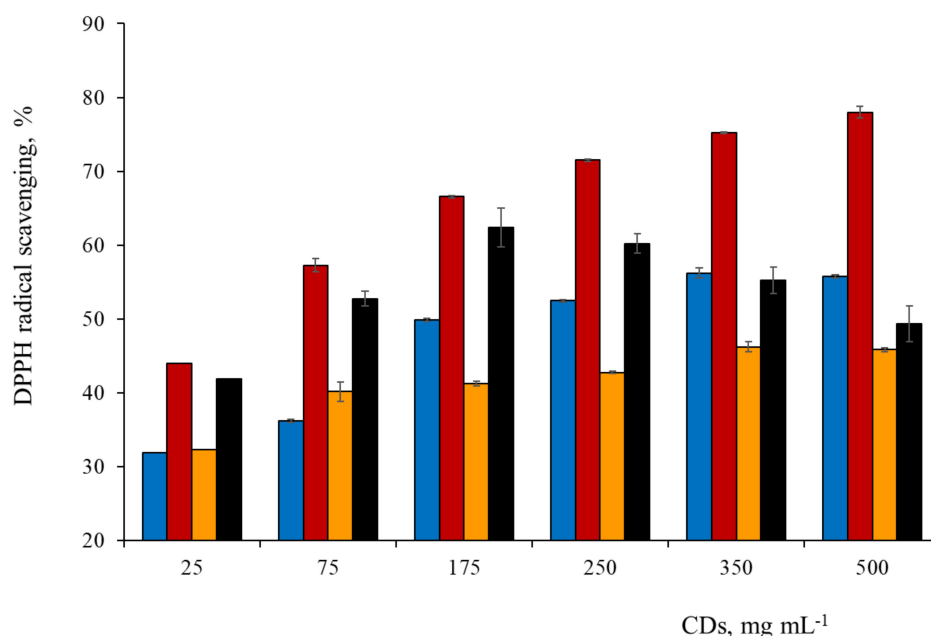


Figure 6. Antioxidant activity of the CDs at different concentrations: TCDs (■), GCDs (■), P1CDs (■) and P2CDs (■).

Although there is scarce information about antioxidant activity of CDs obtained from crop wastes, the EC_{50} values of TCDs and P2CDs compare favorably with those for CDs obtained from coconut wastes and those of essential oils with antioxidant capacity. (see Table 3) using the DPPH assay. Pure ascorbic acid and vitamin E have the lowest EC_{50} values.

Table 3. Comparison of EC_{50} values (DPPH assay) for the CDs studied with those of some reported materials.

Antioxidant Material	Synthesis Method	EC_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$	Ref.
Coconut husk-CDs	HT 200 °C, 3 h. Autoclave	60	[15]
Coconut Shell-CDs	HT 200 °C, 3 h Autoclave	25	[16]
Ascorbic acid	Pure compound	15.0	[49]
Vitamin E	Pure compound	13.58	[50]
HcEd *	Methanol extraction	16.7	[51]
Essential oil of <i>Teucrium orientale subsp. taylori</i>	Hydrodistillation extraction	121.60	[52]
Ginger essential oil	Hydrodistillation extraction	11,680	[53]
TCDs	HT 200 °C, 6 h Oven	50	
P2CDs	HT 180 °C, 4 h Oven	75	This work
GCDs	HT 180 °C, 5 h Oven	175	

* Essential oil extracted in methanol from *Hyptis crenata* Pohl ex Bentham.

Considering all the results together, a possible mechanism for the DPPH• reduction by the CDs could be based on the DPPH• quenching by hydrogen atom transfer from the carboxyl, hydroxyl and/or amino groups as described in Figure 7 for TCDs, P1CDs and P2CDs. In the case of GCDs, the presence of –SH groups also has to be considered. DPPH• is reduced to DPPH-H by taking up a

H^\bullet donated by any of the surface groups and the resultant unpaired electrons in CDs may be then delocalized by resonance within their aromatic domains or by rearrangement of chemical bonds.

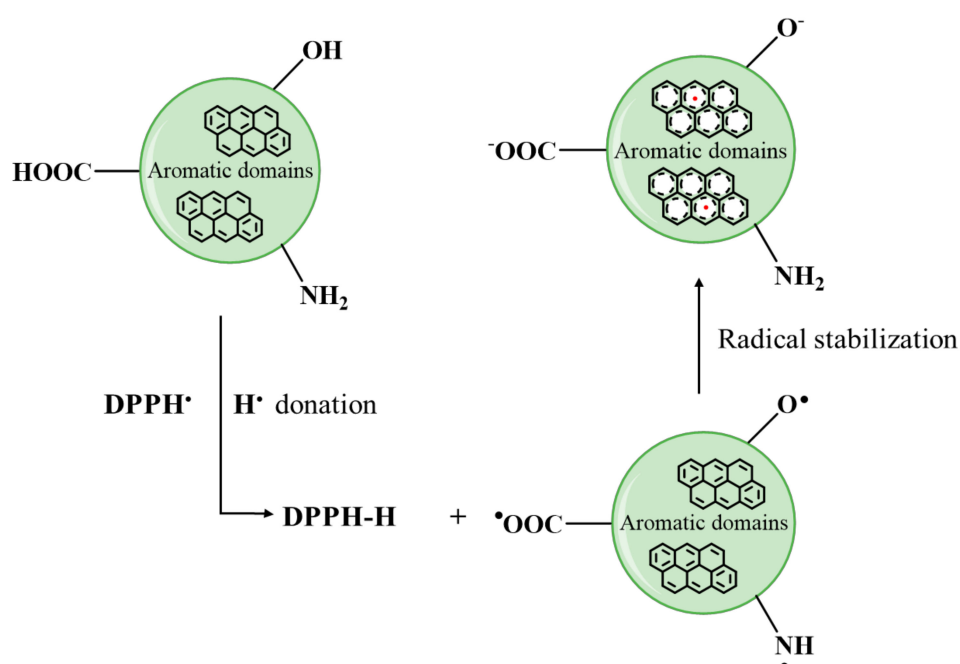


Figure 7. Mechanism of DPPH• reduction by antioxidant CDs in aqueous media.

3.7. Application of Carbon Dots as Antioxidant Additives in Non-Aqueous Media

Mineral oils are the most commonly used lubricants in industry and they differ from each other depending on the source of crude oil and the refining process. The fundamental differences between mineral oils are based on their chemical composition, sulfur content and viscosity. The inevitable oxidation of oils during their use results in undesirable increases in friction and wear, energy dissipation as heat and loss of efficiency in the mechanical system in which the lubricant oil is used. The oxidation of hydrocarbon oils is a radical chain reaction that may be initiated by the presence of oxygen, moisture, heat and metals that may accelerate the breakdown process [54]. During the oxidation process, hydroperoxide radicals are formed, and over the years different methods have been developed to determine the degree of oil oxidation. In particular, the peroxide value (PV) is one of the primary indicators used to assess the hydroperoxides formation and several methods are available to determine it. As a proof of the concept, and taking the advantage of the solubility of the as-synthesized CDs in oil, in this work TCDs and GCDs were assayed as possible antioxidant (radical scavengers) lubricant additives in the base oil ISO 68 (see properties in Table S1). In this work, PV was measured by the iodometric titration method with potentiometric measurement of the end-point as described in the Experimental Section. According the ISO official method [55] the sample size has to be adequately taken: for samples that are expected to have an amount of peroxide between 1 and 30 mEqO₂.Kg⁻¹ a weigh of 5 g with an approximation of 0.1 mg is recommended, while for samples that have a quantity less than 1 mEqO₂.Kg⁻¹ a weight of 10 g with an approximation of 0.1 mg should be taken. Results were plotted in Figure 8 and it can be observed that the most significant changes in the PV occur during the first days of the experiment.

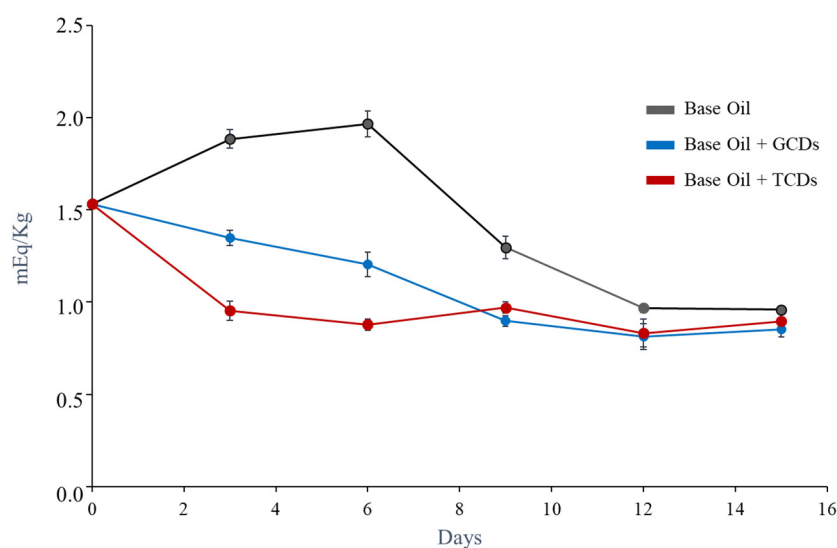


Figure 8. Study of the aging of lubricating oil samples with and without CDs additives.

In absence of CDs an increase of the PV took place within the six first days due to the oil oxidation and then a sudden decrease was observed due probably to termination of the free radical chain reactions. The samples containing CDs showed more oxidative stability, being those containing TCDs the more stable since the first two hours. TCDs and GCDs offer potential as antioxidant additives in lubricant oils. Besides, due to the increasing concern over the environmental issues, the use of environmentally acceptable materials is mandatory.

Several works have demonstrated that the use of natural resources (cereals, seeds, aromatic plants, essential oils, etc) or renewable biomass make the development of C-dots more sustainable than the use of common organic molecules under the same experimental conditions [56]. In recent papers by Pinto da Silva et al. [57,58], it was demonstrated that the fabrication of CDs from standard organic precursors (citric acid as carbon source and urea or ethylenediamine (EDA) as N-doping molecule) can be performed environmentally sustainable by adequate selection of the synthesis route (e.g., microwave-assisted hydrothermal treatment) and the N-doping substance (EDA in this particular case).

We should like also to mention that these CDs could also be used as green anti-friction and anti-wear additives in lubricant oils, showing a reduction of the friction coefficient of a 36% and a wear reduction of 10% respect to the neat base oil [59,60]. The solubility of the CDs in mineral oil deserves a brief discussion. The solubility of the hydrophilic CDs in the oil is closely related with the moisture present in the oil. The concentration of water may vary from 300 to 400 ppm for mineral oils, while for synthetic biodegradable oils it ranges from 800 to 1000 ppm [61]. Taking into account that the mineral oil ISO 68 was not previously dried in our experiments it should content, at least, the lowest level of moisture related with the room air humidity. This dissolved moisture is the driving force to form reverse micelles: amphiphilic oil components may self-assemble into roughly spherical structures (reverse micelles) around trace amounts of water, placing the hydrophilic moiety towards the water domain and their hydrophobic tails towards the bulk oil [62]. These reverse micelles in bulk oils creates oil–water interfacial nano-environment where hydrophilics (e.g., carbon dots) and amphiphilics (e.g., lipid radicals) can be driven into close contact with each other, thus acting CDs as active antioxidants. To explain the CDs scavenging activity in this scenario, some optical key parameters of CDs were considered. For the prediction of the position of the energy levels of the valence band (E_{VB}) and the bottom levels of the conduction band (E_{CB}), the Equations (5) and (6) were used [63]:

$$E_{CB} = \chi - E^C - (E_g/2) \quad (5)$$

$$E_{VB} = E_{CB} + E_g \quad (6)$$

in which E_{CB} and E_{VB} are the potentials of the conduction and valence bands, respectively, E^C is the energy of free electrons on the hydrogen scale (~ 4.5 eV) [64], E_g and χ are the band gap and the electronegativity of the CDs, respectively. The χ was expressed as the geometric mean of the absolute electronegativity of the atoms forming the CDs. Taking the GCDs as model, the electronegativity values for C, O, S, N and H atoms were taken as 6.27, 7.54, 6.22, 7.30 and 7.18 eV, respectively [65]. The calculated values of E_{CB} (0.77 eV) and E_{VB} (4.02 eV) were found for GCDs. Three generic alkyl-radical couples, RO^\bullet/ROH (2.90 eV vs NHE), $ROO^\bullet/ROOH$ (3.50 eV vs NHE), and $ROOH/RO^\bullet$ (2.60 eV vs NHE) [65] have been used in the discussion. Considering that the high redox potentials of these radicals make them strongly electrophilic, three possible radical scavenging mechanisms of CDs could be envisaged: (i) addition of the radical to electron rich C=C bonds, (ii) H abstraction from available group donors (-COOH, -SH, -OH) (Figure 9a,c) upon GCDs excitation by light, interaction between the low energy SOMO orbital (single occupied molecular orbital) of the radical and conduction band of the GCDs of higher energy (Figure 9b). After any of the above possibilities, the unpaired electrons may be then delocalized by resonance within the CDs conjugated nano-domains and/or by a rearrangement of chemical bonds.

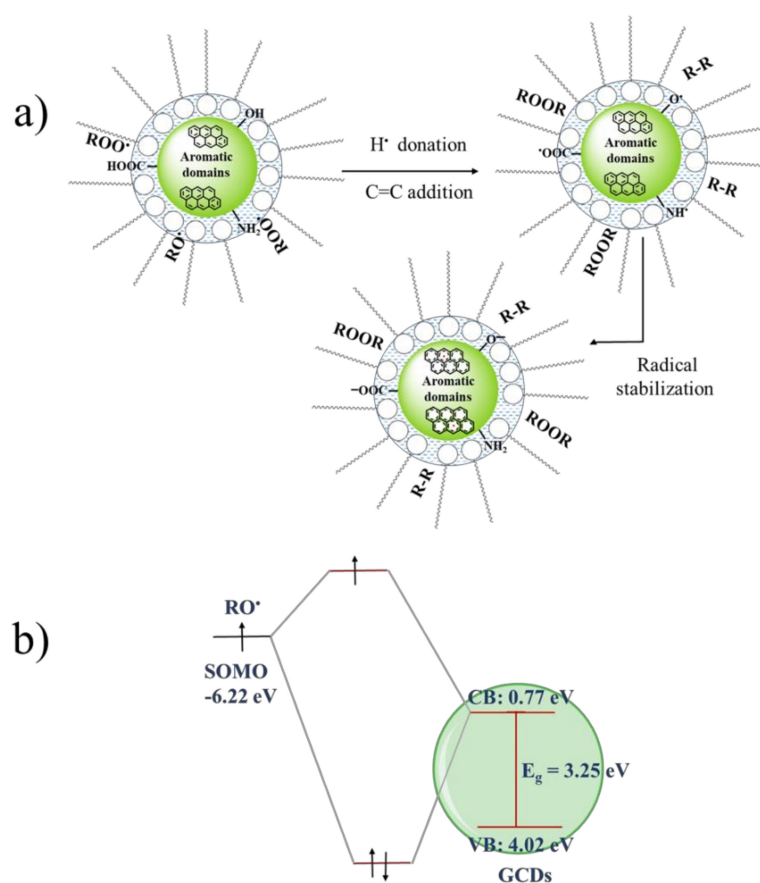


Figure 9. (a) Carbon dots antioxidant activity at the interface water-oil mediated by reverse micelles, (b) Frontier orbital interactions of singly occupied molecular orbital (SOMO) of the alkoxy radical (RO^\bullet) and the conduction band of GCDs.

4. Conclusions

The use of biomass as starting materials for synthesizing CDs is a sustainable way to revalorize industrial wastes. Without further addition of N-doping molecules and using a hydrothermal route, we successfully synthesized CDs from tea wastes (TCDs) and grape pomace (P1CDs and P2CDs) with antioxidant properties and dispersibility both in water and in non-aqueous media. Also, citric acid/glutathione CDs, as representative of CDs obtained from small molecules were produced by

hydrothermal synthesis. In aqueous media, the antioxidant properties of all the CDs obtained were determined by DPPH, which compared favorably with those standard compounds such as ascorbic acid and vitamin E and with those of CDs obtained from raw biomaterials. Thus, EC_{50} of reducing power were 50, 75 and 175 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for TCDs, P2CDs and GCDs, respectively. Due to the solubility of these CDs in non-aqueous media, as a proof of the concept, GCDs and TCDs were used as antioxidant additives in a lubricant base oil. Results render these CDs as potential candidates for applications in the oxidative protection of vegetable-oil based lubes. In this work we demonstrate that CDs obtained from vegetable wastes provide an extraordinary opportunity to study the role played by the intrinsic properties of the starting materials, in particular in terms of their antioxidant activity. The work is a step forward towards the use of CDs as antioxidant additives in lubricant oils as demonstrated by the oxidative stability of a commercial lubricant oil provided by the addition TCDs. In principle, these CDs are expected to be applied in the future not only as green antioxidant additives in bio-lubricants, particularly those based on vegetal oils (or in other products such as cosmetics or food packaging) but also as green anti-friction and anti-wear nano-additives in biodegradable lubes. However, in order to realize the full potential of CDs obtained from biomass resources further long-term studies are certainly needed to clarify the importance of the different origin of the same biomass source, the potential cytotoxicity of the CDs or the synthesis procedures that focus on green chemistry.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-3921/9/11/1147/s1>, Figure S1: HRTEM image of P2CDs showing uniform dispersity of carbon dots (small dark spots) at 100 nm resolution; Figure S2. Urbach energy estimation for GCDs; Figure S3. Urbach energy estimation for TCDs; Figure S4. Urbach energy estimation for P1CDs; Figure S5. Urbach energy estimation for P2CDs; Figure S6. Excitation and emission spectra of the synthesized carbon dots. The spectra were vertically shifted for the sake of clarity; Table S1. Some key tribological properties of the mineal ISO 68 oil (Repsol data).

Author Contributions: Conceptualization, M.E.D.-G. and R.B.-L.; Investigation, C.M. and R.B.-L.; Writing—original draft, M.E.D.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Gobierno de España: Project # RRTI2018-099756-B-I00 and Foundation for the Promotion in Asturias of the Applied Scientific Research and Technology, Project FC-GRUPINIDI/2018/000131.

Acknowledgments: C.M. acknowledges FICYT (Foundation for the Promotion in Asturias of the Applied Scientific Research and Technology), Project FC-GRUPINIDI/2018/000131 for financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interest.

References

1. Xu, D.; Lin, Q.; Chang, H.T. Recent Advances and Sensing Applications of Carbon Dots. *Small Methods* **2019**, *1900387*. [[CrossRef](#)]
2. Kasouni, A.; Chatzimitakos, T.; Stalikas, C. Bioimaging Applications of Carbon Nanodots: A Review. *C J. Carbon R.* **2019**, *5*, 19. [[CrossRef](#)]
3. Tu, Z.; Hu, E.; Wang, B.; David, K.D.; Seeger, P.; Moneke, M.; Stengler, R.; Hu, K.; Hu, X. Tribological behaviors of Ni-modified citric acid carbon quantum dot particles as green additive in polyethylene glycol. *Friction* **2019**, *8*, 182–197. [[CrossRef](#)]
4. Chu, K.W.; Lee, S.L.; Chang, C.J.; Liu, L. Recent Progress of Carbon Dot Precursors and Photocatalysis Applications. *Polymers* **2019**, *11*, 689. [[CrossRef](#)]
5. Huq, R.; Samuel, E.L.G.; Sikkema, W.K.A.; Nilewski, L.G.; Lee, T.; Tanner, M.R.; Khan, F.S.; Porter, P.C.; Tajhya, R.B.; Patel, R.S.; et al. Preferential uptake of antioxidant carbon nanoparticles by T lymphocytes for immunomodulation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33808. [[CrossRef](#)]
6. Rizzo CArcudi, F.; Dordevic, L.; Dintcheva, N.T.; Noto, R.; D'Anna, F.; Prato, M. Nitrogen-Doped Carbon Nanodots-Ionogels: Preparation, Characterization, and Radical Scavenging Activity. *ACS Nano* **2018**, *12*, 1296–1305. [[CrossRef](#)]
7. Huang, G.; Lin, Y.; Zhang, L.; Yan, Z.; Wang, Y.; Liu, Y. Synthesis of Sulfur-Selenium Doped Carbon Quantum Dots for Biological Imaging and Scavenging Reactive Oxygen Species. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 19651. [[CrossRef](#)]
8. Wang, Y.; Sun, J.; He, B.; Feng, M. Synthesis and modification of biomass derived carbon dots in ionic liquids and their application: A mini review. *Green Chem. Eng.* **2020**. [[CrossRef](#)]

9. Meng, W.; Bai, X.; Wang, B.; Liu, Z.; Lu, S.; Yang, B. Biomass-Derived Carbon Dots and Their Applications. *Energy Environ. Mater.* **2019**, *2*, 172–192. [[CrossRef](#)]
10. Thangaraj, B.; Solomon, P.R.; Ranganathan, S. Synthesis of Carbon Quantum Dots with Special Reference to Biomass as a Source—A review. *Curr. Pharm. Design.* **2019**, *25*, 1455–1476. [[CrossRef](#)]
11. Verhagen, A.; Kellarakis, A. Carbon Dots for Forensic Applications: A Critical Review. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhao, S.; Lan, M.; Zhu, X.; Xue, H.; Ng, T.W.; Meng, X.; Lee, C.S.; Wang, P.; Zhang, W. Green Synthesis of Bifunctional Fluorescent Carbon Dots from Garlic for Cellular Imaging and Free Radical Scavenging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 17054–17060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sachdev, A.; Gopinath, P. Green synthesis of multifunctional carbon dots from coriander leaves and their potential application as antioxidants, sensors and bioimaging agents. *Analyst* **2015**, *140*, 4260–4269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Chunduri, L.A.; Kurdekar, A.; Patnaik, S.; Dev, B.V.; Rattan, T.M.; Kamiseti, V. Carbon Quantum Dots from Coconut Husk: Evaluation for Antioxidant and Cytotoxic Activity. *Mater. Focus* **2016**, *5*, 55–61. [[CrossRef](#)]
15. Chunduri, L.A.; Kurdekar, A.; Patnaik, S.; Rajasekhar Aditha, S.; Prathibha, C.; Kamiseti, V. Single Step Synthesis of Carbon Quantum Dots from Coconut Shell: Evaluation for Antioxidant Efficacy and Hemotoxicity. *J. Mater. Sci. Appl.* **2017**, *3*, 83–93.
16. Li, F.; Li, T.; Sun, C.; Xia, J.; Jiao, Y.; Xu, H. Selenium-Doped Carbon Quantum Dots for Free-Radical Scavenging. *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 9910–9914. [[CrossRef](#)]
17. Zou, S.; Zhu, X.; Zhang, L.; Guo, F.; Zhang, M.; Tan, Y.; Gong, A.; Fang, Z.; Ju, H.; Wu, C.; et al. Biomimetic Synthesis of Cerium-Doped Carbonaceous Nanoparticles for Highly Hydroxyl Radical Scavenging Activity. *Nanoscale Res. Lett.* **2018**, *13*, 76. [[CrossRef](#)]
18. Chen, K.; Qing, W.; Hu, W.; Lu, M.; Wang, Y.; Liu, X. On-off-on fluorescent carbon dots from waste tea: Their properties, antioxidant and selective detection of CrO_4^{2-} , Fe^{3+} , ascorbic acid and L-cysteine in real samples. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectr.* **2019**, *213*, 228–234. [[CrossRef](#)]
19. Lin, J.S.; Tsai, Y.W.; Dehvari, K.; Huang, C.C.; Chang, J.Y. A carbon dot based theranostic platform for dual modal imaging and free radical scavenging. *Nanoscale* **2019**, *11*, 20917. [[CrossRef](#)]
20. Lu, F.; Yang, S.; Song, Y.; Zhai, C.; Wang, Q.; Ding, G.; Kang, Z. Hydroxyl functionalized carbon dots with strong radical scavenging ability promote cell proliferation. *Mater. Res. Express* **2019**, *6*, 065030. [[CrossRef](#)]
21. Roshni, V.; Gujar, V.; Pathan HIslam, S.; Tawre, M.; Pardesi, K.; Santra, M.K.; Otoor, D. Bioimaging Applications of Carbon dots (C. dots) and its Cystamine Functionalization for the Sensitive Detection of Cr(VI) in Aqueous Samples. *J. Fluor.* **2019**, *29*, 1381–1392. [[CrossRef](#)]
22. Bayat, A.; Masoum, S.; Hosseini, E.S. Natural plant precursor for the facile and eco-friendly synthesis of carbon nanodots with multifunctional aspects. *J. Mol. Liq.* **2019**, *281*, 134–140. [[CrossRef](#)]
23. Yang, D.; Li, L.; Cao, L.; Chang, Z.; Mei, Q.; Yan, R.; Ge, M.; Jiang, C.; Dong, W.F. Green Synthesis of Lutein-Based Carbon Dots Applied for Free-Radical Scavenging within Cells. *Materials* **2020**, *13*, 4146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zou, S.; Guo, F.; Wu, L.; Ju, H.; Sun, M.; Cai, R.; Xu, L.; Gong, Y.; Gong, A.; Zhang, M.; et al. One-pot synthesis of cerium and praseodymium co-doped carbon quantum dots as enhanced antioxidant for hydroxyl radical scavenging. *Nanotechnology* **2020**, *31*, 165101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Choe, E.; Min, D.B. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2006**, *5*, 168–186. [[CrossRef](#)]
26. Gayen, B.; Palchoudhury, S.; Chowdhury, J. Carbon Dots: A Mystic Star in the World of Nanoscience. *J. Nanomat.* **2019**. [[CrossRef](#)]
27. Díaz-Faes López, T.; Fernández González, A.; Díaz-García, M.E.; Badía-Laiño, R. Highly efficient Förster resonance energy transfer between carbon nanoparticles and europium–tetracycline complex. *Carbon* **2015**, *94*, 142–151. [[CrossRef](#)]
28. Zhuo, Y.; Miao, H.; Zhong, D.; Zhu, S.; Yang, X. One-step synthesis of high quantum-yield and excitation-independent emission carbon dots for cell imaging. *Mat. Lett.* **2015**, *139*, 197–200. [[CrossRef](#)]
29. Wang, H.; Zhang, M.L.; Ma, Y.; Wang, B.; Huang, H.; Liu, Y.; Shao, M.; Kang, Z. Carbon Dots Derived from Citric Acid and Glutathione as a Highly Efficient Intracellular Reactive Oxygen Species Scavenger for Alleviating the Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Macrophages. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 41088–41095. [[CrossRef](#)]

30. Wilson, N.; Pandey, P.A.; Beanland, R.; Young, R.J.; Kinloch, I.A.; Gong, L.; Liu, Z.; Suenaga, K.; Rourke, J.P.; York, S.J.; et al. Graphene Oxide: Structural Analysis and Application as a Highly Transparent Support for Electron Microscopy. *ACS Nano* **2009**, *3*, 2547–2556. [[CrossRef](#)]
31. Li, B.; Nan, Y.; Zhang, P.; Song, X. Structural characterization of individual graphene sheets formed by arc discharge and their growth mechanisms. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 19797–19806. [[CrossRef](#)]
32. Zarrinbakhsh, N.; Wang, T.; Rodriguez-Urbe, A.; Misra, M.; Mohanty, A.K. Characterization of wastes and coproducts from the coffee industry for composite material production. *BioResources* **2016**, *11*, 7637–7653. [[CrossRef](#)]
33. Zarrinbakhsh, N.; Mohanty, A.K.; Misra, M. Fundamental studies on water-washing of the corn ethanol coproduct (DDGS) and its characterization for biocomposite applications. *Biomass Bioenergy* **2013**, *55*, 251–259. [[CrossRef](#)]
34. Díez-Pascual, A.M.; Díez-Vicente, A.L. Poly(propylene fumarate)/polyethylene glycol-modified graphene oxide nanocomposites for tissue engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 7902–17914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Luceño-Sánchez, J.A.; Maties, G.; González-Arellano, C.; Díez-Pascual, A.M. Synthesis and Characterization of Graphene Oxide Derivatives via Functionalization Reaction with Hexamethylene Diisocyanate. *Proceedings* **2019**, *3*, 8. [[CrossRef](#)]
36. Wood, D.; Tauc, J. Weak Absorption Tails in Amorphous Semiconductors. *Phys. Rev. B* **1972**, *5*, 3144–3151. [[CrossRef](#)]
37. Pan, Y.; Inam, F.; Zhang, M.; Drabold, D.A. Atomistic Origin of Urbach Tails in Amorphous Silicon. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 206403. [[CrossRef](#)]
38. Studenyak, I.P.; Kranjčec, M.; Kurik, M. Urbach Rule in Solid State Physics. *Int. J. Optics Appl.* **2014**, *4*, 76–83. [[CrossRef](#)]
39. Mintz, K.J.; Zhou, Y.; Leblanc, R.M. Recent development of carbon quantum dots regarding their optical properties, photoluminescence mechanism, and core structure. *Nanoscale* **2019**, *11*, 4634–4652. [[CrossRef](#)]
40. Xia, C.; Zhu, S.; Feng, T.; Yang, M.; Yang, B. Evolution and Synthesis of Carbon Dots: From Carbon Dots to Carbonized Polymer Dots. *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1901316. [[CrossRef](#)]
41. Begheri, Z.; Ehtesabi, H.; Rahmandoust, M.; Ahadian, M.M.; Hallaji, Z.; Eskandari, F.; Jokar, E. New Insight into the Concept of Carbonization Degree in Synthesis of Carbon Dots to Achieve Facile Smartphone Based Sensing Platform. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Liu, F.; Sun, Y.; Zheng, Y.; Tang, N.; Li, M.; Zhong, W.; Du, Y. Gram-scale synthesis of high-purity graphene quantum dots with multicolour photoluminescence. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 103428–103432. [[CrossRef](#)]
43. Tang, J.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Xiao, Y.; Shi, Y.; Chen, Y.; Ding, L.; Xu, W. Influence of group modification at the edges of carbon quantum dots on fluorescent emission. *Nanoscale Res. Lett.* **2019**, *14*, 241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zhu, S.; Meng, Q.; Wang, L.; Zhang, J.; Song, Y.; Jin, H.; Zhang, K.; Sun, H.; Wang, H.; Yang, B. Highly Photoluminescent Carbon Dots for Multicolor Patterning, Sensors and Bioimaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3953–3957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Carbonaro, C.M.; Corpino, R.; Salis, M.; Mocci, F.; Thakkar, S.V.; Olla, C.; Ricci, P.C. On the Emission Properties of Carbon Dots: Reviewing Data and Discussing Models. *J. Carbon Res.* **2019**, *5*, 60. [[CrossRef](#)]
46. Hsu, P.C.; Chang, H.T. Synthesis of High-quality Carbon Nano Dots from Hydrophilic Compounds: Role of Functional Groups. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3984–3986. [[CrossRef](#)]
47. Sánchez-Rangel, J.C.; Benavides, J.; Heredia, J.B.; Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D.A. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 5990–5999. [[CrossRef](#)]
48. Afsar, T.; Razak, S.; Khan, M.R.; Mawash, S.; Almajwal, A.; Shabir, M.; Haq, I.U. Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydaspica* R. Parker aerial parts. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 258. [[CrossRef](#)]
49. Shen, C.Z.; Jun, H.Y.; Choi, S.H.; Kim, Y.M.; Jung, E.J.; Oh, G.S.; Joo, S.J.; Kim, S.H.; Kim, I.K. Evaluation of Antioxidant Activities and Active Compounds Separated from Water Soluble Extracts of Korean Black Pine Barks. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 3567–3572. [[CrossRef](#)]

50. Rebelo, M.M.; Da Silva, J.K.R.; Andrade, E.H.A.; Maia, J.G.S. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2019**, *19*, 230–235. [CrossRef]
51. Amiri, H. Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanolic Extract of *Teucrium orientale* (L.) subsp. *Taylori* (Boiss.) Rech. f. Iran. *J. Pharm. Res.* **2010**, *9*, 417–423. [PubMed]
52. Bellik, Y.; Benabdesselam, F.; Ayad, A.; Dahmani, Z.; Boukraâ, L.; Nemmar, A.; Iguer-Ouada, M. Antioxidant activity of the essential oil and oleoresin of *Zingiber officinale* roscoe as affected by chemical environment. *Int. J. Food. Prop.* **2013**, *16*, 1304–1313. [CrossRef]
53. Eissa, E.A.; Basta, J.S.; Ibrahim, V. The Oxidation Stability of Lubricating Oil. *Pet. Sci. Technol.* **2010**, *28*, 1611–1619. [CrossRef]
54. ISO 27107:2008. Corrected version 2009-05-15. Animal and Vegetable Fats and Oils. Determination of Peroxide Value. Potentiometric End-Point Determination. Available online: <https://webstore.ansi.org/standards/din/dineniso271072010> (accessed on 17 November 2020).
55. Crista, D.M.A.; Mragui, A.E.; Algarra, M.; Esteves da Silva, J.C.G.; Luque, R.; Pinto da Silva, L. Turning Spent Coffee Grounds into Sustainable Precursors for the Fabrication of Carbon Dots. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1209. [CrossRef]
56. Christé, S.; Esteves da Silva, J.C.G.; Pinto da Silva, L. Evaluation of the Environmental Impact and Efficiency of N-Doping Strategies in the Synthesis of Carbon Dots. *Materials* **2020**, *13*, 504. [CrossRef]
57. Sendão, R.; Martínez de Yuso, M.V.; Algarra, M.; Esteves da Silva, J.C.G.; Pinto da Silva, L. Comparative life cycle assessment of bottom-up synthesis routes for carbon dots derived from citric acid and urea. *J. Clean. Prod.* **2020**, *254*, 120080. [CrossRef]
58. Chimenon-Trinchet, C.; Pacheco, M.E.; Fernández-González, A.; Díaz-García, M.E.; Badía-Laiño, R. New metal-free nanolubricants based on carbon-dots with outstanding antiwear performance. *J. Ind. Eng. Chem.* **2020**, *87*, 152–161. [CrossRef]
59. Casado, J.E.; Fernández-González, A.; Díaz-García, M.E.; Badía-Laiño, R. Smart carbon dots as additive and chemosensor for control water contamination in lubricants. *Sens. Actuators B.* (under review).
60. IMCA. *Understanding Biodegradable Lubricants: An Introduction to “Green” Oil in Hydraulic Systems Offshore*; International Marine Contractors Association (IMCA): London, UK, 2014.
61. Chaiyvaist, W.; McClements, D.J.; Weiss, J.; Decker, E.A. Impact of Surface-Active Compounds on Physicochemical and Oxidative Properties of Edible Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 550–556. [CrossRef]
62. Butler, M.A.; Ginley, D.S. Prediction of flatband potentials at semiconductor-electrolyte interfaces from atomic electronegativities. *J. Electrochem. Soc.* **1978**, *125*, 228–232. [CrossRef]
63. Morrison, S.R. *Electrochemistry at Semiconductor and Oxidized Metal Electrodes*; Plenum Press: New York, NY, USA, 1980.
64. Pearson, R.G. Absolute Electronegativity and Hardness: Application to Inorganic Chemistry. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 734–740. [CrossRef]
65. Buettner, G.R.; Jurkiewicz, B.A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid. *Radiat. Res.* **1996**, *145*, 532–541. [CrossRef] [PubMed]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

OVIEDO

Septiembre 2021