



# **ESCUELA POLITÉCNICA DE INGENIERÍA DE GIJÓN.**

## **GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL**

### **ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA**

#### **DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE SENSORES LUMINISCENTES PARA EL CONTROL DE SEGURIDAD ALIMENTARIA**

**D.<sup>a</sup> GANGOSO GONZÁLEZ, Ana**  
**TUTORA: D.<sup>a</sup> SOLDADO CABEZUELO, Ana Belén**  
**COTUTORA: MELENDRERAS GARCÍA, Candela**

**FECHA: julio de 2023**

# Índice

<b>ANEXO; GLOSARIO DE TÉRMINOS</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1.1.- AMINAS BIOGÉNICAS Y SEGURIDAD ALIMENTARIA.	5
1.1.2.- CONDICIONES FAVORABLES PARA LA FORMACIÓN DE PRODUCTORES DE AMINAS BIOGÉNICAS.	7
1.1.3.- ESCENARIOS QUE CONDUCEN A APARICIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS EN LOS ALIMENTOS	8
1.2.- MATERIALES METAL-ORGÁNICOS POROSOS (MOF).	9
1.3.- USO DE LOS MOF PARA EL DESARROLLO DE SENSORES	11
1.3.1.- MOF COMO SENSORES LUMINISCENTES	12
1.3.2.- MOF COMO SENSORES ELECTROQUÍMICOS	16
1.4.- DESARROLLO DE ESTRATEGIAS ANALÍTICAS BASADAS EN EL EMPLEO DE MOF FLUORESCENTE PARA EL CONTROL DE CONTAMINACIÓN ALIMENTARIA.	18
<b>2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>23</b>
<b>4. METODOLOGÍA DE TRABAJO.</b>	<b>24</b>
4.1.- REACTIVOS Y DISOLUCIONES	24
4.2.- INSTRUMENTACIÓN	24
4.3.- SÍNTESIS DEL CU-MOF74.	25
4.4.- OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EXPERIMENTALES	27
4.4.1.- SELECCIÓN DE LAS LONGITUDES DE ONDA DE MEDIDA Y EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE MOF	27
4.4.2.- EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE REACCIÓN DE LAS AMINAS BIOGÉNICAS.	31
4.4.3.- APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA DESARROLLADA AL ANÁLISIS DE LAS AMINAS BIOGÉNICAS.	34
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>

**6. REFERENCIAS**

**44**

# Anexo; Glosario de términos

## A

AB	Amina Biogénica
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AIE	Emisión Inducida por Agregación

## D

DMF	NN-dimetilformamida
DOBCD	2,5-dioxido-1,4-benzenedicarboxylate

## E

EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
------	--

## F

FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FITC	5-isotiocianato de Fluoresceína

## I

I	Intensidad
ILCT	Transferencia de Carga Intraligando
IML-PCP	PCP de Ligando Mixto Isomorfo
IMM-PCP	PCP de Metal Mixto Isomorfo

## L

LMCT	Transferencia de Carga de Ligando a Metal
LMOF	Marco Metal-Orgánico Luminiscente

## M

MLCT	Transferencia de Carga de Metal a Ligando
MOF	Marco Metal-Orgánico

## O

OMS	Organización Mundial de la Salud
-----	----------------------------------

## P

PAA	Ácido Poliacrílico
PCP	Polímero de Coordinación Porosa
PTA	Ácido Tereftálico Purificado
PUT	Putrescina

## T

TIR	Tiramina
-----	----------

## U

UE	Unión Europea
----	---------------

## Caracteres especiales

$\lambda_{ex}$	Longitud de onda de excitación
$\lambda_{em}$	Longitud de onda de emisión
Å	Angstrom
a.u.	Unidad de absorbancia
g	Gramos
M	Molaridad
mg	Miligramos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrados
rpm	Revoluciones por minuto
$\mu$ l	Microlitros

# 1. Introducción

## 1.1.- AMINAS BIOGÉNICAS Y SEGURIDAD ALIMENTARIA.

La seguridad alimentaria es una de las grandes preocupaciones de los organismos de salud de todo el mundo, entre ellos podemos destacar la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) o la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Las intoxicaciones alimentarias son responsables de numerosas enfermedades, y sólo conociendo su origen seremos capaces de prevenirlas. Las enfermedades asociadas a intoxicaciones alimentarias pueden tener diferentes orígenes y ser transmitidas por bacterias, virus, parásitos, moho, contaminantes, metales, alérgenos, pesticidas, etc. En general, la mayoría de las intoxicaciones son causadas por bacterias, virus y parásitos, no obstante, hay casos de contaminación alimentaria que están relacionados con toxinas químicas o naturales. De estas toxinas, la FDA y la EFSA prestan especial atención a las aflatoxinas, las micotoxinas o la histamina, entre otras. De ellas, cabe destacar la histamina que es una amina biogénica (AB) presente en la mayoría de los alimentos, aunque en mayor abundancia en el pescado y productos de la pesca. (Ruiz-Capillas & Herrero, 2019)

Las AB son compuestos que se encuentran habitualmente en alimentos y bebidas, tales como la carne, el pescado, el queso, las verduras o el vino. Se trata de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular formados por descarboxilación de aminoácidos y transaminación de aldehídos y cetonas. La eliminación del grupo  $\alpha$ -carboxilo de un aminoácido proteico conduce a la AB correspondiente. (Biji et al., 2016; Ruiz-Capillas & Herrero, 2019)

Entre las AB más importantes destacan: la histamina, la tiramina, la putrescina, la cadaverina, la  $\beta$ -feniletilamina, la agmatina, la triptamina, la serotonina, la espermidina y la espermina. Estas aminas se clasifican según su estructura química en (1) Aminas aromáticas

(histamina, tiramina, serotonina,  $\beta$ -feniletilamina y triptamina); (2) Diaminas alifáticas (putrescina y cadaverina); (3) poliamidas alifáticas (agmatina, espermidina y espermina). En cuanto a su origen o síntesis, se pueden clasificar como poliamidas cuando son endógenas y se forman de manera natural a partir de animales, plantas y microorganismos; y como aminas biógenas cuando se forman por la descarboxilación de los aminoácidos libres (AFA) a partir de la acción de las enzimas descarboxilasas. En la Figura 1.1 se muestra la clasificación de las AB. (Ruiz-Capillas & Herrero, 2019; Silla Santos, 1996; Smith, 1981)

#### Aminas Aromáticas

- Histamina
- Tiramina
- Serotonina
- $\beta$ -feniletilamina
- Triptamina

#### Diaminas alifáticas

- Putrescina
- Cadaverina

#### Poliamidas alifáticas

- Agmatina
- Espermidina
- Espermina

Figura 1.1.- Clasificación de las Aminas Biogénicas que pueden encontrarse en los alimentos

La producción de aminas biogénicas se ha asociado con algunos grupos de microorganismos, por ejemplo, la producción de putrescina y cadaverina se encuentra frecuentemente en enterobacterias, así como la tiramina se forma mayoritariamente en los enterococos.(EFSA Journal, 2011)

### **1.1.2.- Condiciones favorables para la formación de productores de aminas biogénicas.**

Para que se produzca la síntesis de AB es necesario que exista disponibilidad de aminoácidos de sustrato. La proteólisis (“degradación de proteínas ya sea mediante enzimas específicas, llamadas proteasas, o por medio de digestión intramolecular”) es un factor crucial, ya que está directamente relacionada con la disponibilidad de aminoácidos libres que proporcionan un sustrato para la formación de AB. (EFSA Journal, 2011)

A continuación, se detallan de forma breve algunas de las condiciones que, según EFSA Journal 2011; “Scientific Opinion on Risk Based Control of Biogenic Amine Formation in Fermented Foods”, permiten el crecimiento de los productores de AB, así como la producción y actividad de enzimas.

#### **Efecto de la temperatura**

En general, la tasa de producción de aminas aumenta con la temperatura, por el contrario, la acumulación de estas se minimiza a bajas temperaturas debido a la inhibición del crecimiento microbiano y la reducción de la actividad enzimática. La temperatura óptima para la formación de AB se establece entre 20 y 37 °C, mientras que por debajo de 5 °C la producción disminuye. Este rango de temperatura resulta genérico y orientativo para todo tipo de AB, en cambio, en ciertos casos este no se cumple. Como es el caso de *Morganella morganii* (poderoso productor de histamina en marisco) que produce histamina por encima de 7-10 °C, o en el caso de alimentos refrigerados, como pescado fresco almacenado en hielo, las bacterias psicotolerantes pueden contribuir a la acumulación de aminas incluso por debajo de los 5 °C, siendo *Photobacterium phosphoreum* y *Morganella psychrotolerans* las más relevantes en este proceso.

#### **Efecto del pH**

El nivel de pH es un factor importante que influye en la actividad de los aminoácidos descarboxilasa. Relacionados con el pH existen dos mecanismos que actúan de forma simultánea: uno afectado por el crecimiento por acidez, que inhibe el crecimiento de

microorganismos; el segundo afecta a la producción y actividad de la enzima, ya que en ambientes de bajo pH las bacterias se encuentran favorecidas para la producción de descarboxilasa como mecanismo de defensa contra la acidez. Estos dos factores, diametralmente opuestos, interfieren entre sí obteniendo un resultado neto dependiente de su equilibrio.

### **Otros factores: Concentración salina y oxígeno**

El cloruro de sodio influye en la actividad de los aminoácidos descarboxilasa implicados en la producción de aminas biogénicas, por un lado, la actividad de algunos productores de AB (*Histidina descarboxilasa de Staphylococcus capitis*, *Enterobacter cloacae* y *Pantoea agglomerans*) se ve retrasada por la alta concentración de sal, en cambio la actividad de la *histidina descarboxilasa de Staphylococcus spp. Halotolerante* aislada mejora en presencia de dicha sal.

La disponibilidad de oxígeno parece tener un efecto significativo sobre la biosíntesis de las AB, como ejemplo: *Enterobacter cloacae* produce aproximadamente la mitad de putrescina en estado anaerobio en comparación con el estado aerobio. El potencial redox del medio también influye en la formación de AB, las condiciones que resultan en un potencial redox bajo estimulan la producción de histamina.

### **1.1.3.- Escenarios que conducen a aparición de aminas biogénicas en los alimentos**

#### **Presencia de aminas biogénicas en materias primas**

La sangre y los despojos de ciertos alimentos pueden contener mayores concentraciones fisiológicas de histamina, por lo que una elevada concentración de esta amina puede estar presente en alimentos derivados de estas materias primas, como es el caso de las morcillas.

#### **Deterioro**

Los microorganismos presentes en el deterioro de los alimentos pueden contribuir en gran medida en la formación de AB en alimentos fermentados. De hecho, debido al origen

microbiano de las AB, estas se han utilizado para evaluar la calidad higiénica y la frescura de ciertos alimentos.

### Fermentación

El objetivo principal de la fermentación es la conversión de carbohidratos en ácido láctico. Por ello, la acción de las bacterias del ácido láctico es deseable para la producción de salchichas, queso, pan de masa agria además de para la fermentación de vino. Sin embargo, algunas de las bacterias implicadas en la fermentación pueden producir AB.

## 1.2.- MATERIALES METAL-ORGÁNICOS POROSOS (MOF).

Los materiales metal-orgánicos porosos “*metal-organic frameworks*” (MOF) son sólidos cristalinos consistentes en unidades inorgánicas (clústeres metálicos) unidas mediante ligandos orgánicos en forma uni, bi o tridimensional con una gran flexibilidad de diseño en su arquitectura porosa, elevadas porosidad y superficie específica (Sarango Simbaña et al., 2021). Dichos MOF surgen como una evolución a los conocidos “Porous Coordination Polymers” (PCP), reportados a finales del siglo XX, definiéndose estos como sólidos porosos poliméricos unidos por enlaces de coordinación entre centros metálicos y ligandos orgánicos (Foo et al., 2014) como se puede ver en la Figura 1.2.

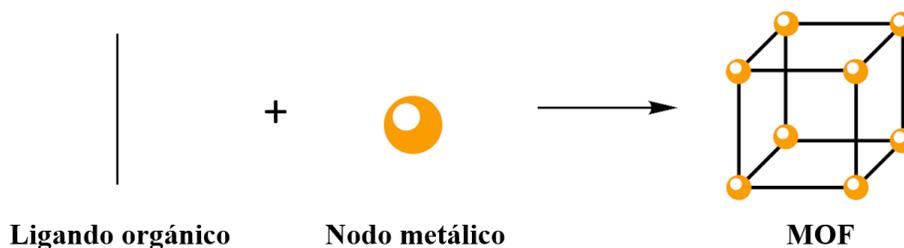


Figura 1.2.- Estructura de un MOF basada en la de un PCP. Adaptado de (Sarango Simbaña et al., 2021)

Un impulso inicial para la investigación de MOF consistió en la búsqueda de materiales porosos híbridos inorgánico-orgánicos análogos a las zeolitas. Inicialmente, alguno de los MOF

descubiertos se construyeron a partir de nodos de iones metálicos únicos. Con el paso del tiempo la incorporación de grupos metálicos ha dado lugar a mejoras significativas en la porosidad y estabilidad de estos materiales. (Cai «joe» Zhou & Kitagawa, 2014). A lo largo de los años, estos polímeros porosos han ido evolucionando y sus aplicaciones se han explotado en multitud de áreas de conocimiento. Algunas de ellas son: Almacenamiento y separaciones de gas, administración de fármacos, catálisis, etc.

Recientemente, se ha estudiado otro enfoque que permite aumentar la diversidad y las funciones de los PCP, este se trata de la hibridación, o mezcla, de diferentes componentes a escala atómica, molecular, nanoescala y mesoescala permitiendo el ajuste de las propiedades físicas del compuesto resultante. Foo et al. (2014), definieron la hibridación para pertenecer a tres clases, las cuales se observan en la Figura 1.3.

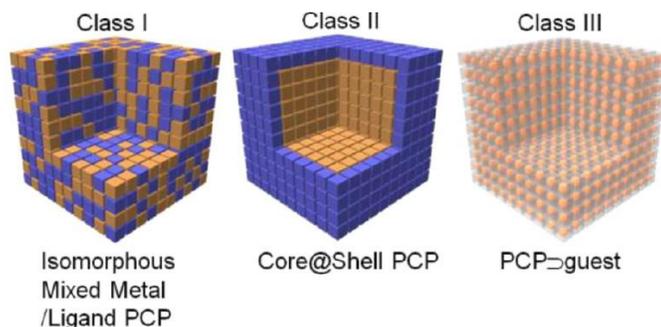


Figura 1.3.- Esquema de las tres clases de PCP híbridos analizados por Foo et al. 2014.

- **Clase I: PCP/MOF isomorfos mixtos de metal-ligando**

Dentro de esta clase, existen dos posibles rutas para la formación de marcos mixtos. En primer lugar, un PCP de metal mixto isomorfo “Isomorphous mixed metal PCP” (IMM-PCP) o PCP de ligando mixto isomorfo “Isomorphous mixed ligand PCP” (IML-PCP).

- **Clase II: Core-Shell (A@B) PCP/MOF**

Donde A es el núcleo (Core) y B es el recubrimiento externo (Shell), en esta clase de híbridos el núcleo y la parte externa pueden ser polímeros de coordinación (PCP@PCP) o solo serlo uno de ellos mientras que el otro es totalmente inorgánico.

- **Clase III: PCP/MOF con nanoespacios para moléculas huésped (PCP  $\supset$  invitado)**

Debido a su inherente porosidad, los PCP son muy adecuados para alojar moléculas huésped que se encuentran confinadas en los nanoespacios. Esto hace que no interactúen entre sí, creándose propiedades únicas a través de dicho confinamiento.

### **1.3.- USO DE LOS MOF PARA EL DESARROLLO DE SENSORES**

La naturaleza modular de estos materiales porosos resulta ideal para adaptar las estructuras y funciones de los MOF de acuerdo con las aplicaciones que se requieran. La característica más notable de estos es su elevada porosidad, los poros pueden presentar un tamaño de entre 4 a 5 Å. Además, una ventaja importante frente a los sorbentes tradicionales, es la diversidad en la forma de los poros. Mientras que las zeolitas presentan poros de formas esféricas, elípticas y cortadas, los MOF poseen, además, poros con formas cuadradas, rectangulares y triangulares.

El carácter sólido de un MOF no solo determina sus propiedades catalíticas y de absorción, sino también otras propiedades físicas como son la susceptibilidad magnética, la conductividad y las características ópticas.

Con todo lo mencionado hasta el momento, se puede afirmar que las capacidades de detección que ofrece este material pueden ajustarse a las necesidades requeridas. Los MOF se pueden emplear como sensores ópticos (luminiscentes) y electroquímicos, para aplicaciones

tales como: la detección de contaminantes ambientales, detección de gases, contaminación alimentaria, etc. (Kustov et al., 2019)

### **1.3.1.- MOF como sensores luminiscentes**

Las propiedades luminiscentes de los materiales no solo están relacionadas con la composición de los materiales, sino que también dependen en gran medida de la estructura y el empaquetamiento intermolecular de los compuestos para su transferencia de energía; por lo tanto, es importante controlar la estructura tridimensional y el empaquetamiento intermolecular a nivel molecular (Cui et al., 2012). Esta puede surgir de la excitación directa de ligandos orgánicos y, en particular, los altamente conjugados, de la emisión centrada en metales y de la transferencia de carga.

Dentro de este apartado, cabe mencionar alguna característica atractiva de los MOF que permite generar dicha luminiscencia tan distintiva de estos materiales que pasan a denominarse LMOF “*Luminescent Metal Organic Frameworks*”; los centros metálicos, las fracciones orgánicas, la transferencia de carga orgánica metálica y las moléculas invitadas son alguna de ellas.

Ya es conocido que determinados MOF presentan propiedades de luminiscencia, la cual se define como la emisión de luz estimulada por la absorción de energía en forma de fotones, campo eléctrico o radiación ionizante (Allendorf et al., 2009). Este procedimiento presenta dos formas básicas de producción de energía dependiendo del estado del espín múltiple durante el proceso de relajación radioactiva: la fluorescencia, permitida por el espín, y la fosforescencia, prohibida por el espín. (Cui et al., 2012)

#### **1.3.1.1.- Luminiscencia basada en ligandos**

En los MOF una amplia gama de moléculas orgánicas  $\pi$  conjugadas se utilizan comúnmente como ligandos debido a su rigidez. Además, la mayoría de ellas se basan en

columnas vertebrales rígidas funcionalizadas con grupos multicarboxilato o grupos heterocíclicos para la coordinación metal-ligando.

La emisión de fluorescencia de los ligandos orgánicos es similar a su comportamiento de emisión en solución, sin embargo, las propiedades de fluorescencia como la longitud de onda de emisión máxima y la vida útil de los enlazadores orgánicos en MOF sólidos, a menudo son diferentes de los de las moléculas libres. Esto es debido a que los enlazadores orgánicos se estabilizan dentro de los MOF, reduciéndose así la tasa de desintegración no radiactiva, lo cual va asociado a una mayor intensidad de fluorescencia, vida útil y eficiencia cuántica.

Además, el tamaño y la naturaleza de los iones metálicos, la orientación y disposición de los enlazadores y el entorno de coordinación dentro del MOF, pueden afectar a las propiedades de fluorescencia de los ligandos orgánicos ya que estos factores presentan diferentes interacciones intermoleculares o intramoleculares entre los ligandos orgánicos. Por tanto, el control de estas interacciones es crucial para ajustar las propiedades luminiscentes de los MOFs a una aplicación en particular.

Cui et al., (2012) observaron que la fuerte luminiscencia del MOF  $Zn_3(\mu_5\text{-pta})_2(\mu_2\text{-H}_2\text{O})_2$  (pta= *Purified Terephthalic Acid*) se observa a 467 nm, mientras que la molécula de ligando libre muestra una luminiscencia débil a 415 nm cuando se excita a 338 nm a temperatura ambiente. La mejora de la luminiscencia y el desplazamiento a rojo de los ligandos orgánicos dentro del MOF se atribuyen a la formación de la estructura del marco, que ha permitido la rigidez de la columna aromática y ha maximizado las interacciones intra/intermoleculares entre los ligandos orgánicos para su transferencia de energía.

### 1.3.1.2.- Luminiscencia de lantánidos

Los iones lantánidos ( $\text{Ln}^{3+}$ ) se caracterizan por un llenado gradual de los orbitales 4f, desde  $4f^0$  (para  $\text{La}^{3+}$ ) hasta  $4f^{14}$  (para  $\text{Lu}^{3+}$ ). Estas configuraciones electrónicas  $[\text{Xe}] 4f^n$  (con

$n=0, 1, \dots, 14$ ) generan una gran variedad de niveles electrónicos de energía, lo que se ve reflejado en sus propiedades ópticas.

Cui et al. afirman que todos los iones  $\text{Ln}^{3+}$ , excepto  $\text{La}^{3+}$  y  $\text{Lu}^{3+}$  pueden generar emisiones luminiscentes  $f-f$  en el rango ultravioleta (UV) visible e infrarrojo cercano (NIR).

Los iones lantánidos sufren una débil absorción de luz debido a las transiciones  $f-f$  inhabilitadas, lo que hace que la excitación directa sea muy ineficiente a no ser que se utilice la excitación laser de alta potencia. Este problema puede solucionarse mediante el acoplamiento de especies que puedan participar en procesos de transferencia de energía conocidos como “sensibilización por luminiscencia” o “efecto antena” (Cui et al., 2012). El mecanismo de sensibilización por antena dentro de los MOF se compone de tres pasos: (1) la luz es absorbida por los ligandos orgánicos alrededor de los iones lantánidos, (2) la energía se transfiere a los iones lantánidos de los ligandos orgánicos, (3) se genera luminiscencia a partir de los iones lantánidos (Cui et al., 2012)

La luminiscencia de los iones lantanoides se rige por varias reglas de selección lo que a menudo conduce a una emisión débil y de larga duración que podría denominarse fosforescencia porque, generalmente está prohibida por el espín (Allendorf et al., 2009).

Para mostrar el efecto de sensibilización de los iones orgánicos Cui et al., (2012) muestran en su estudio un ejemplo representativo de los MOF lantánidos luminiscentes. Presentan los MOF de lantánidos isoestructurales ( $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ) que contienen 4,4'-disulfuro-2,2'-bipiridina-N, N'-dióxido. Para este tipo de MOF, se determinó que los niveles de energía del estado triplete del enlazador orgánico presentan un valor de  $24038 \text{ cm}^{-1}$ ; por lo tanto, el enlazador orgánico es capaz de sensibilizar los iones trivalentes  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$  y  $\text{Dy}^{3+}$  (Ver Figura 1.4). Experimentalmente se han observado fuertes emisiones en los MOF de  $\text{Eu}^{3+}$  y  $\text{Tb}^{3+}$ .

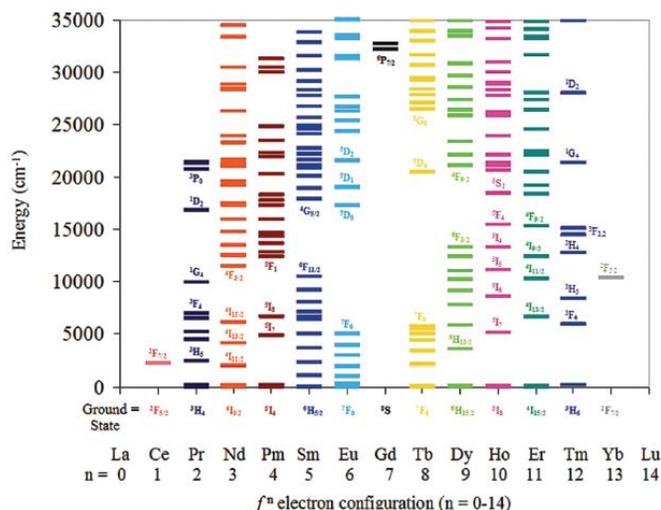


Figura 1.4.- Resumen de los niveles de energía electrónica en estado excitado para Ln<sup>3+</sup>. (Cui et al., 2012)

### 1.3.1.3.- Luminiscencia de transferencia de carga

Los estados excitados de los complejos metálicos luminiscentes pueden estar dominados por los siguientes tipos de reacciones de transferencia de carga: transferencia de carga de metal a ligando (MLCT), transferencia de carga de ligando a metal (LMCT) y transferencia de carga intraligando (ILCT), (Ma et al., 2013).

La luminiscencia de transferencia de carga se observa frecuentemente en MOF constituidos a base de metal d<sup>10</sup>. Por ejemplo, MOF Cu<sub>3</sub>(C<sub>7</sub>H<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O (C<sub>7</sub>H<sub>2</sub>NO<sub>5</sub> = 4-hidroxipiridina-2,6-dicarboxilato) exhibe fluorescencia azul a 398 y 478 nm tras la excitación a 333 nm, mientras que CuAg<sub>2</sub>(C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>NO<sub>5</sub>)<sub>2</sub> y el enlazador orgánico libre 4-hidroxipiridina-2,6-dicarboxilato muestra fluorescencia verde a 515 y 526 nm tras la excitación a 358 y 365 nm respectivamente.

Cui et al., (2012) afirmaron que las estructuras de la banda de energía calculadas indican que la luminiscencia del MOF Cu<sub>3</sub>(C<sub>7</sub>H<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O se atribuye a MLCT desde los orbitales

Cu-3d hasta O-2p y N-2p, mientras que la luminiscencia de  $\text{CuAg}_2(\text{C}_7\text{H}_3\text{NO}_5)_2$  se origina a partir de la transición  $\pi - \pi^*$  del ligando orgánico.

Existe una amplia variedad de sondas basadas en el MOF y su versatilidad sintética los hace ideales para el reconocimiento molecular. Allendorf et al. (2009) afirmaron que para que un MOF sirva de forma útil como sensor, debe poseer varias propiedades: (1) debe exhibir algún cambio en respuesta a una interacción con un analito; (2) dicho cambio, debe tener alguna especificidad de analito; (3) de manera óptima, la respuesta debe ser reversible (esto no es requerido para todos los casos); y (4) el cambio debe ser detectable.

La detectabilidad hace que, desde un punto de vista espectroscópico, la luminiscencia sea más atractiva que la absorción de luz, puesto que es más sensible, y, además, en ausencia de gran señal de fondo, se puede detectar un pequeño número de fotones utilizando técnicas de conteo de fotones.

En general, el mecanismo de detección de las sondas basadas en LMOF se puede clasificar en dos tipos: (1) Alteración de las propiedades de luminiscencia mediante el cambio del potencial redox de las fracciones incorporadas; (2) Enfriamiento de la intensidad óptica principalmente a través de las interacciones *host-guest*. Otro factor importante de las sondas basadas en LMOF es la selectividad. Para mejorar la selectividad se pueden utilizar tres estrategias: (1) Cambiar la interacción entre ligandos y analitos a través de la química *host-guest*; (2) alterar la interacción del grupo de metales con los analitos mediante enlaces químicos; y (3) controlar las distancias intermoleculares entre iones metálicos y ligandos (Wu et al., 2021).

### 1.3.2.- MOF como sensores electroquímicos

Las áreas altamente porosas de los MOF son capaces de alojar moléculas huésped (*guest*), así como catalizar objetos con alta capacidad catalítica, lo que proporciona una gran sensibilidad para la detección electroquímica. La porosidad de los materiales basados en MOF, permite que las moléculas huésped difundan en una estructura sin empaquetar. (Liu et al., 2018)

Pese al desafío que traen consigo los MOF con la transducción de señales para la modificación de superficies de electrodos, una parte de estos cumplen con los requisitos de detección electroquímica y se utilizan como materiales avanzados de electrodos, aunque sigue siendo necesaria la mejora de algunas propiedades. Afortunadamente, la porosidad de los MOF combinados con cierta clase de materiales funcionales (nanopartículas metálicas, nanoestructuras de carbono, polímeros y biomoléculas) favorece la introducción de la conductividad no nativa. Esto hace que el compuesto/ híbrido resultante posea las ventajas tanto de los MOF (alta porosidad con poros cristalinos ordenados) como de los otros materiales (propiedades eléctricas y catalíticas), mejorándose además las prestaciones electroquímicas. (Liu et al., 2018)

Como consecuencia, la combinación sinérgica de MOF y materiales funcionales amplían las aplicaciones del análisis electroquímico. A continuación, se resumen algunos diseños de sensores electroquímicos.

#### **1.3.2.1.- Ensayos electroquímicos tipo sándwich utilizando MOF como sondas externas**

En este tipo de sensores, la mejora tanto de la señal como de la selectividad podría lograrse mediante el uso de sondas externas de reconocimiento conjugadas con nanomateriales como nanopartículas metálicas, grafeno y nanotubos de carbono. Los MOF con grandes áreas superficiales específicas y propiedades catalíticas y electroquímicas únicas, se están utilizando en mayor medida como potenciadores de señales electroquímicas para la construcción de estos ensayos sándwich. (Liu et al., 2018)

#### **1.3.2.2.- Sensores electroquímicos basados en la modificación de MOF en la superficie del electrodo**

Para conferir al electrodo no modificado una alta sensibilidad y cierta especificidad química, las superficies de estos se modifican con varios materiales. Se han estudiado varias opciones para este tipo de sensores, una de ellas resulta del uso de cristales de MOF con

actividad electrocatalítica para modificar la superficie del electrodo. Esto es posible gracias a los huecos disponibles, las altas áreas superficiales la afinidad de absorción específica y la variedad en el tamaño de los poros. (Liu et al., 2018)

### **1.3.2.3.- Electrodo modificado con MOF para la detección de iones metálicos electroquímicamente activos**

Las diversas composiciones y estructuras que presentan los MOF podrían ser capaces de ajustarse a la capacidad de absorción de iones de metales pesados para su eliminación selectiva, dando mejores resultados en comparación con los absorbentes convencionales. Aunque los estudios son prometedores, este enfoque presenta algunas desventajas como el consumo de tiempo y el elevado coste. (Liu et al., 2018)

## **1.4.- DESARROLLO DE ESTRATEGIAS ANALÍTICAS BASADAS EN EL EMPLEO DE MOF FLUORESCENTE PARA EL CONTROL DE CONTAMINACIÓN ALIMENTARIA.**

Tal y como ya se ha detallado en el apartado 1.3, el consumo de alimentos en mal estado puede provocar efectos nocivos en la salud. Por ello, es necesario el desarrollo de metodologías de evaluación que permitan detectar de forma rápida, sencilla y eficiente la presencia de toxinas en dichos alimentos.

Como ejemplo de un sistema de detección que cumpla los requisitos anteriormente expuestos, está la sonda desarrollada por Wang et al., (2021) la cual se basa en un MOF fluorescente. En su trabajo se desarrolla una sonda fluorescente ratiométrica de doble emisión construida mediante el acoplamiento covalente de MOF de lantánidos (EuMOF) con moléculas de 5-isotiocianato de fluoresceína (5-FITC) (Figura 1.5.a). En este trabajo, los investigadores eligieron el 5-FITC como centro de emisión alternativo debido a que el grupo tiocianato puede modificarse fácilmente con un grupo amina mediante una reacción de adición electrofílica. Además, en el artículo se detalla que 5-FITC tenía una fluorescencia verde sensible al pH que

podía combinarse con la fluorescencia roja de la emisión de  $\text{Eu}^{3+}$  para formar un sistema de reconocimiento de color de alta resolución.

A través de un sencillo método de dopaje, las sondas pueden componerse con películas de fibra de vidrio (Figura 1.5.b). Además, el dispositivo se integró con un sistema de monitorización portátil basado en un smartphone (Figura 1.5.c)

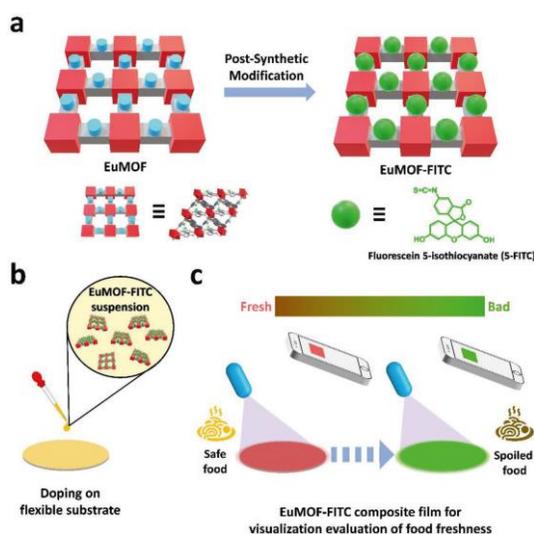


Figura 1.5.- Esquemas de la preparación de las películas (a) EuMOF-FITC y (b) EuMOF-FITC cargadas; (c) Esquema del dispositivo para el control visual de alimentos, por Wang et al., 2021.

Otro ejemplo interesante de la aplicación de los MOF como sensores, es el estudiado por Pang et al., 2023 donde se estudia el uso de un sensor basado en la fluorescencia de un MOF de Zn para detectar las aminas que se desprenden de las tintas de impresión de los envases. En este caso, la fluorescencia permite la detección altamente sensible y selectiva de aminas potencialmente dañinas. En este trabajo, se estudió la interacción de Zn-MOF en solución acuosa y se vio que los Zn-MOF activos en AIE (Emisión Inducida por Agregación) pierden fuerte fluorescencia en estas soluciones y se manifiestan como fluorescencia de “apagado”, hecho que podía estar relacionado con la relajación vibratoria del ligando en condiciones acuosas. Sin embargo, se consideró que el fenómeno de extinción de la fluorescencia en solución acuosa resultaba muy útil para promover Zn-MOF como ligando activo en AIE para realizar la

detección del modo de “encendido” en solución acuosa. Esto llevo a la conclusión de que se podían detectar analitos hidrofílicos en solución acuosa.

Según la opinión de los autores (Pang et al., 2023), los cristales Zn-MOF activos en AIE se rompieron en mayor medida en solución acuosa por los analitos a detectar, lo que resulto en la liberación de ligandos activos en AIE y la reemisión de fluorescencia después de la agregación del ligando. Esto resulto en un modo de fluorescencia “apagado y encendido”, que no requiere la incorporación de ninguna otra molécula huésped fluorescente, como un nuevo método y mecanismo para la detección MOF fluorescente.

## 2. Estado actual del problema

Los primeros controles en seguridad alimentaria si bien no eran tan exhaustivos, en lo que respecta al contenido de AB en los alimentos, más concretamente en pescados y productos fermentados, pusieron de manifiesto que la presencia de AB estaba relacionada con la higiene en todos los eslabones de la cadena alimentaria.

Actualmente el problema del análisis de la contaminación por aminas no reside en la higiene en la cadena de producción; este reside en la conservación y/o distribución del alimento. Por ello es necesario encontrar un método fiable de análisis para acelerar dicha cadena y/o detectar algún tipo de posible problema de la forma más rápida posible. Según el REGLAMENTO (UE) No 1019/2013 DE LA COMISIÓN y la AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición), únicamente existe un método de referencia para una clase de amina y un tipo de alimento en concreto, la histamina en el pescado y productos de la pesca; El método analítico de referencia es: la Cromatografía de Líquidos de alta eficacia (HPLC). A continuación, se resume el método de referencia indicado en la norma UNE-EN ISO 19343:2018.

### **UNE-EN ISO 19343:2018. Detección y cuantificación de histamina en pescado y productos de la pesca. Método basado en HPLC.**

La norma recoge de manera detallada el protocolo a seguir para extraer la histamina de pescados o productos de la pesca. El procedimiento de extracción extrae junto con la histamina otras aminas, por ello utiliza una separación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para separar las diferentes aminas y realizar la cuantificación de la histamina. Concretamente en la citada Norma UNE-EN ISO 19343:2018 se detalla que:

*“Este método permite la separación de la histamina dentro del conjunto de aminas biogénicas del pescado y los productos de la pesca. La muestra se extrae mezclándola con ácido perclórico. Se realiza una transformación química previa al paso por columna utilizando*

*cloruro de dansilo. Las aminas biogénicas y los componentes de la disolución se separan mediante HPLC utilizando una columna adecuada, con detección por UV. La concentración en masa de la histamina se calcula a partir de la proporción entre las áreas de los picos de histamina y del patrón interno, utilizando una curva de calibración”*

Teniendo en cuenta estas consideraciones, parece necesario el desarrollo de estrategias rápidas y sencillas que permitan detectar y, si es posible, cuantificar las AB. Y es en este marco de actuación en el que se plantea este TFG.

### 3. Objetivo

Como ya se ha comentado en el Apartado 1.1 las AB son una gran preocupación en el ámbito de la seguridad alimentaria, por lo que resulta necesaria la implantación de sistemas de análisis que permitan conocer de forma casi inmediata, como alternativa a los métodos convencionales de análisis (Ver Apartado 3.1), si la muestra se encuentra contaminada por estas aminas. Por ello, se plantea como objetivo principal de este trabajo el establecimiento de las bases metodológicas para lograr obtener un método de análisis fiable y rápido de la presencia de aminas en alimentos, empleando estrategias luminiscentes y el nanoMOF CuMOF-74.

Para la conservación de este objetivo general será necesario llevar a cabo la síntesis del nanoMOF CuMOF-74, estudiar sus propiedades luminiscentes, determinar el efecto de diferentes aminas sobre las propiedades luminiscentes del nanoMOF, optimizar las condiciones experimentales para el análisis de las aminas: concentración de MOF, temperatura y tiempo de reacción y determinar la respuesta del sensor desarrollado ante la presencia de diferentes concentraciones de aminas.

## 4. Metodología de trabajo.

En este trabajo de investigación se va a evaluar, como alternativa para el análisis de contaminación de alimentos, la alteración de las propiedades luminiscentes de un nanoMOF, cuya luminiscencia está basada en el ligando. A continuación, se detallarán los reactivos, materiales e instrumentación utilizada en la realización de este TFG

### 4.1.- REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- N, N-dimetilformamida (DMF)
- 2,5-dioxido-1,4-benzenedicarboxylate (DOBDC)
- Sal de Cobre ( $\text{CuAc}_2\text{H}_2\text{O}$ )
- Ácido poliacrílico (PAA)
- Agua miliQ
- Etanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )

### 4.2.- INSTRUMENTACIÓN

- Centrífuga Multi-Propósito, Alta velocidad, 1580R (Gyrozen, Gimpo-si, Gyeonggi, Corea del Sur)
- Espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse (Agilent Tech., Santa Clara, California, EE. UU.)
- Espectrofotómetro UV-VIS Genesys 10S (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, California, EE. UU.)
- Balanza analítica ME204 (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, EE. UU.)

### 4.3.- SÍNTESIS DEL Cu-MOF74.

La síntesis del Cu-MOF74 se realiza en condiciones presión atmosférica y temperatura de 5°C. Para ello se disuelven, con ayuda de un agitador, aproximadamente 0,5 g de ácido poliacrílico (PAA) en 10 mL de N, N-dimetilformamida (DMF). Simultáneamente, se disuelven 200 mg de sal de cobre ( $\text{CuAc}_2\text{H}_2\text{O}$ ) en 10 mL de DMF en un matraz Schlenk encamisado. (Figura 4.1)

Una vez disuelto el PAA, se añaden 300 mg de DOBCD (2,5-dioxido-1,4-benzenedicarboxylate) al matraz que contiene el PAA y se agita hasta disolución (Ver figura 4.1). Posteriormente se añade gota a gota la mezcla DOBDC + PAA al matraz Schlenk, manteniendo una agitación vigorosa durante 5 minutos. Durante la adición se observa que la mezcla toma un color verde brillante, tal como se observa en la Figura 4.1b.

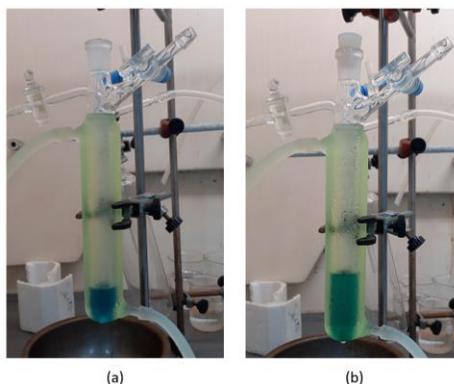


Figura 4.1.- Síntesis del Cu-MOF 74, apreciación del cambio de color antes (a) y después de la adición del ligando (b).

Es necesario mantener la mezcla en agitación durante 3 días a una temperatura constante de 5 °C. Para ello se hace recircular isopropanol por la parte del encamisado. Una vez transcurridos los tres días, se procede al lavado del producto resultante con ayuda de una centrífuga. En la Figura 4.2 se muestran secuencialmente las diferentes etapas llevadas a cabo para purificar el MOF. Los lavados se realizan con el fin de eliminar las aguas madres, para ello se establece una velocidad de giro de la centrífuga de 4000 rpm y un tiempo de centrifugación

de 10 minutos. Los primeros dos lavados se realizan con 5 mL DMF mientras que los dos siguientes se realizan con 10 mL de Agua miliQ y el último de ellos con 10 mL de etanol (EtOH) (Figura 4.2.). Una vez realizados los cinco lavados, se extrae el líquido del recipiente dejando únicamente el sólido, conocido como *pellet*, tal y como se muestra en la Figura 4.2 (g). Finalmente, se deja secar el pellet en un lugar seco hasta obtener un sólido como el de la Figura 4.2.(h).

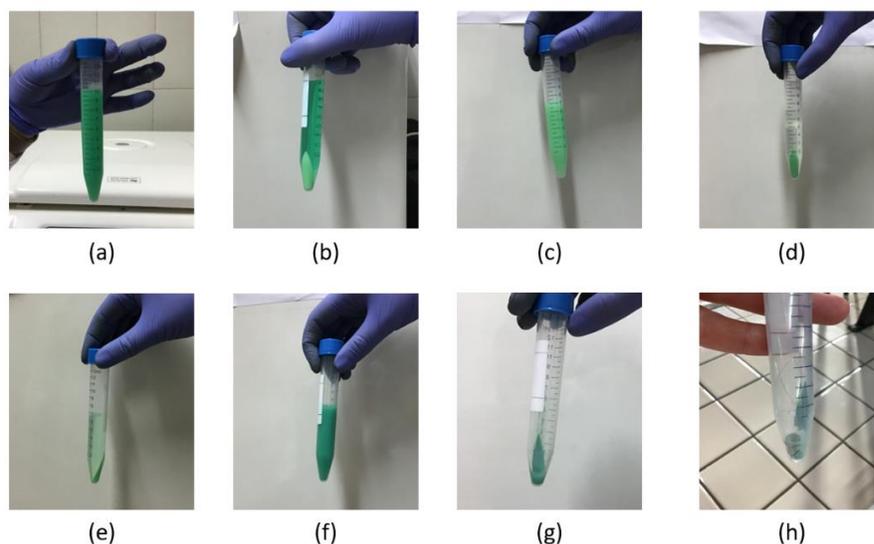


Figura 4.2.- Fases del lavado del MOF (a) y (b) lavados iniciales con DMF; (c) y (d) lavados con agua miliQ; (f) y (g) lavado final con EtOH; (h) producto obtenido del secado a vacío.

Este MOF, cuya caracterización en detalle está siendo desarrollada en el grupo de investigación en el que he realizado el TFG, forma parte de la familia de MOF-74 (Kim & Hong, 2021; Xiao & Liu, 2019),  $[M_x(\text{DOBDC})(\text{DMF})_x]$ . y (DMF), donde M puede ser un catión di o trivalente y se utiliza como medio disolvente la N, N-dimetilformamida.

## 4.4.- OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EXPERIMENTALES

### 4.4.1.- Selección de las longitudes de onda de medida y efecto de la concentración de MOF

Una vez sintetizado el MOF, este se almacena en estado sólido y seco para los análisis posteriores. En primer lugar, dado que la detección final será fluorescente, es necesario conocer las longitudes de onda de excitación y emisión ( $\lambda_{ex}$ ;  $\lambda_{em}$ ), para ello será necesario resuspender el MOF en agua. Pesando 2 mg de sólido que se diluyen en 2 mL de agua miliQ, se obtiene una suspensión de MOF a concentración 1 mg/mL (con peso molecular 478,94 g/mol, información proporcionada por el Grupo de Investigación teniendo en cuenta los estudios llevados a cabo sobre la estructura del MOF).

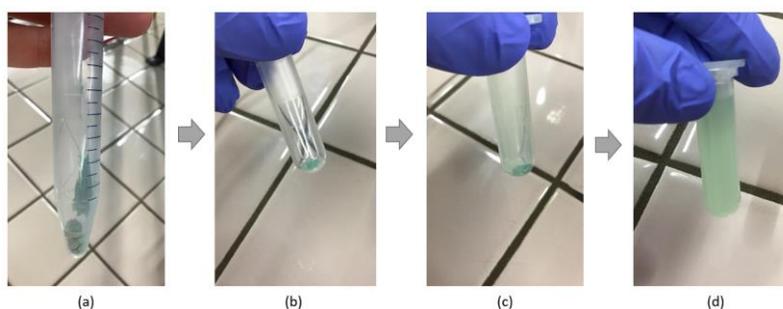


Figura 4.3.- Esquema sobre la realización de la resuspensión del MOF para conseguir la concentración deseada, 1 mg/mL.

Una vez se obtiene la suspensión de MOF, se procede a realizar el espectro UV-Vis de este, con la finalidad de tener una primera aproximación de la longitud de onda de excitación para ello se utiliza una cubeta de cuarzo de 1400  $\mu$ l de volumen con paso óptico 1 cm (Hellma Analytics). En primer lugar, será necesario hacer un blanco únicamente con agua miliQ; Una vez realizada la medida del blanco se procede a medir la absorbancia del MOF 1mg/mL en el rango 200 a 800 nm. En la Figura 4.4 se muestra el espectro de absorbancia obtenido. Las primeras bandas de la región del espectro UV (entre 200-300nm), podrían estar relacionadas con la dispersión de la luz, puesto que el MOF no es soluble en agua, tan sólo hemos realizado una suspensión acuosa del mismo. Sin embargo, la banda que aparece alrededor de 350 nm sí

podría estar relacionada con la longitud a la que es posible excitar el MOF para que posteriormente emita fluorescencia. Esta longitud de onda será seleccionada como punto de partida para evaluar las características fluorescentes del MOF.

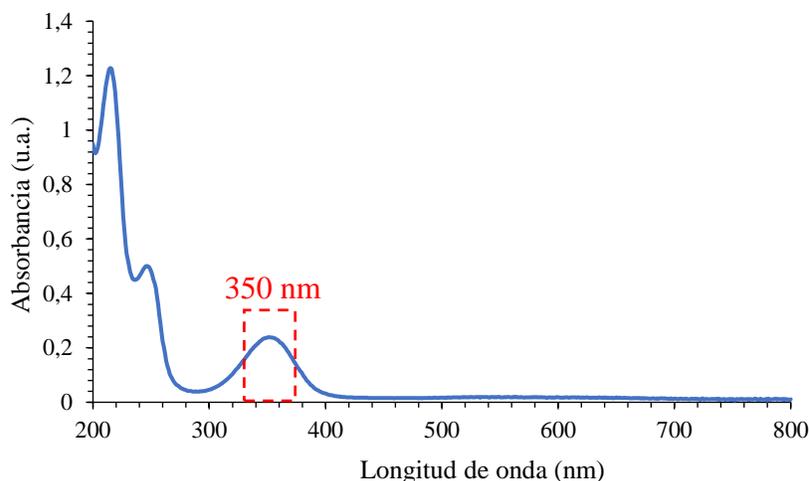


Figura 4.4.- Espectro de Absorbancia de la suspensión del MOF

Una vez conocida la longitud de onda aproximada de excitación, esta se fija en el equipo de Fluorescencia y se realiza el espectro de emisión, a continuación, fijando el máximo de emisión obtenido, se realiza el espectro de excitación. Dado que la fluorescencia es mucho más sensible que la espectroscopía UV-Vis, fue necesario trabajar con disoluciones más diluidas, concretamente, realizamos los espectros de excitación y emisión con las siguientes concentraciones de MOF: 0,5 mg/mL, 0,05 mg/mL y 0,005 mg/mL. Para obtener el espectro de emisión fluorescente, se partirá de una longitud de onda de inicio 50 unidades superior al valor de la longitud de onda de excitación, 400 nm. En la Figura 4.5 se muestra el espectro de emisión obtenido. A continuación, tras fijar la emisión a 550 nm, se realiza el espectro de excitación desde 290 nm a 450nm (Ver Figura 4.5). Los resultados obtenidos nos permitieron fijar como longitud de onda de excitación 350nm y de emisión 450 nm.

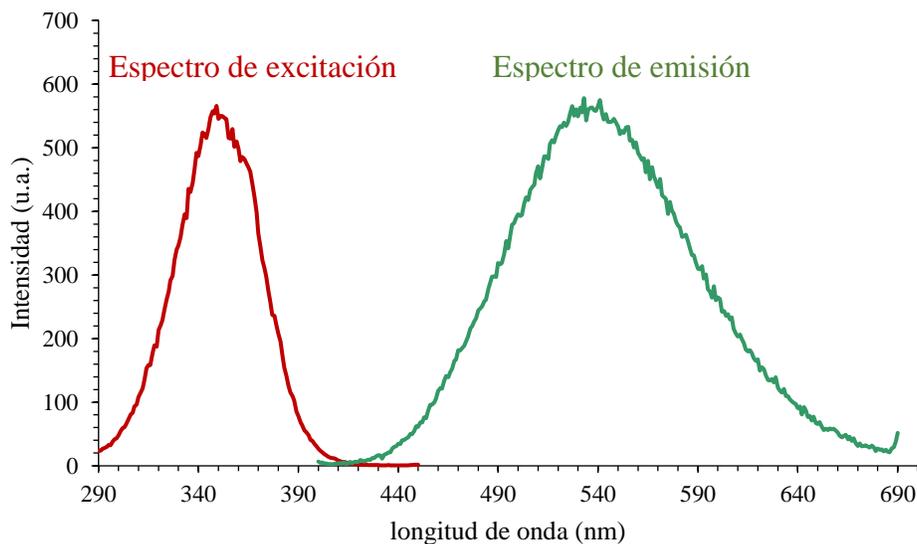


Figura 4.5.- Espectros de excitación y emisión del MOF.

Tras la selección experimental de las longitudes de onda de excitación y emisión, se llevó a cabo un estudio en el que se evaluó la intensidad de fluorescencia del MOF en función de su concentración. En la Figura 4.6 se puede observar que para las suspensiones más concentradas (1 mg/mL; 0,5 mg/mL) la intensidad de fluorescencia es más baja de lo esperado, esto puede deberse al fenómeno de autoabsorción, fenómeno por el cual se reduce la intensidad de fluorescencia. Para poder apreciar mejor este fenómeno se representan en un gráfico de barras, los valores máximos de los espectros. (Figura 4.6 b)

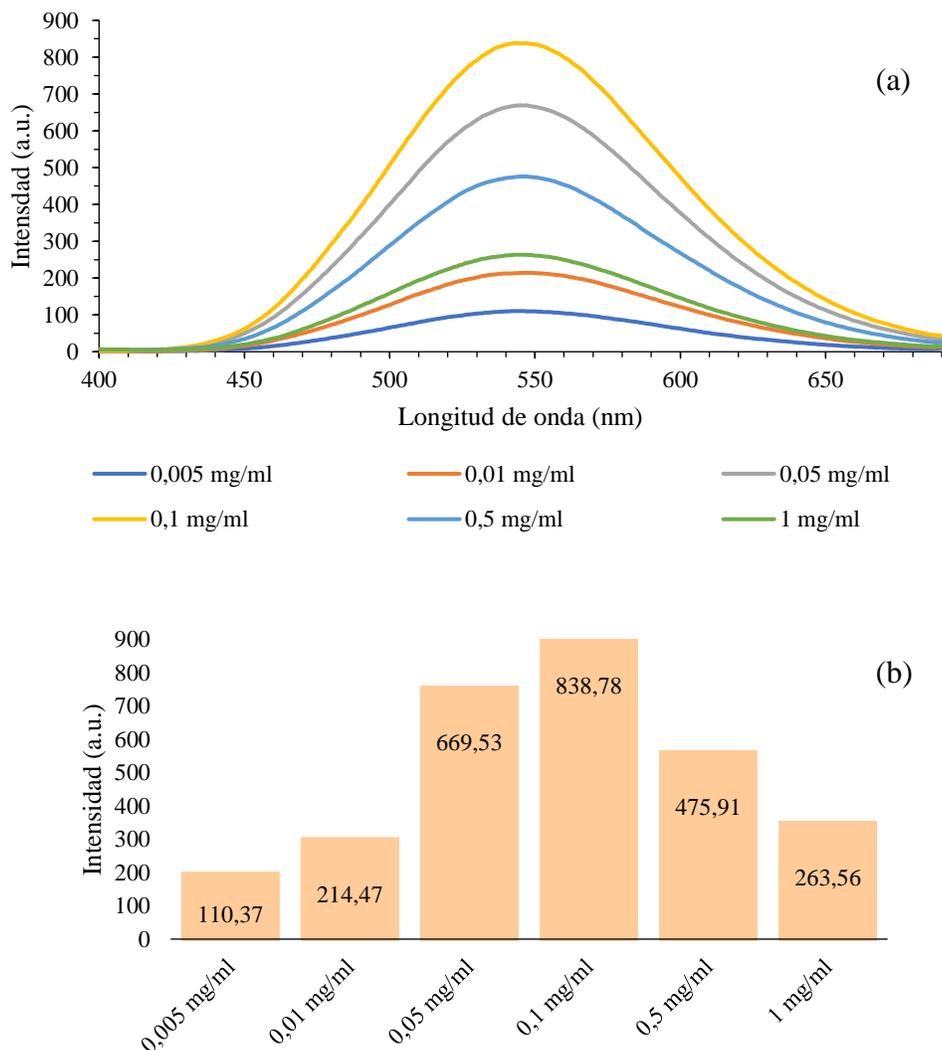


Figura 4.6.- Evaluación de la Intensidad de Fluorescencia en función de la concentración de MOF (desde 0,05 mg/mL hasta 1 mg/mL): a) espectros de emisión b) Representación de los valores máximos de los espectros de emisión.

Como se puede observar en las Figura 4.6 la suspensión que mejores resultados de intensidad proporciona es la correspondiente a la concentración de MOF 0,1 mg/mL. Siendo esta la concentración máxima de MOF que podría utilizarse en los posteriores ensayos de análisis de aminas. Es importante destacar el comportamiento del Cu-MOF74 en presencia de las AB, ya que este sufre una inhibición de la fluorescencia, por lo que en los posteriores ensayos evaluaremos la disminución de la intensidad de la señal fluorescente.

#### 4.4.2.- Evaluación del tiempo de reacción de las Aminas Biogénicas.

Tal y como se recoge en el apartado 4.4.1 la máxima concentración de MOF que se puede utilizar es 0,1 mg/mL. Sin embargo, dado que el objetivo es cuantificar la mínima cantidad de amina posible en alimentos, se observa que no es posible percibir una disminución clara de la señal de intensidad de Fluorescencia cuando la concentración de MOF es de 0,05 mg/mL. Sin embargo, para concentraciones de MOF de 0,01 mg/mL o superior, se detecta claramente esta disminución de la intensidad

Tal y como se ha mencionado en el apartado anterior, el Cu-MOF74 en presencia de las AB, sufre una inhibición de la fluorescencia cuya velocidad de reacción varía en función de la AB considerada. Por ello, es necesario establecer el tiempo al que se realizará la medida para cada una de las aminas objeto. Para este estudio de optimización del tiempo de reacción se estudiará el comportamiento del MOF ante dos aminas diferentes: Tiramina y Putrescina. En estos ensayos se hará reaccionar durante 58 minutos la amina a dos concentraciones diferentes, a dichos ensayos los denominaremos prueba cinética 1 y 2 respectivamente.

El primer ensayo se realizó con Tiramina, para ello se preparó una disolución de la amina a 2,7 mg/mL ( $2 \cdot 10^{-2}$  M), a partir de una disolución de concentración conocida (10 mg/mL). Una vez obtenida, se preparan dos disoluciones de 0,27 mg/mL y 0,027 mg/mL ( $2 \cdot 10^{-3}$  M y  $2 \cdot 10^{-4}$  M, respectivamente). Las pruebas cinéticas se realizan por separado, en primer lugar, se realiza lo que llamaremos “Prueba cinética 1”, para ello en una cubeta de 2 mL se añade 1 mL de MOF 0,01 mg/mL junto con 1 mL de la disolución de tiramina a 0,27 mg/mL, obteniéndose una nueva disolución con una concentración 0,005 mg/mL MOF + 0,135 mg/mL TIR (Figura 4.7). En segundo lugar, se realizó la “Prueba cinética 2”, donde se introducen 1 mL de MOF 0,01 mg/mL y 1 mL de la disolución de tiramina a concentración 0,027 mg/mL, para este segundo caso se obtiene una nueva disolución a concentración 0,005 mg/mL MOF + 0,0135 mg/mL TIR (Figura 4.8).

Se consideró como valor óptimo aquel que presenta una disminución próxima al 50% del  $(I_0 - I_1)_{\text{máx}}$ , donde  $I_0$  es la Intensidad inicial e  $I_1$  es la intensidad en presencia de amina al tiempo  $t$  considerado. En la Figura 4.7, se muestra, mediante una línea punteada roja, el instante de tiempo que cumple con el criterio anterior. Por lo que, para la tiramina, se puede estimar un tiempo de reacción para la medida 12 minutos. Así mismo, tal y como se observa en la Figura 4.8 no hubo disminución de la señal para concentraciones de tiramina 0,0135 mg/mL.

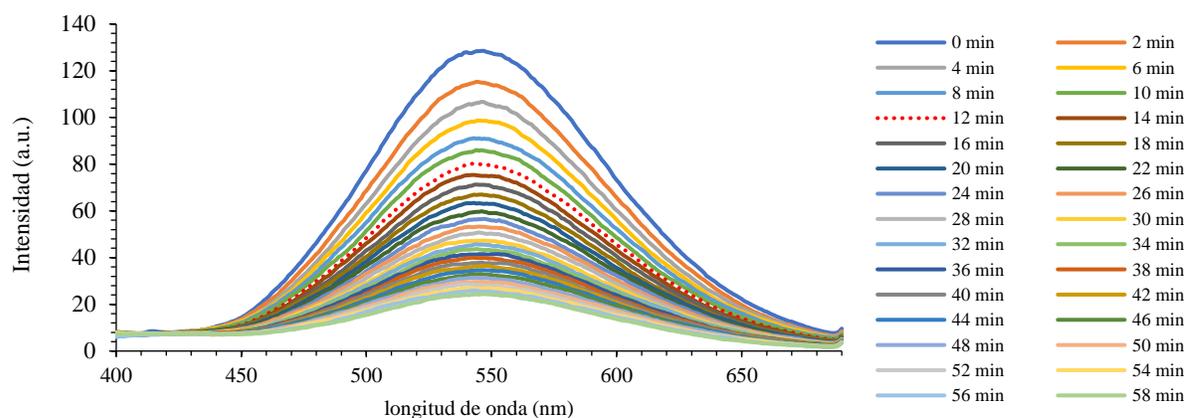


Figura 4.7.- Medidas de fluorescencia para una concentración de 0,005 mg/mL MOF + 0,135 mg/mL TIR (Tiramina) y distintos tiempos de reacción.

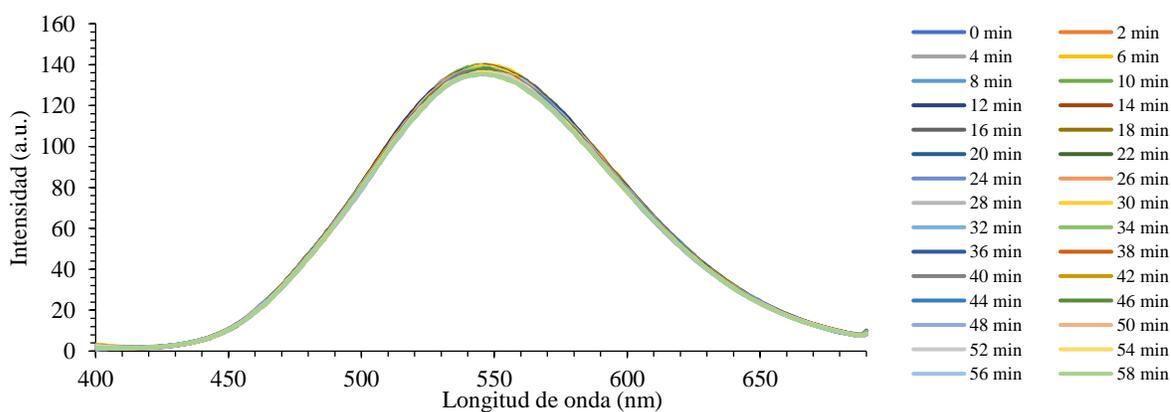


Figura 4.8.- Medidas de fluorescencia para una concentración de 0,005 mg/mL MOF + 0,0135 mg/mL TIR

El estudio de la cinética para la putrescina se muestra en las Figuras 4.9 y 4.10, para concentraciones de amina 0,176 y 0,0176 mg/mL ( $2 \cdot 10^{-3}$  M;  $2 \cdot 10^{-4}$  M). Los resultados muestran (ver Figura 4.9), que para esta amina la señal se reduce el 50 % en tan solo 4 min (línea roja punteada Figura 4.9). En lo que respecta a la concentración 0,0176 mg/mL, si bien se observa una disminución de la señal, esta no llega en ninguno caso a ser del 50%.

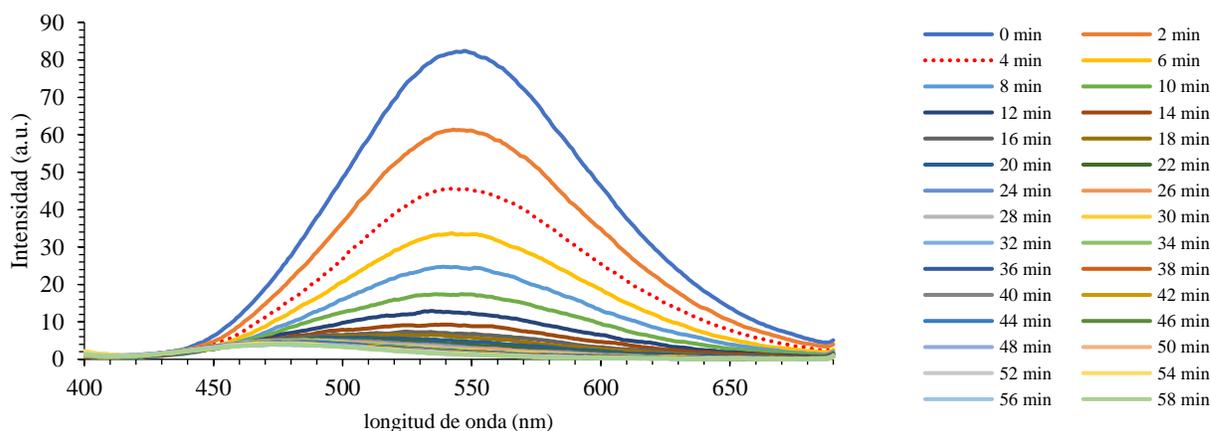


Figura 4.9.- Medida de fluorescencia a distintos tiempos de reacción para una concentración de MOF 0,005 mg/mL y de putrescina 0,176 mg/mL.

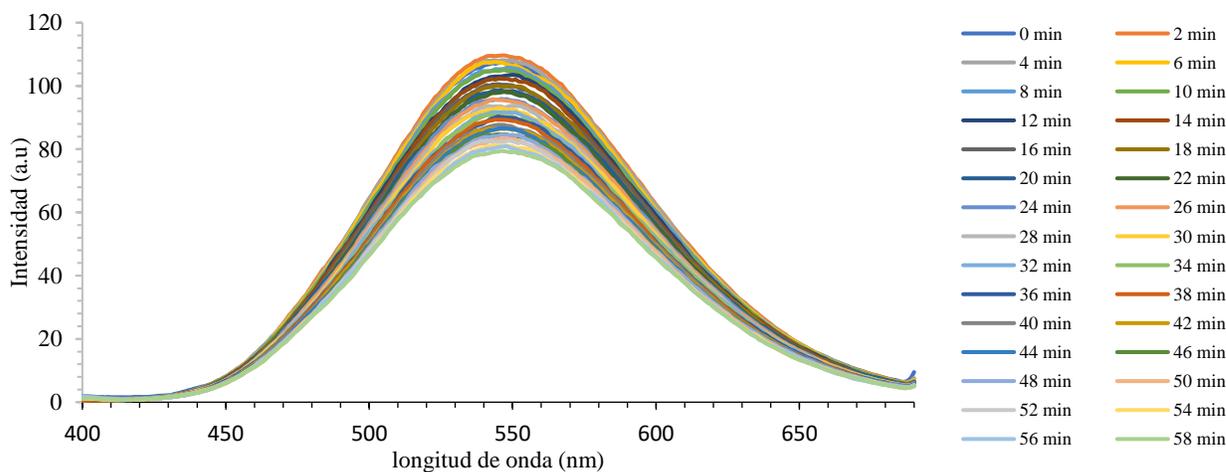


Figura 4.10.- Medida de fluorescencia a distintos tiempos de reacción para una concentración de MOF 0,005 mg/mL y de putrescina 0,0176 mg/mL.

Los ensayos realizados nos han permitido seleccionar como tiempos de reacción 12 minutos para la tiramina y 4 para la putrescina. Estos tiempos de reacción son los que se utilizarán para los ensayos posteriores.

#### **4.4.3.- Aplicación de la metodología analítica desarrollada al análisis de las Aminas Biogénicas.**

Con el fin de evaluar la linealidad de la respuesta analítica, se realizó un calibrado para cada una de las aminas estudiadas. En una primera aproximación se realizó el calibrado con cinco puntos, en lo que respecta a la tiramina, se parte de una disolución a concentración 100 mg/10 mL (0,073 M) y para la putrescina se parte de una disolución 8,8 mg/mL (0,1 M).

Para preparar la disolución de tiramina, se parte de una disolución más concentrada, en este caso 100 mg/10 mL, se prepara el calibrado en el rango de concentración de 0,27 a  $2,7 \cdot 10^{-3}$  mg/mL.

En la Figura 4.11 se muestran los espectros obtenidos para la tiramina con una concentración de MOF 0,005 mg/mL y con las siguientes concentraciones de tiramina: 0,27 mg/mL, 0,027 mg/mL,  $2,7 \cdot 10^{-4}$  mg/mL,  $2,7 \cdot 10^{-5}$  mg/mL. Se realiza también el espectro blanco correspondiente a la concentración de MOF considerada

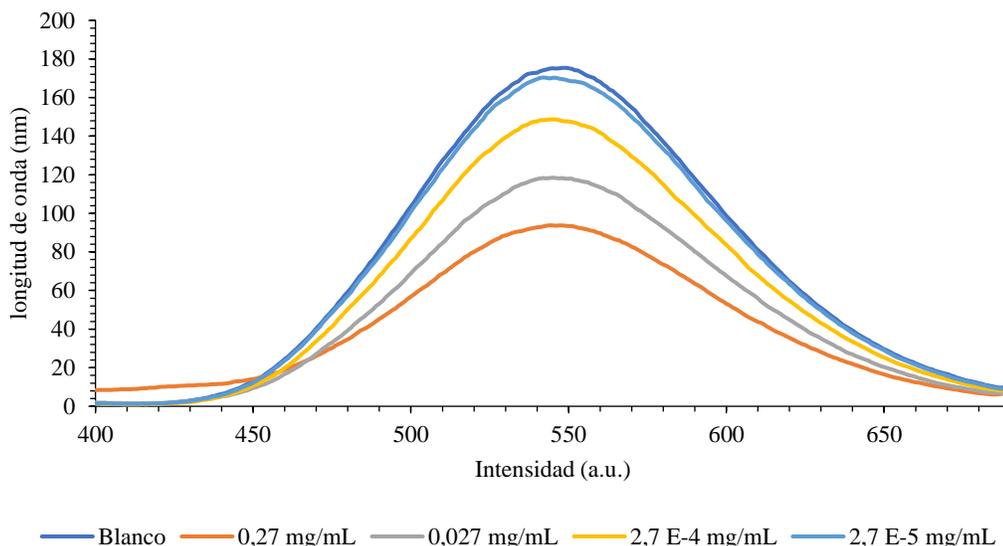


Figura 4.11.- Espectros de fluorescencia para el calibrado de Tiramina, para el análisis de la intensidad de fluorescencia a distintas concentraciones.

En la Tabla 4.1 se incluyen las intensidades máximas para cada punto del calibrado. Y en la Figura 4.11 el calibrado obtenido. Tal y como se observa en la figura, los puntos del calibrado se ajustan perfectamente a una función logarítmica, por ello representaremos el logaritmo de la concentración frente a la intensidad de fluorescencia para obtener el ajuste lineal correspondiente (ver Figura 4.13).

Tabla 4.1.- Cálculo de los valores máximos de Intensidad, para realizar un mejor análisis de los resultados de la Figura 4.11

MOF 0,005 mg/mL	Blanco	0,27 mg/mL TIR	0,027 mg/mL TIR	$2,7 \cdot 10^{-4}$ mg/mL TIR	$2,7 \cdot 10^{-5}$ mg/mL TIR
Máximo (In) (a.u)	157,42	93,82	118,49	148,75	170,42

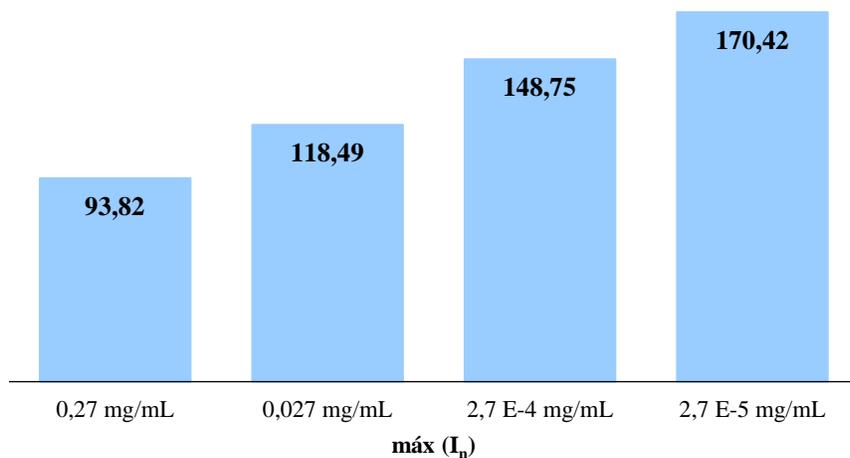


Figura 4.12.-Representación de los valores máximos de los espectros de emisión para MOF + Tiramina

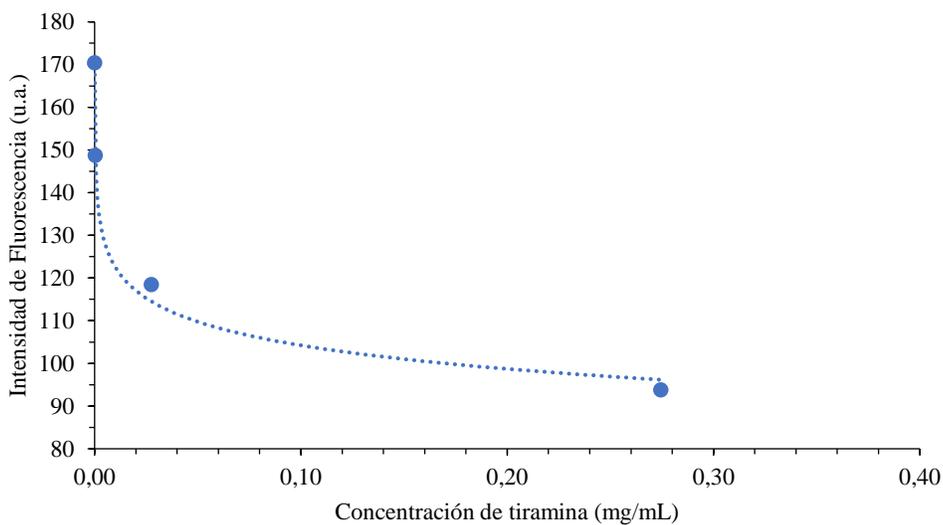


Figura 4.13.-Representación de intensidad máxima de fluorescencia vs. concentración.

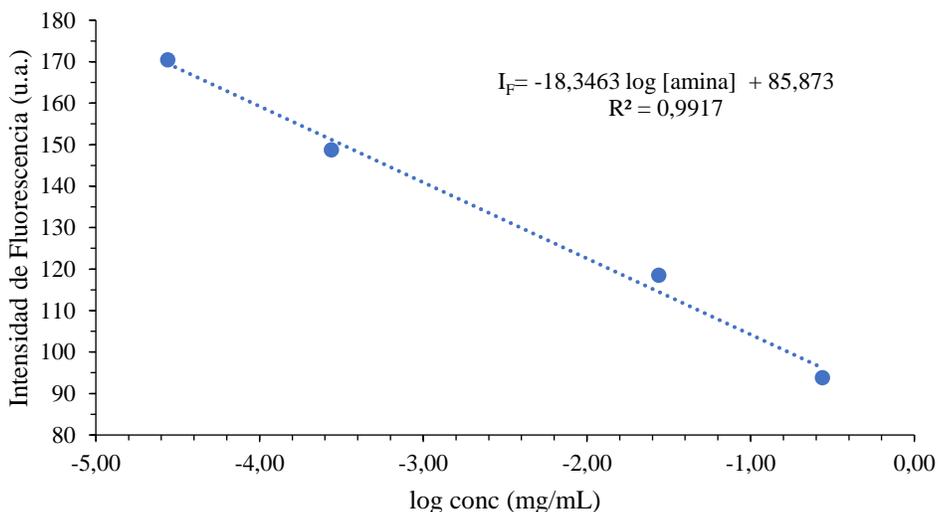


Figura 4.14.- Calibrado obtenido para la Tiramina en un rango de 0,27 mg/mL a  $2,7 \cdot 10^{-5}$  mg/mL.

Tal y como se observa en la Figura 4.13 la recta de calibrado que se obtiene es la siguiente:

$$I_F = -18,35 \log[Amina (mg/ml)] + 85,87 \quad (1)$$

Para poder hacer un mejor análisis de los resultados se calcula la diferencia entre la intensidad del MOF a concentración cero de Tiramina y el resto de las intensidades a una mayor concentración de esta, obteniéndose así el valor de la intensidad de la amina (Tabla 4.2). Los resultados de la Tabla 4.2, se muestran representados en la Figura 4.14.

Tabla 4.2.- Cálculo de la diferencia de intensidades respecto al valor base (Concentración de MOF)

MOF 0,005 mg/mL+	Blanco	0,27 mg/mL TIR	0,027 mg/mL TIR	$2,7 \cdot 10^{-4}$ mg/mL TIR	$2,7 \cdot 10^{-5}$ mg/mL TIR
Máximo ( $I_n$ ) (a.u)	157,42	93,82	118,49	148,75	170,42
máx ( $I_0$ ) – máx ( $I_n$ )	-	8160	56,93	26,66	5,00

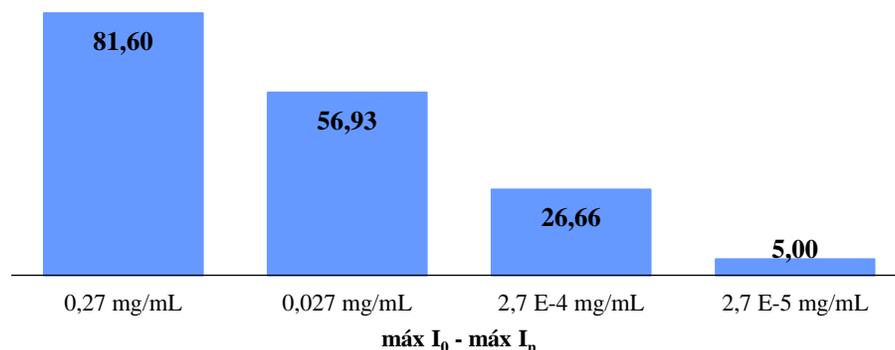


Figura 4.15.-Representación de los valores máximos de los espectros de emisión para MOF + tiramina.

La tabla 4.2 y la figura 4.15 ponen de manifiesto el efecto de la disminución de la fluorescencia en función de la concentración. Además, la Figura 4.12 reitera la premisa inicial, se inhibe la fluorescencia en presencia de las AB.

Para evaluar el efecto de la putrescina sobre el MOF se realizó un ensayo similar al de la tiramina. Para preparar la disolución de putrescina, se parte de una disolución más concentrada, en este caso 8,8 mg/mL. de la cual se tomaron 400  $\mu$ l y se diluyeron a 2000  $\mu$ l para obtener una concentración 1,76 mg/mL.

En la figura 4.15 se observa un resultado similar al de la figura 4.11. En este caso se representan los espectros de fluorescencia obtenidos para la putrescina con la misma concentración de MOF (0,005 mg/mL) y las siguientes concentraciones de putrescina: 0,176 mg/mL,  $1,76 \cdot 10^{-3}$  mg/mL,  $1,76 \cdot 10^{-4}$  mg/mL,  $1,76 \cdot 10^{-5}$  mg/mL.

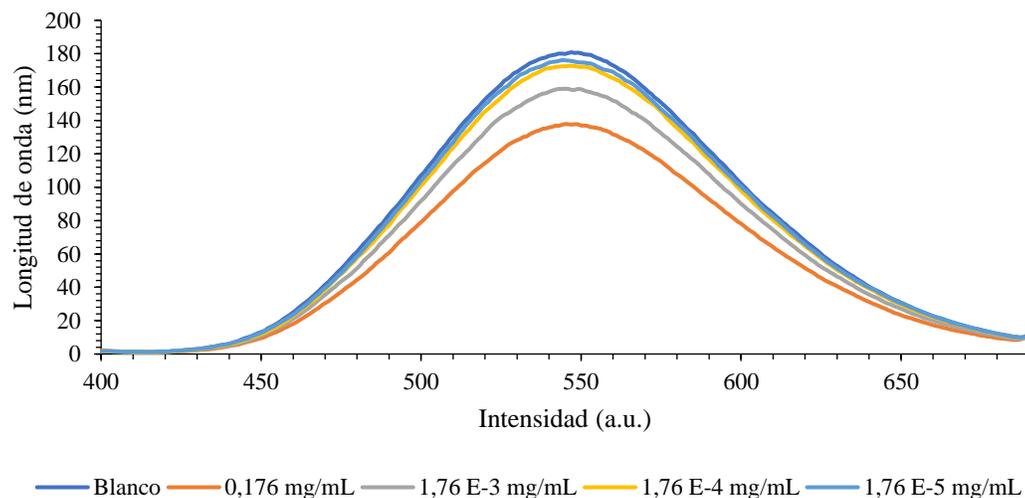


Figura 4.16.-Representación de los espectros de fluorescencia para el calibrado de Putrescina.

En la Tabla 4.3 se incluyen las intensidades máximas para cada punto del calibrado. Y en la Figura 4.16 el calibrado obtenido. Tal y como se observa en la Figura 4.17, los puntos del calibrado se ajustan perfectamente a una función logarítmica, por ello representaremos el logaritmo de la concentración frente a la intensidad de fluorescencia para obtener el ajuste lineal correspondiente (ver Figura 4.18).

Tabla 4.3.- Cálculo de los valores máximos de Intensidad, para realizar un mejor análisis de los resultados de la Figura 4.16

MOF 0,005mg/mL +	Blanco	0,176 mg/mL PUT	$1,76 \cdot 10^{-3}$ mg/mL PUT	$1,76 \cdot 10^{-4}$ mg/mL PUT	$1,76 \cdot 10^{-5}$ mg/mL PUT
Máximo (In) (a.u)	180,91	137,91	159,00	172,82	176,18

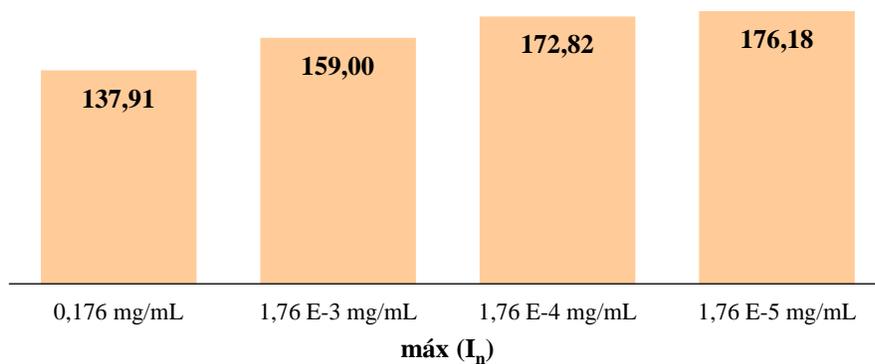


Figura 4.17.-Representación de los valores máximos de los espectros de emisión para MOF +Putrescina

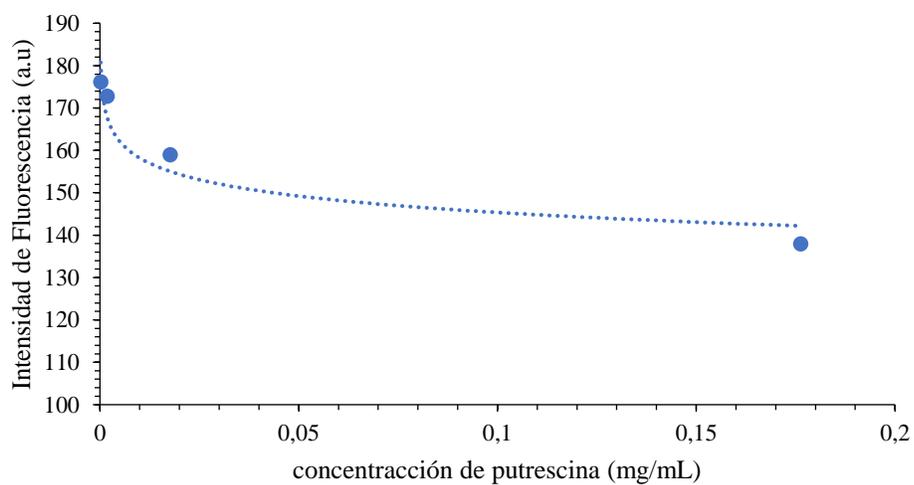


Figura 4.18.-Representación de intensidad máxima de fluorescencia vs. concentración.

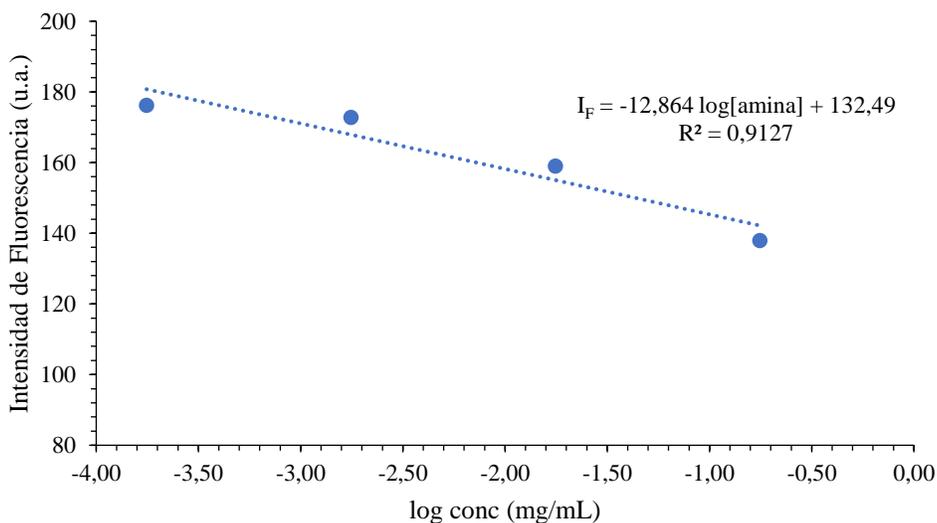


Figura 4.19.-Calibrado obtenido para la Putrescina en un rango de 0,176 mg/mL a  $1,76 \cdot 10^{-5}$  mg/mL

Tal y como se observa en la Figura 4.19 la recta de calibrado que se obtiene es la siguiente:

$$I_F = -12,86 \cdot \log[Amina (mg/mL)] + 132,49 \quad (2)$$

Para poder hacer un mejor análisis de los resultados se calcula la diferencia entre la intensidad del MOF a concentración cero de putrescina y el resto de las intensidades a una mayor concentración de esta, obteniéndose así el valor de la intensidad de la amina. Los resultados se recogen en la Tabla 4.4 y Figura 4.20.

Tabla 4.4.- Cálculo de la diferencia de intensidades respecto al valor base (Concentración de MOF)

MOF 0,005mg/mL +	Blanco	0,176 mg/mL PUT	$1,76 \cdot 10^{-3}$ mg/mL PUT	$1,76 \cdot 10^{-4}$ mg/mL PUT	$1,76 \cdot 10^{-5}$ mg/mL PUT
Máximo ( $I_n$ ) (a.u)	180,91	137,91	159,00	172,82	176,18
máx ( $I_0$ ) – máx ( $I_n$ )	-	43,00	21,91	8,09	4,73

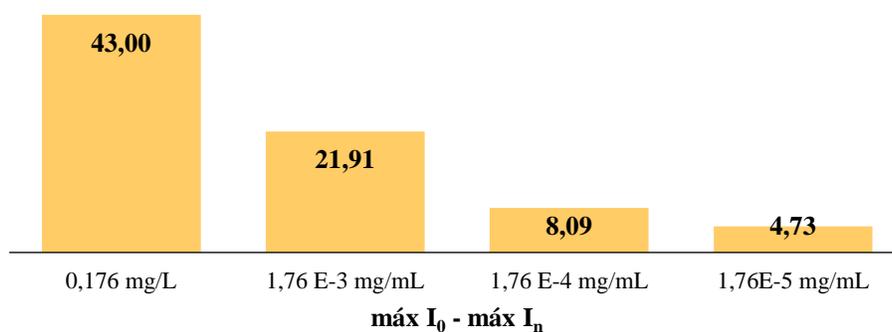


Figura 4.20.-Representación de los valores máximos de los espectros de emisión para Putrescina

Los resultados ponen de manifiesto que en una variación de concentración desde  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  la disminución de la señal varía desde 43 unidades a 4,73 para el patrón más concentrado y diluido respectivamente. Además, según lo expuesto en la Figura 4.17 se reitera la premisa inicial de que el CuMOF-74 sufre una inhibición de la fluorescencia en presencia de las AB correspondientes.

## 5. Conclusiones

El actual método de referencia además de largo y tedioso también resulta costoso a la instrumentación (UNE-EN ISO 19343:2018, pág. 8), por lo que resulta necesaria la implantación de un método más sencillo capaz de dar respuesta a los problemas demandados por el sector.

Este método, se prevé que resulte útil para los análisis rutinarios, sin embargo, el alcance de este proyecto no llega a demostrar ni a poner en práctica su aplicación en muestras reales, así pues, también se desconoce cómo será el tratamiento de la muestra una vez el sensor está desarrollado. Aun así, los resultados obtenidos en el laboratorio se consideran prometedores para el avance del desarrollo de este sensor.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que:

- El nanoMOF de Cu reacciona con las aminas biogénicas, dando lugar a una disminución de la fluorescencia de este, planteándose este hecho como una alternativa sencilla de análisis de aminas.
- El tiempo de reacción de la amina y el MOF varía en función de la amina estudiada. Hecho que puede facilitar la identificación de la amina correspondiente en el alimento.
- Si bien, no ha sido posible abordar el análisis de muestras reales, los resultados asociados a la estrategia analítica propuesta son prometedores, puesto que la sensibilidad del ensayo es elevado y coherente con la legislación vigente.

## 6. Referencias

- Allendorf, M. D., Bauer, C. A., Bhakta, R. K., & Houk, R. J. T. (2009). Luminescent metal-organic frameworks. *Chemical Society Reviews*, 38(5), 1330-1352. <https://doi.org/10.1039/b802352m>
- Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Venkateswarlu, R., Mohan, C. O., & Gopal, T. K. S. (2016). Biogenic amines in seafood: a review. En *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 53, Número 5, pp. 2210-2218). Springer India. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2224-x>
- Cai « “joe” » Zhou, H.-, & Kitagawa, S. (2014). Metal-Organic Frameworks (MOFs). *Chem. Soc. Rev*, 43, 5415. <https://doi.org/10.1039/c4cs90059f>
- Cui, Y., Yue, Y., Qian, G., & Chen, B. (2012). Luminescent functional metal-organic frameworks. En *Chemical Reviews* (Vol. 112, Número 2, pp. 1126-1162). <https://doi.org/10.1021/cr200101d>
- Foo, M. L., Matsuda, R., & Kitagawa, S. (2014). Functional hybrid porous coordination polymers. En *Chemistry of Materials* (Vol. 26, Número 1, pp. 310-322). <https://doi.org/10.1021/cm402136z>
- Kim, H., & Hong, C. S. (2021). MOF-74-type frameworks: tunable pore environment and functionality through metal and ligand modification. *CrystEngComm*, 23(6), 1377-1387. <https://doi.org/10.1039/d0ce01870h>

- Kustov, L. M., Isaeva, V. I., Přeck, J., & Bisht, K. K. (2019). Metal-organic frameworks as materials for applications in sensors. En *Mendeleev Communications* (Vol. 29, Número 4, pp. 361-368). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.07.001>
- Liu, L., Zhou, Y., Liu, S., & Xu, M. (2018). The Applications of Metal–Organic Frameworks in Electrochemical Sensors. En *ChemElectroChem* (Vol. 5, Número 1, pp. 6-19). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/celec.201700931>
- Ma, D. L., He, H. Z., Leung, K. H., Chan, D. S. H., & Leung, C. H. (2013). Bioactive luminescent transition-metal complexes for biomedical applications. En *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 52, Número 30, pp. 7666-7682). <https://doi.org/10.1002/anie.201208414>
- Pang, Y., Li, S., Wang, H., Zhang, N., Chen, R., Tan, C. S., Xia, Y., Zhao, H., Cao, Y., & Liang, J. (2023). Small-molecular amines fluorescence sensor based on the destruction of an aggregation-induced-emission-active Zn metal-organic framework. *Journal of Solid-State Chemistry*, 317. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2022.123451>
- Reglamento (UE) n° 1019/2013 de la Comisión, de 23 de octubre de 2013, que modifica el anexo I del Reglamento (CE) n° 2073/2005 en lo relativo a la histamina en los productos de la pesca.*
- Ruiz-Capillas, C., & Herrero, A. M. (2019). Impact of biogenic amines on food quality and safety. En *Foods* (Vol. 8, Número 2). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/foods8020062>
- Sarango Simbaña, L., Ceresuela, C., & Zornoza Encabo, J. (s. f.). *Recubrimientos controlados de estructuras metalorgánicas porosas para su aplicación en sensores y membranas de nanofiltración / Lilian Sarango Simbaña*. <http://zaguan.unizar.es>

- Scientific Opinion on risk-based control of biogenic amine formation in fermented foods. (2011). *EFSA Journal*, 9(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>
- Silla Santos, M. H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3), 213-231. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)
- Smith, T. A. (1981). Amines in food. *Food Chemistry*, 6(3), 169-200. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(81\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0308-8146(81)90008-X)
- UNE-EN ISO 19343:2018, Microbiología de la cadena alimentaria. Detección y cuantificación de histamina en pescado y productos de la pesca. Método basado en HPLC. (ISO 19343:2017).
- Wang, J., Li, D., Ye, Y., Qiu, Y., Liu, J., Huang, L., Liang, B., & Chen, B. (2021). A Fluorescent Metal–Organic Framework for Food Real-Time Visual Monitoring. *Advanced Materials*, 33(15). <https://doi.org/10.1002/adma.202008020>
- Wu, K. J., Wu, C., Fang, M., Ding, B., Liu, P. P., Zhou, M. X., Gong, Z. Y., Ma, D. L., & Leung, C. H. (2021). Application of metal–organic framework for the adsorption and detection of food contamination. En *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 143). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116384>
- Xiao, T., & Liu, D. (2019). The most advanced synthesis and a wide range of applications of MOF-74 and its derivatives. En *Microporous and Mesoporous Materials* (Vol. 283, pp. 88-103). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2019.03.002>