



**UNIVERSITAT
JAUME·I**

Escuela de Doctorado de la Universitat Jaume I

**Desarrollo de nuevos materiales inteligentes como sensores para
la seguridad alimentaria y la detección de gases contaminantes**

Iván Muñoz Capdevila

Directores:

Dra. Belén Altava Benito

Dr. Eduardo García-Verdugo Cepeda

Castellón de la Plana, Diciembre 2022



**UNIVERSITAT
JAUME·I**

Programa de Doctorado en Química Sostenible

Escuela de Doctorado de la Universitat Jaume I

**Desarrollo de nuevos materiales inteligentes como
sensores para la seguridad alimentaria y la detección de
gases contaminantes**

**Memoria presentada por Iván Muñoz Capdevila para
optar al grado de doctor por la Universitat Jaume I**

Iván Muñoz Capdevila

Belén Altava Benito

Eduardo García-Verdugo Cepeda

Castellón de la Plana, Diciembre 2022

Financiación

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una ayuda predoctoral para la formación de doctores y doctoras en empresas valencianas (FDEGENT/2018/003) concedida por la Generalitat Valenciana.

La financiación de la actividad investigadora ha sido posible gracias a los proyectos concedidos por el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (MINECO CTQ2015-68429R), por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-098233-B-C22), por la Generalitat Valenciana (GV-Prometeo 2016-071 y AICO/2021/039) y por la Universitat Jaume I (UJI-B2019-40 y UJI-B2021-31).

Licencias

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS. *Para poder reutilizar contenido de tu tesis te han de solicitar expresamente el permiso, excepto en los casos previstos por la Ley de Propiedad Intelectual (como la copia privada o el derecho de citación).*

Agradecimientos

Llegado el momento, solo resta agradecer, y puesto que no es algo a lo que uno esté acostumbrado, a toda la gente que ha formado parte de esta etapa de formación, así como a aquellas personas que forman y formaban parte de mi vida antes de esta experiencia de crecimiento personal.

Inicialmente, mi mayor gratitud hacia Kryptonita S.L. por brindarme la oportunidad de desarrollar y darle forma a este proyecto. A mis directores la Profesora Dra. Belén Altava y el Profesor Dr. Eduardo García-Verdugo, por permitirme y brindarme la oportunidad de enriquecer mi formación académica durante estos años y tenerlos como referentes debido a su constante esfuerzo, pasión y rigor científico. Gracias Eduardo por la motivación que me has transmitido y las miles de ideas en el día a día para contrarestar los malos momentos. Gracias Belén por tu enseñanza y plena disponibilidad en cualquier circunstancia de ayuda que he necesitado.

Así mismo expresar mi agradecimiento a los recién jubilados y fundadores del grupo Dra. María Isabel Burguete y al Dr. Santiago V. Luis, por su sabiduría y disponibilidad durante la realización de parte de esta investigación. Especialmente, quiero agradecer y mencionar por su ayuda, su disposición incondicional y su apoyo como compañera a la Dra. María Maciá. Del mismo modo, dar las gracias al Dr. Raúl Porcar por sus consejos, conocimientos y grandes virtudes para solucionar cualquier obstáculo surgido durante este periodo. A su vez, me gustaría extender mi agradecimiento al Departamento de Química Inorgánica y Orgánica y los Servicios Centrales de Instrumentación Científica por los medios puestos a mi alcance para lograr alcanzar el objetivo marcado.

Asimismo, esta etapa carecería de sentido sin los momentos compartidos con las personas con las que he disfrutado este tiempo y he tenido la suerte de conocer. Muchos innumerables momentos entre cenas, congresos, cumpleaños e, incluso, viajes. Edgar, María Adriana, Ferran, David, Daniel, Roberta y Julián. Gracias, mi pequeña tropa química y de aventuras. Y ahora, Sergio, José Juan, Marc, Miguel, Samira y futuras promesas, sois presente y futuro. Gracias por vuestra compañía diaria y el gran ambiente que dais al laboratorio, el grupo se queda en buenas manos y os deseo mucha suerte en vuestras etapas. También, en particular, esta etapa me ha dejado conocer personas excepcionales como Nacho o Armando que, a pesar de la distancia, me han demostrado que el mundo está lleno de gente que merece la pena conocer y, quién sabe, volver a ver.

También quiero recordar en estas líneas a mis compañeros de carrera y, especialmente, aquellos que siguen estando presentes día a día de una forma u otra. Cada uno ha tomado su camino, pero el contacto y el cariño no se pierde por mucho que pase el tiempo. Ojalá no dejemos de juntarnos para mantener ese espíritu de grupo y recordar viejos tiempos como gente madura, responsable y sensata que en algún momento no fuimos.

No podían faltar unas palabras para mi segunda familia, mis amigos o, lo que sería lo mismo, mi bombona de oxígeno. Gracias por hacerme olvidar etapas oscuras, por hacerme sentir vivo con risas, momentos absurdos y saber reírnos de nosotros mismos, ya que lo hacemos mejor que nadie. Sois mi caparazón y “tortuga”, vosotros me entendéis.

Al meu amoret, Bárbara. La mejor casualidad que me ha pasado y me cuesta encontrar palabras para poder definir, si se puede, en lo que te has convertido en mi vida y la huella que dejas. Gracias por atreverte a conocerme, por tu entrega, por quedarte a mi lado y dejarme quererte. Parte de esto, lleva tu esencia, firma y estilo. Como muchas veces te habré dicho, esto no tendría color sin ti.

Como no podía faltar, a mis padres, Paco y Rosa. Vosotros sois los responsables de permitirme escribir estas palabras y haberme dado todo lo que habéis podido y más desde que empecé a andar por este mundo, sin yo haber estado siempre a la altura. No sé cual es la definición de “padre y madre”, pero puedo asegurar que podría llevar vuestro nombre grabado. Por último, estas últimas palabras y mi dedicación más especial va dirigida a mis iaios, Rosa y Joaquín. Vuestra estrella os echa mucho de menos y, ojalá, os pudiera leer estas palabras que estoy escribiendo mientras me caen lágrimas por saber que no vais a poder estar y seguir escribiendo mi historia a vuestro lado. Sin embargo, sé que estaréis ahí y os llevaré grabados para siempre. Gracias por todo, os quiere vuestro nieto.

Resumen de la Tesis

Esta memoria está organizada siguiendo un esquema tradicional, pero se caracteriza por comenzar con un prefacio que sitúa el contexto de la propia tesis doctoral, el cual viene seguido de una introducción y los objetivos establecidos. Posteriormente, continúa con la exposición de cuatro capítulos donde se exponen los resultados obtenidos y las conclusiones extraídas individualmente para cada uno. Finalmente, se describe la parte experimental.

En el Capítulo I se ubica al lector dentro del entorno de este trabajo, introduciendo los conceptos más relevantes relacionados con la seguridad alimentaria tales como regulación, etiquetado y alergias, así como definiendo los tipos de sistemas de detección en la industria alimentaria. Posteriormente, se definen y clasifican los líquidos iónicos con la finalidad de contextualizar su importancia y facilitar la comprensión de su relevancia en el presente trabajo. Finalmente, se resume el estado actual del arte con respecto a las aplicaciones de líquidos iónicos en el desarrollo de sistemas de detección para la industria alimentaria.

En el Capítulo II se resumen los objetivos generales establecidos para desarrollar la presente Tesis Doctoral.

En el Capítulo III se describe el desarrollo de un prototipo de kit de análisis para la detección en superficie de proteínas en el marco del proyecto de I+D de la empresa Kryptonita S.L. desde una perspectiva empresarial enfocada al lanzamiento de un producto comercial. En este apartado, el objetivo se basa en el desarrollo de un sistema sencillo y económicamente viable para su empleo como sistema de detección colorimétrica para la validación mediante una respuesta positiva/negativa de los protocolos de limpieza establecidos en la industria alimentaria. De este modo, se detalla la prueba de concepto inicial y el avance de la investigación desde la evaluación de las respectivas pruebas de campo hasta la legalización del producto.

El Capítulo IV describe el desarrollo de líquidos iónicos prácticos a partir de compuestos de partida basados en derivados de aminoácidos y ácidos naturales. El capítulo comienza con el estudio de diferentes estrategias para la síntesis de las α,β -aminoamidas como compuestos derivados de los aminoácidos y la evaluación del Factor E con el fin de optimizar la metodología en el contexto de la Química Sostenible. Posteriormente, una familia de compuestos se prepara con el objetivo de evaluar el efecto del tipo de aminoácido, de la cadena lateral introducida y del ácido empleado.

Tras su síntesis, se reflejan los estudios de caracterización y se evalúa la ionicidad de estos compuestos y la tendencia con relación a ΔpK_a con respecto a lo referenciado en la bibliografía, así como un cribado inicial para estimar y determinar el perfil no toxicológico. Finalmente, se detalla su aplicación en la preparación de un tejido inteligente mediante la inmovilización de una sonda de pH gracias a su naturaleza modulable, la cual se refleja en el carácter hidrofílico/hidrofóbico y se evalúa la sensibilidad colorimétrica del sistema frente a un análisis tal como las aminas volátiles.

El Capítulo V recoge el diseño, metodología y preparación de membranas basadas en líquidos iónicos poliméricos de naturaleza higroscópica. La estrategia está basada en la polimerización tipo tiol-eno a partir de la aminólisis de una unidad monomérica de naturaleza iónica que contiene un doble enlace y un anillo de tiolactona. Asimismo, se detallan los estudios de respuesta colorimétrica sensible al grado de humedad relativa controlada mediante la inmovilización de diferentes sondas sensibles al pH.

El capítulo VI presenta la aproximación sobre cómo la impresión 3D a través del diseño digital facilita la obtención de materiales avanzados con geometrías complejas. En este caso, consiste en obtener materiales avanzados con grupos epóxido a partir de la polimerización por impresión 3D de una mezcla optimizada y la preparación de líquidos iónicos soportados mediante la funcionalización posterior del material avanzado. Posteriormente, se estudia y optimiza una metodología para la inmovilización de tres tipos de sondas colorimétricas y se evalúa la respuesta de los sistemas frente a aminas biogénicas liberadas en el deterioro de alimentos, tales como pollo y bacalao. Finalmente, se selecciona una cuarta sonda colorimétrica para comparar la metodología de inmovilización en el líquido iónico soportado y la funcionalización covalente y, de este modo, estimar y determinar las ventajas en términos de diseño y respuesta del sistema evaluado.

En el Capítulo VII se describen los procedimientos sintéticos de los diferentes productos obtenidos durante este trabajo, así como las técnicas empleadas para su caracterización y las diferentes metodologías empleadas para la evaluación de su respuesta y sensibilidad como sistemas de detección.

Abreviaturas

Todas las abreviaturas utilizadas en este trabajo hacen referencia a su acrónimo en inglés.

| | |
|----------------|--|
| 1-MCP | 1-metil ciclopropeno (<i>1-methyl cyclopropene</i>) |
| 2-MeTHF | 2-metil tetrahidrofurano (<i>2-methyl tetrahydrofuran</i>) |
| 3DP | Impresión tridimensional / Impresión 3D (<i>three-dimensional printing / 3D printing</i>) |
| ACN | Acetonitrilo (<i>Acetonitrile</i>) |
| AcOEt | Acetato de etilo (<i>Ethyl Acetate</i>) |
| AE | Economía atómica (<i>Atom Economy</i>) |
| AIL | Líquido iónico aprótico (<i>Aprotic Ionic Liquid</i>) |
| AM | Fabricación aditiva de materiales (<i>Additive Manufacturing</i>) |
| AMP | Envasado antimicrobiano (<i>Antimicrobial Packaging</i>) |
| AO7 | Acid Orange 7 (<i>2-naphthol Orange</i>) |
| ASTM | Sociedad de Americana para Pruebas y Materiales (<i>American Society for Testing and Materials</i>) |
| ATP | Adenosín Trifosfato (<i>Adenosine Triphosphate</i>) |
| ATRP | Polimerización por transferencia de átomos (<i>Atom Transfer Radical Polimerization</i>) |
| BAPO | Óxido de fenilbis(2,4,6-trimetilbenzoil)fosfina (<i>phenilbis(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide</i>) |

| | |
|--|--|
| BAs | Aminas biogénicas (<i>Biogenic amines</i>) |
| BCG | Verde de bromocresol (<i>Bromocresol green</i>) |
| BCP | Morado de bromocresol (<i>Bromocresol Purple</i>) |
| BF₃(OEt)₂ | Eterato de trifluoruro de boro (<i>Boron trifluoride etherate</i>) |
| BHA | Butilhidroxianisol (<i>Butylated hydroxyanisole</i>) |
| BHT | Butilhidroxitolueno (<i>Butylated hydroxytoluene</i>) |
| BJ | Inyección del pegamento (<i>Binder Jetting</i>) |
| BMiMNTf₂ | Bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazolio (<i>1-Butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide</i>) |
| BMiMOAc | Acetato de 1-butil-3-metilimidazolio (<i>1-Butyl-3-methylimidazolium acetate</i>) |
| BmpyNTf₂ | Bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-1-metilpirrolidinio (<i>1-butyl-1-methylpyrrolidinium bis-(trifluoromethylsulfonyl)imide</i>) |
| BOC | Terc-butiloxicarbonilo (<i>Tert-butyloxycarbonyl</i>) |
| BODIPY | 4-4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (<i>4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene</i>) |
| BPB | Azul de bromofenol (<i>Bromophenol Blue</i>) |
| BTB | Azul de bromotimol (<i>Bromothymol Blue</i>) |
| Cad | Cadaverina (<i>Cadaverine</i>) |

| | |
|-------------------------------------|---|
| Cbz | Benciloxicarbonilo (<i>Benzyloxycarbonyl</i>) |
| CFIA | Agencia canadiense de inspección de alimentos (<i>Canadian Food Inspection Agency</i>) |
| CH₂Cl₂ | Diclorometano (<i>Dichloromethane</i>) |
| CFU/g | Unidad formadora de colonias /gramo (<i>Colony-forming unit/ gram</i>) |
| CMC | Carboximetilcelulosa (<i>carboxymethyl cellulose</i>) |
| CPR | Rojo de clorofenol (<i>Chlorophenol red</i>) |
| CR | Rojo de cresol (<i>Cresol Red</i>) |
| CRP | Polimerización radicalaria controlada (<i>Controlled Radical Polymerization</i>) |
| CTA | Agente de transferencia de la cadena (<i>Chain Transfer Agent</i>) |
| CTI | Indicadores de temperatura crítica (<i>Critical Temperature Indicator</i>) |
| CTTI | Integrador crítico de temperatura/tiempo (<i>Critical Temperature Time Integrator</i>) |
| DCC | <i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida (<i>N,N'-dicyclohexylcarbodiimide</i>) |
| DCU | Diciclohexilurea (<i>Dicyclohexylurea</i>) |
| DEA | Dietilamina (<i>Diethylamine</i>) |
| DED | Deposición directa de la energía (<i>Direct Energy Deposition</i>) |
| DEMA | Dietilmetilamina (<i>Diethylmethylamine</i>) |

| | |
|----------------------------|---|
| DMA | Dimetilamina (<i>Dimethylamine</i>) |
| DMAPA | 3-Dimetilaminopropilamina (<i>Dimethylaminopropylmine</i>) |
| DMF | N,N-dimetilformamida (<i>N,N-dimethylformamide</i>) |
| DMPA | 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (<i>2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone</i>) |
| DMSO | Dimetilsulfóxido (<i>Dimethyl sulfoxide</i>) |
| DNBP | Di-n-butil-ftalato (<i>Di-n-butyl phthalate</i>) |
| DSC | Calorimetría diferencial de barrido (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>) |
| EAACI | Academia europea de alergia e inmunología clínica (<i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i>) |
| EFSA | Academia europea de seguridad alimentaria (<i>European Food Safety Agency</i>) |
| EGDMA | Etilen glicol dimetacrilato (<i>Ethylene glycol dimethacrylate</i>) |
| EMiMDCA | 1-Ethyl-3-methylimidazolium dicianamida (<i>Dicianamida de 1-butil-3-etilimidazolio</i>) |
| EMiMNTf₂ | 1-Ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluorometilsulfonyl)imide (<i>Bis(trifluorometilsulfonyl)imida de 1-butil-3-etilimidazolio</i>) |
| EtOH | Etanol (<i>Ethanol</i>) |
| Et₂O | Éter etílico (<i>Diethyl ether</i>) |
| FDA | Administración de alimentos y medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>) |

| | |
|-----------------------|--|
| FT-IR-ATR | Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-reflexión total atenuada (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Attenuated total Reflection</i>) |
| GJM-492 | 2-Fluoro-4-[4-(2-hidroxi-etanosulfonil)-fenilazo]-6-metoxifenol (<i>2-Fluoro-4-[4-(2-hydroxyethanesulfonyl)-phenylazo]-6-methoxyphenol</i>) |
| GMA | Glicidil de metacrilato (<i>Glycidyl methacrylate</i>) |
| H₂O | Agua (<i>Water</i>) |
| His | Histamina (<i>Histamine</i>) |
| HPTS | Sal trisódica del 8-hidroxipireno-1,3,6-ácido trisulfónico (<i>8-Hydroxypyrene-1,3,6-Trisulfonic Acid, Trisodium Salt</i>) |
| Hx | Hipoxantina (<i>Hypoxanthine</i>) |
| IgE | Immunoglobulina E alérgeno-específica (<i>allergen-specific immunoglobulin E</i>) |
| ILC-SILP | SILP-líquidos iónicos cristalinos (<i>Ionic Liquid Crystalline-SILP</i>) |
| ILM | Monómero de Líquido Iónico (<i>Ionic Liquid Monomer</i>) |
| ILs | Líquidos Iónicos (<i>Ionic Liquids</i>) |
| IPA | Alcohol isopropílico/2-propanol (<i>Isopropyl alcohol/2-propanol</i>) |
| IR-Raman | Espectroscopía infrarroja -Raman (<i>Infrared Spectroscopy - Raman</i>) |
| LAB | Bacterias del ácido láctico (<i>Lactic Acid Bacteria</i>) |
| LCA | Análisis de ciclo de vida (<i>Life Cycle Assessment</i>) |

| | |
|------------------------|--|
| MAP | Envasado de atmósfera modificada (<i>Modified Atmosphere Packaging</i>) |
| MB | Azul de metileno (<i>Methylene Blue</i>) |
| ME | Extrusión del material (<i>Material Extrusion</i>) |
| MeOH | Metanol (<i>Methanol</i>) |
| MJ | Inyección del material (<i>Material Jetting</i>) |
| MO | Naranja de metilo (<i>Methyl Orange</i>) |
| m-SILLPs | Líquidos iónicos monolíticos soportados covalentemente (<i>Monolithic Supported Ionic Liquid like-Phases</i>) |
| MR | Rojo de metilo (<i>Methyl Red</i>) |
| NHS | N-hidroxisuccinimida (<i>N-hydroxysuccinimide</i>) |
| NMP | Polimerización mediada por nitróxido (<i>Nitroxide-mediated radical polymerization</i>) |
| NQS | 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sodio (<i>Sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate</i>) |
| NR | Rojo de nilo (<i>Nile Red</i>) |
| NPs | Nanopartículas (<i>Nanoparticles</i>) |
| NTf₂ | Bistriflamida (<i>Bistriflimide</i>) |
| NY | Amarillo de nitrazina (<i>Nitrazine Yellow</i>) |

| | |
|----------------|---|
| OMS/WHO | Organización mundial de la salud (<i>World Health Organization</i>) |
| PA | Poliamida (<i>Polyamide</i>) |
| PAN | Poliacrilonitrilo (<i>Polyacrylonitrile</i>) |
| PANI | Polianilina (<i>Polyaniline</i>) |
| PBF | Fusión de lecho de polvo (<i>Powder Bed Fusion</i>) |
| PCL | Policaprolactona (<i>Polycaprolactone</i>) |
| PDMS | Polidimetilsiloxano (<i>Polydimethylsiloxane</i>) |
| PET | Tereftalato de polietileno (<i>Polyethylene terephthalate</i>) |
| PILs | Líquidos iónicos próticos (<i>Protic Ionic Liquids</i>) |
| Pol-ILs | Líquidos iónicos poliméricos (<i>Polymeric Ionic Liquids</i>) |
| ppm | partes por millón (<i>part per million</i>) |
| PSILs | Líquidos iónicos poliméricos soportados (<i>Polymeric Supported Ionic Liquids</i>) |
| Put | putrescina (<i>putrescine</i>) |
| PVA | Polivinilalcohol (<i>Polyvinyl alcohol</i>) |
| RAFT | Fragmentación y transferencia de cadena por adición reversible (<i>Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer</i>) |

| | |
|--------------------|---|
| RB | Rosa de Bengala (<i>Rose Bengal</i>) |
| RBBR | Azul brillante de remazol R (<i>Remazol Brilliant Blue R</i>) |
| RC | Rojo de Congo (<i>Congo Red</i>) |
| RMN | Resonancia magnética nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>) |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>) |
| r.t. | Temperatura ambiente (<i>room temperature</i>) |
| RTILs | Líquidos iónicos a temperatura ambiente (<i>Room Temperature Ionic Liquids</i>) |
| SCILL | Catalizadores sólidos con capas de líquidos iónicos (<i>Solid Catalysts with Ionic Liquids Layers</i>) |
| SCILs | Catalizadores sólidos con líquidos iónicos (<i>Solid Catalysts with Ionic Liquids</i>) |
| SILC/SILCAs | Catalizadores de líquidos iónicos soportados (<i>Supported Ionic Liquid Catalysis/Catalysts</i>) |
| SILF | Líquidos iónicos soportados en películas (<i>Supported Ionic Liquids Film</i>) |
| SILLPs | Líquidos iónicos soportados en fase sólida (<i>Supported Ionic Liquid like-Phases</i>) |
| SILMs | Membranas de líquidos iónicos soportados (<i>Supported Ionic Liquid Membranes</i>) |
| SILnPs | Líquidos iónicos soportados con nanopartículas (<i>Supported Ionic Liquids Nanoparticles</i>) |
| SILPs | Líquidos iónicos soportados en fase sólida (<i>Supported Ionic Liquid Phases</i>) |

| | |
|-----------------------|---|
| SILs | Líquidos iónicos soportados (<i>Supported Ionic Liquids</i>) |
| SL | Laminación de hoja (<i>Sheet Lamination</i>) |
| Sped | Espermidina (<i>Spermidine</i>) |
| Sper | Espermina (<i>Spermine</i>) |
| SSILP | SILP estructurados (<i>Structured SILP</i>) |
| SWCNT | Nanotubos de carbono de pared simple (<i>Single Wall Carbon Nanotubes</i>) |
| T | Temperatura (<i>Temperature</i>) |
| TB | Azul de timol (<i>Thymol Blue</i>) |
| TBHQ | Terbutilhidroquinona (<i>Tert-Butylhydroquinone</i>) |
| TEA | Trietilamina (<i>Triethylamine</i>) |
| TFQ | Calidad total de alimento (<i>Total Food Quality</i>) |
| TGA | Análisis termogravimétrico (<i>Thermogravimetric Analysis</i>) |
| THF | Tetrahidrofurano (<i>Tetrahydrofuran</i>) |
| Tir | Tiramina (<i>Tyramine</i>) |
| T_{cc} | Temperatura de cristalización fría (<i>Cold Crystallization Temperature</i>) |

| | |
|----------------------|---|
| T_d | Temperatura de descomposició (<i>Decomposition Temperature</i>) |
| T_g | Temperatura de transició vítre (<i>Glass transition temperature</i>) |
| T_m | Punto de fusión (<i>Melting Point</i>) |
| TMA | Trimetilamina (<i>Trimethylamine</i>) |
| TMAO | Óxido de trimetilamina (<i>Trimethylamine oxide</i>) |
| TNB | 1,3,5-Trinitrobenceno (<i>1,3,5-trinitrobenzene</i>) |
| Trip | Triptamina (<i>Tryptamine</i>) |
| TSILs | Líquidos iónicos de tarea específica (<i>Task Specific Ionic Liquids</i>) |
| TS-PILs | Líquidos iónicos poliméricos con tareas específicas (<i>Task Specific-Polymeric Ionic Liquids</i>) |
| TTI | Integrador de temperatura de tiempo (<i>Time Temperature Integrator</i>) |
| TTIs | Indicadores de tiempo y temperatura (<i>Time Temperature Indicators</i>) |
| TVBN | Nitrógeno básico volátil total (<i>Total Volatile Basic Nitrogen</i>) |
| TVC | Recuento de viables totales (<i>Total Viable Count</i>) |
| UE | Unión Europea (<i>European Union</i>) |
| UV/Vis | Ultravioleta/Visible (<i>Ultraviolet/Visible</i>) |

| | |
|------------------|---|
| EPA/VITAL | Etiquetado Precautorio de Alérgenos (<i>Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling</i>) |
| VOCs | Compuestos orgánicos volátiles (<i>Volatile Organic Compounds</i>) |
| VP | Fotopolimerización en cubeta (<i>Vat Photopolymerization</i>) |
| WAO | Organización mundial de alergia (<i>World Allergy Organization</i>) |
| WCA | Ángulo de contacto con el agua (<i>Water Contact Angle</i>) |
| wt | Peso (<i>Weight</i>) |
| ZILs | Líquidos Zwitteriónicos (<i>Zwitterionic Liquids</i>) |

Símbolos

| | |
|--------------------|--|
| $\Delta\delta$ | Diferencia de desplazamiento químico (<i>Chemical Shift Difference</i>) |
| ΔE_a | Diferencia de Energía de Activación (<i>Activation Energy Difference</i>) |
| ΔpK_a | Diferencia de pK_a (<i>pK_a difference</i>) |
| ΔRGB | Euclidean distance (<i>Distancia Euclidiana</i>) |
| ϵ_λ | Coefficiente de absorptividad molar (<i>Molar extinction coefficient</i>) |
| J | Constante de acoplamiento (<i>Coupling constant</i>) |
| K_f | Índice de frescura (<i>Freshness index</i>) |
| E | Módulo de Young (<i>Young's modulus</i>) |
| F | Fuerza (<i>Strength</i>) |
| L_f | Longitud final o de rotura (<i>Final gage length</i>) |
| L_o | Longitud inicial (<i>Initial gage length</i>) |
| σ_e | Tensión (<i>Strain</i>) |
| ϵ | Deformación unitaria (<i>Engineering Strain</i>) |
| σ_R | Resistencia a la tracción (<i>Engineering Stress</i>) |
| ϵ_R | Elongación a rotura (<i>Percent Elongation</i>) |

Prefacio

La presente Tesis Doctoral se ha realizado bajo la concesión de una subvención de la Generalitat Valenciana para la formación de doctores en empresas valencianas (FDEGENT) dentro del programa para el apoyo a personas investigadoras con talento (Plan GenT). El desarrollo del proyecto de investigación ha estado vinculado a la vigencia de un convenio o contrato de transferencia tecnológica entre un centro de investigación público o privado (en este caso, la Universidad Jaime I) y una empresa valenciana (Proyecto Kryptonita S.L.).

Proyecto Kryptonita S.L. (www.proyectokryptonita.com) es una empresa de base tecnológica que tiene como objetivo el desarrollo, producción y comercialización de nuevos sistemas inteligentes para la detección de diferentes compuestos, especialmente alérgenos alimentarios, y que permitan la monitorización del proceso de producción de alimentos y también la validación de limpieza de las instalaciones con el fin de garantizar la calidad y seguridad de estos.

Proyecto Kryptonita S.L. surgió a partir de un proyecto de investigación realizado de forma conjunta entre el grupo de Química Sostenible y Supramolecular de la Universidad Jaime I y el Grupo IMAN, una compañía que ofrece soluciones a empresas en recursos humanos, facility services y outsourcing y que, a su vez, dispone de una división especializada en el sector alimentario (IMAN Cleaning). Dicho proyecto se basó en la necesidad del mercado de disponer de dispositivos simples, fiables y baratos para la detección de alérgenos en superficies del sector alimentario.

Cabe destacar que, en Europa, las alergias alimentarias afectan a un 2-4% de la población en Europa y, en la actualidad, la única forma de evitarlas es asegurarse de que no se consuman los alimentos que producen la alergia, ya que pequeñas cantidades pueden llegar a desencadenar la reacción alérgica. Para lograr un alto nivel de protección de la salud, la Ley de Información Alimentaria (Reglamento UE 1169/2011; Real Decreto 126/2015) obliga a informar sobre la presencia en productos alimentarios de los 14 alérgenos de obligada declaración, incluso si están presentes en cantidades de trazas. Por ello, el sector alimentario requiere de protocolos de validación para controlar y eliminar la contaminación cruzada, así como detectar los alérgenos presentes. En este contexto, el objetivo de Proyecto Kryptonita S.L. es encontrar una solución a este problema dentro del sector alimentario, ofreciendo un método de detección que sea práctico, fiable, rápido y pueda usarse para hacer el análisis *in situ* de manera sencilla por personal no especializado.

El proyecto inicial consistió en el desarrollo de un sistema de detección de sulfitos (uno de los alérgenos de obligada declaración según la Ley de Información Alimentaria). Concretamente, se prepararon diversos sistemas capaces de detectar colorimétricamente

la presencia/ausencia de sulfitos en superficie. Siguiendo esta línea, se planteó que el siguiente proyecto se centrara en la detección de proteínas en superficie.

Durante el transcurso del contrato doctoral se llevaron en paralelo unos desarrollos de I+D, los cuales estaban encaminados a la detección de proteínas en superficie, siguiendo los desarrollos obtenidos por Kryptonita S.L. Esta investigación se resume en el Capítulo III.

Por otro lado, los diferentes capítulos de la Tesis Doctoral resumen el trabajo llevado a cabo con un enfoque más académico, basándose en el conocimiento y la experiencia del grupo de investigación, y con el cual se pretenden abrir nuevas líneas de trabajo de investigación que puedan servir como base para el desarrollo de nuevos productos en un futuro.

Índice

| | | |
|----------|---|------------|
| 1 | Capítulo I. Introducción | 9 |
| 1.1 | Contexto de la seguridad alimentaria | 9 |
| 1.1.1 | Calidad Alimentaria | 11 |
| 1.1.2 | Regulación y Marco Legal | 12 |
| 1.1.3 | Indicadores de calidad | 12 |
| 1.1.4 | Food packaging (“Envasado inteligente y activo”) | 15 |
| 1.1.5 | Alergias y seguridad alimentaria | 17 |
| 1.1.6 | El etiquetado de alérgenos alimentarios | 21 |
| 1.2 | Sistemas de detección en la industria alimentaria | 24 |
| 1.2.1 | Envasado activo | 24 |
| 1.2.1.1 | <i>Antimicrobiano</i> | 25 |
| 1.2.1.2 | <i>Antioxidante</i> | 27 |
| 1.2.1.3 | <i>Absorción de humedad</i> | 29 |
| 1.2.1.4 | <i>Modified Atmosphere Packaging (MAP)</i> | 30 |
| 1.2.2 | Envasado inteligente | 34 |
| 1.2.2.1 | <i>Indicadores</i> | 34 |
| 1.2.2.2 | <i>Sensores</i> | 50 |
| 1.3 | Líquidos iónicos en la industria alimentaria | 57 |
| 1.3.1 | Líquidos iónicos | 58 |
| 1.3.2 | Hacia la química verde y sostenible | 62 |
| 1.3.3 | Métricas de Química Verde y Sostenibilidad | 64 |
| 1.3.4 | Líquidos iónicos próticos (PILs) | 65 |
| 1.3.5 | Ionicidad o transferencia de protón | 66 |
| 1.4 | Polímeros basados en Líquidos Iónicos | 69 |
| 1.4.1 | Líquidos Iónicos Poliméricos (Pol-ILs) | 72 |
| 1.4.2 | Líquidos Iónicos Soportados (SILs) | 76 |
| 1.5 | Aplicaciones de ILs en indicadores, sensores de gases y biosensores | 81 |
| 2 | Capítulo II. Objetivos | 91 |
| 3 | Capítulo III. Detección de proteínas | 95 |
| 3.1 | Prueba de concepto para detección de proteínas | 95 |
| 3.2 | Evaluación del análisis en sistemas reales | 96 |
| 3.3 | Pruebas de campo en la industria | 97 |
| 4 | Capítulo IV. PILs derivados de α,β-aminoamidas | 105 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.1 | Metodología y síntesis de PILs basados en aminoácidos | 105 |
| 4.1.1 | Evaluación de ruta sintética alternativa mediante “factor E” para la preparación de α,β -aminoamidas..... | 106 |
| 4.1.2 | Diseño y síntesis de PILs derivados de α,β -aminoamidas | 110 |
| 4.1.3 | Estudio de formación de líquidos iónicos próticos mediante FT-IR-ATR | 113 |
| 4.1.4 | Estudio de formación de líquidos iónicos próticos mediante DSC..... | 117 |
| 4.1.5 | Estudio de formación de líquidos iónicos próticos mediante RMN..... | 123 |
| 4.1.6 | Evaluación del efecto asociado a la constante de acidez (K_a)..... | 129 |
| 4.1.7 | Estudio de ionicidad de líquidos iónicos próticos mediante ^1H -RMN.... | 133 |
| 4.1.8 | Estudios ecotoxicológicos de líquidos iónicos próticos..... | 138 |
| 4.1.9 | Aplicación de PILs en desarrollo de materiales inteligentes..... | 141 |
| 4.1.9.1 | <i>Desarrollo de un material inteligente basado en PILs hidrofóbicos.....</i> | <i>142</i> |
| 4.1.9.2 | <i>Estudio del efecto de inmovilización basado en PILs hidrofóbicos.....</i> | <i>145</i> |
| 4.1.9.3 | <i>Estudio de respuesta y sensibilidad de aminas volátiles</i> | <i>147</i> |
| 4.1.9.4 | <i>Desarrollo de un modelo matemático mediante las componentes RGB.....</i> | <i>149</i> |
| 4.1.10 | Conclusiones..... | 151 |
| 5 | Capítulo V. Sistemas sensibles a la humedad basados en Pol-ILs derivados de tiolactona | 157 |
| 5.1 | Tiolactona de homocisteína como plataforma funcional en la química de polímeros..... | 157 |
| 5.2 | Reacción “Click” tiol-eno | 159 |
| 5.2.1 | El rol de los tioles en la química de polímeros | 159 |
| 5.2.2 | Polimerización tipo tiol-eno | 160 |
| 5.3 | Metodología y síntesis del monómero iónico derivado de la tiolactona de homocisteína | 162 |
| 5.4 | Apertura del anillo de tiolactona mediante aminólisis..... | 163 |
| 5.4.1 | Estudio cinético de la apertura del anillo por RMN | 165 |
| 5.4.2 | Estudio de la apertura del anillo por espectroscopia FT-IR-ATR..... | 169 |
| 5.4.3 | Estudio de la aminólisis por espectroscopia de Raman | 171 |
| 5.5 | Polimerización amina-tiol-eno..... | 173 |
| 5.5.1 | Estudio de la fotopolimerización por RMN | 174 |
| 5.5.2 | Estudio de la fotopolimerización por Raman | 175 |
| 5.6 | Preparación de materiales poliméricos..... | 176 |
| 5.6.1 | Optimización de la metodología de polimerización..... | 176 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5.6.2 | Composición de membranas poliméricas | 178 |
| 5.6.3 | Evaluación de la naturaleza higroscópica..... | 180 |
| 5.6.4 | Estudio higroscópico de captación en humedad controlada..... | 183 |
| 5.6.5 | Estudio de las propiedades mecánicas por absorción de humedad..... | 186 |
| 5.7 | Control de humedad en la industria alimentaria | 191 |
| 5.7.1 | Inmovilización de sonda colorimétrica..... | 192 |
| 5.7.2 | Estudio de respuesta colorimétrica..... | 195 |
| 5.7.3 | Análisis cromático por espectroscopia de UV-visible..... | 199 |
| 5.7.4 | Distancia Euclidiana. Análisis del color por RGB | 204 |
| 5.7.5 | Inmovilización de otras sondas colorimétricas | 208 |
| 5.7.6 | Análisis de transición cromática por RGB y UV-Visible | 210 |
| 5.7.7 | Conclusiones..... | 213 |
| 6 | Capítulo VI. Sistemas colorimétricos basados en ILs soportados sobre materiales avanzados | 219 |
| 6.1 | Futuro de la impresión 3D en la seguridad alimentaria | 219 |
| 6.2 | Impresión 3D: Definición y conceptos..... | 222 |
| 6.2.1 | Optimización de la formulación para diseño de impresión 3D..... | 224 |
| 6.2.2 | Síntesis de SILs (Líquidos Iónicos Soportados) | 226 |
| 6.2.2.1 | <i>Caracterización de SILs mediante FT-IR-ATR y Raman.....</i> | <i>229</i> |
| 6.3 | Tipos de sensores basados en impresión 3D | 232 |
| 6.3.1 | Material inteligente 3D – Inmovilización de sonda colorimétrica | 233 |
| 6.3.1.1 | <i>Optimización de las condiciones de inmovilización.....</i> | <i>235</i> |
| 6.3.1.2 | <i>Acidificación de la sonda colorimétrica inmovilizada en SILs.....</i> | <i>237</i> |
| 6.3.2 | Análisis y estudio de concentración de aminas volátiles | 241 |
| 6.3.2.1 | <i>Análisis de cambio de color – Componentes RGB</i> | <i>245</i> |
| 6.3.2.2 | <i>Estudio de respuesta en muestras reales de alimentos envasados</i> | <i>247</i> |
| 6.3.2.3 | <i>Análisis de cambio de color – Productos envasados</i> | <i>249</i> |
| 6.3.3 | Material inteligente 3D – Inmovilización covalente..... | 253 |
| 6.3.3.1 | <i>Caracterización de discos 3D modificados mediante FT-IR-ATR y Raman</i> | <i>256</i> |
| 6.3.3.2 | <i>Análisis de cambio de color – Componentes RGB</i> | <i>259</i> |
| 6.3.3.3 | <i>Estudio de respuesta en muestras reales de alimentos envasados</i> | <i>262</i> |
| 6.3.3.4 | <i>Comparación de la inmovilización covalente y la inmovilización en SILs.....</i> | <i>263</i> |
| 6.3.4 | Conclusiones..... | 265 |
| 7 | CAPITULO VII. Parte Experimental | 271 |

| | | |
|--------------------------|---|------------|
| 7.1 | Consideraciones generales | 271 |
| 7.2 | Técnicas de análisis | 271 |
| 7.2.1 | Espectroscopia de RMN..... | 271 |
| 7.2.2 | Espectroscopia de FT-IR-ATR | 272 |
| 7.2.3 | Calorimetría diferencial de barrido (DSC) | 272 |
| 7.2.4 | Análisis termogravimétrico (TGA) | 272 |
| 7.2.5 | Espectroscopia Raman..... | 272 |
| 7.2.6 | Espectroscopia UV-Visible | 272 |
| 7.2.7 | Análisis elemental..... | 273 |
| 7.2.8 | Ángulo de contacto..... | 273 |
| 7.2.9 | Potenciometría | 273 |
| 7.3 | Procedimientos sintéticos, protocolos de estudio y caracterización – | |
| Capítulo IV | 273 | |
| 7.3.1 | Síntesis del compuesto 2 – Método i | 273 |
| 7.3.2 | Síntesis del compuesto 2 – Método ii – Z-Val-But | 274 |
| 7.3.3 | Síntesis del compuesto 2 – Método ii – Z-Val-Bn | 275 |
| 7.3.4 | Síntesis del compuesto 2 – Método iii – Z-Val-But | 275 |
| 7.3.5 | Síntesis del compuesto 2 – Método iii – Z-Val-Bn | 276 |
| 7.3.6 | Síntesis del compuesto 3 – Método iv | 276 |
| 7.3.7 | Síntesis del compuesto 3 – Método v | 277 |
| 7.3.8 | Síntesis del compuesto 2 – Método iii – Boc-Pro-But | 277 |
| 7.3.9 | Síntesis del compuesto 3 – Pro-But | 277 |
| 7.3.10 | Síntesis del PILs..... | 278 |
| 7.3.11 | Titulación potenciométrica | 278 |
| 7.3.12 | Condiciones de cultivo..... | 278 |
| 7.3.13 | Procedimiento para el estudio respuesta a aminas volátiles..... | 278 |
| 7.3.14 | Caracterización | 279 |
| 7.4 | Procedimientos sintéticos y caracterización – Capítulo V | 293 |
| 7.4.1 | Síntesis del compuesto 4 | 293 |
| 7.4.2 | Síntesis del compuesto 5 | 293 |
| 7.4.3 | Estudio cinético de apertura en DMSO-d ₆ | 294 |
| 7.4.4 | Estudio cinético del fotopolimerización en DMSO-d ₆ | 294 |
| 7.4.5 | Procedimiento para la preparación de membranas poliméricas..... | 295 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 7.4.6 | Figuras suplementarias del capítulo V..... | 296 |
| 7.5 | Procedimientos sintéticos y caracterización – Capítulo VI | 304 |
| 7.5.1 | Procedimiento general para la impresión 3D de discos..... | 304 |
| 7.5.2 | Procedimiento general para la preparación de SILs..... | 304 |
| 7.5.3 | Procedimiento para la inmovilización de sonda colorimétrica en SILs.. | 305 |
| 7.5.4 | Procedimiento para la inmovilización covalente | 305 |
| 7.5.5 | Procedimiento para el estudio de respuesta a aminas volátiles..... | 305 |

CAPÍTULO I

Introducción

1 Capítulo I. Introducción

1.1 Contexto de la seguridad alimentaria

El acceso a cantidades suficientes de alimentos seguros y nutritivos es fundamental para mantener la vida y promover una buena salud. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que 600 millones de personas - casi 1 de cada 10 en el mundo - sufren enfermedades provocadas por el consumo de alimentos contaminados que contienen bacterias dañinas, virus, parásitos o sustancias químicas causando más de 200 enfermedades.¹ La mayoría se manifiesta en forma de problemas gastrointestinales como diarrea, aunque también pueden producir síntomas neurológicos, ginecológicos, inmunológicos o enfermedades a largo plazo como el cáncer. Se calcula que 420.000 personas, 125.000 de las cuales son menores de 5 años, mueren cada año debido a este creciente problema de salud pública que causa un impacto socioeconómico considerable y contribuye significativamente a la carga mundial de mortalidad. A su vez, 110 mil millones de euros se pierden cada año en productividad y gastos médicos como resultado de alimentos inseguros en países de ingresos bajos y medios.²

Las enfermedades transmitidas por los alimentos pueden ser causadas por la contaminación y el deterioro de los alimentos. En el primer caso, la contaminación se entiende como todo agente extraño que se incorpora al alimento sin ser propio de él y es capaz de producir un efecto negativo en la salud del consumidor. Por otro lado, el deterioro se refiere a la alteración negativa de los alimentos que afecta su apariencia, composición intrínseca, valor nutricional o características organolépticas. Dichas alteraciones pueden producirse en cualquier etapa de la cadena de valor: producción, almacenamiento, entrega y consumo. En consecuencia, se define la “vida útil” de un alimento como el tiempo en el que un alimento conservado en unas condiciones determinadas reúne tres condiciones: es seguro, mantiene unas características químicas, físicas, microbiológicas y sensoriales adecuadas, y cumple las especificaciones nutricionales declaradas en su etiquetado.³ En este marco, la monitorización en tiempo real de la calidad de los alimentos en la cadena de

¹ *Food Safety*; World Health Organization, 2017.

² Yousefi, H.; Su, H.-M.; Imani, S. M.; Alkhalidi, K.; M. Filipe, C. D.; Didar, T. F. Intelligent Food Packaging: A Review of Smart Sensing Technologies for Monitoring Food Quality. *ACS Sensors* **2019**, *4* (4), 808-821.

³ Garcinuño Martínez, R. M. Contaminación de los alimentos durante los procesos de origen y almacenamiento. *Aldaba* **2017**, *0* (36), 51-64.

suministro surge como una posible solución para controlar la transmisión de estas enfermedades asociadas al mal estado de los alimentos.

La falta de información y la incapacidad de establecer el estado de los alimentos a tiempo real pone en riesgo a los consumidores, incluso cuando se cumplen las regulaciones estándares para minimizar estos problemas. Por ello, la industria alimentaria tiene como objetivo “cuantificar” la calidad y garantizar la seguridad e inocuidad de los alimentos para que sean sanos, seguros y cumplan con las expectativas del consumidor preservando la salud global.^{4,5} Este estado de presión en la implementación a nivel mundial de sistemas de trazabilidad que garanticen la seguridad y la autenticidad en toda la cadena de suministro de alimentos ha despertado el interés de muchos organismos como las industrias alimentarias, los minoristas, los organismos de control de los derechos de los consumidores o las autoridades reguladoras de los alimentos para establecer protocolos que garanticen el buen estado de los alimentos a lo largo de su escala de valor.⁶

Actualmente, la fecha de caducidad o consumo preferente se ha utilizado como parámetro para estimar la calidad temporal de consumo de los alimentos. Sin embargo, las retiradas anticipadas de alimentos generan desperdicios de miles de millones de euros cada año, que es otro resultado no deseado de una fecha de vencimiento predeterminada e inexacta. Además, una eliminación completa de la pérdida de calidad es imposible ya que las propiedades intrínsecas cambian (por ejemplo, la maduración de las frutas a un cierto nivel), lo que supone una pérdida aparente de calidad. A menudo, factores como el color, la consistencia, o incluso el paso de la fecha de caducidad conduce a que los productos terminen en la papelera.⁷ Así pues y por temor, muchos consumidores tiran productos que en realidad todavía son aptos para el consumo. Todo esto ha generado la urgencia de desarrollar sistemas que se puedan incorporar a la fuente de alimento mientras se encuentra en un período de almacenamiento para determinar con cierto grado de objetividad si los productos siguen siendo aptos para su consumo de forma segura.

⁴ Aung, M. M.; Chang, Y. S. Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives. *Food Control* **2014**, *39*, 172-184.

⁵ Rodríguez-Sauceda, R.; Rojo-Martínez, G. E.; Martínez-Ruiz, R.; Piña-Ruiz, H. H.; Ramírez-Valverde, B.; Vaquera-Huerta, H.; Cong-Hermida, M. d. l. C. Envases inteligentes para la conservación de alimentos. *Ra Ximhai* **2014**, *10* (6), 151-173.

⁶ Janjarasskul, T.; Suppakul, P. Active and intelligent packaging: The indication of quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2018**, *58* (5), 808-831.

⁷ Müller, P.; Schmid, M. Intelligent Packaging in the Food Sector: A Brief Overview. *Foods* **2019**, *8* (1), 16.

1.1.1 Calidad Alimentaria

La calidad de los alimentos es un factor crucial y fiable para controlar su efecto en la salud alimentaria de los consumidores. El concepto de la calidad puede entenderse como un indicador definido en sentido objetivo por criterios científicos y tecnológicos y, en parte, subjetivo por el criterio de los consumidores basado en la valoración que concurre en la definición del concepto propiamente.⁸ Esta definición viene marcada por varios factores como atributos organolépticos y sensoriales, factores psicológicos, valor nutricional, normas de consumo, estabilidad y otros factores que difieren según el país. En este sentido, la globalización del mercado está marcando una nueva conciencia hacia el término “total food quality” (TFQ). Esta comprende elementos básicos que se pueden agrupar de la siguiente manera:

- Atributos organolépticos y sensoriales: color, aspecto, textura, jugosidad, sabor, astringencia y aroma.
- Seguridad: presencia de compuestos tóxicos, patógenos, micotoxinas y microorganismos toxigénicos.
- Valor nutricional: contenido de calorías y composición en proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas o minerales, así como los no nutrientes con alta actividad biológica (antioxidantes).
- Servicio y estabilidad: resistencia al rápido deterioro (aquí, debemos tener en cuenta el procesamiento, almacenamiento, transporte y condiciones de vida útil).
- Salubridad: capacidad de algunos componentes alimentarios para ejercer efectos beneficiosos en la salud de los consumidores (probióticos, bacterias, prebióticos, oligosacáridos, flavonoides, carotenoides, vitaminas y péptidos bioactivos).
- Factores psicológicos: comodidad, precio, facilidad de uso, novedosos efectos psicoactivos asociados a la ingesta de los alimentos.

En otras palabras, TFQ es una combinación de propiedades o atributos que pueden constituir una especie de "certificado de aceptabilidad".

⁸ Giusti, A. M.; Bignetti, E.; Cannella, C. Exploring New Frontiers in Total Food Quality Definition and Assessment: From Chemical to Neurochemical Properties. *Food and Bioprocess Technology* **2007**, *1* (2), 130.

1.1.2 Regulación y Marco Legal

Durante muchos años, no ha existido un marco legal para el uso del envasado inteligente con fines comerciales en la UE. En la actualidad, los requisitos generales se tratan en el Reglamento CE N° 1935/2004 sobre materiales destinados a entrar en contacto con alimentos.⁹ El artículo 3 de la CE N° 1935/2004 establece que cualquier material ha de ser lo suficientemente inerte para evitar que se transfieran sustancias a los alimentos en cantidades lo suficientemente grandes para poner en peligro la salud humana, suponer un cambio inaceptable en la composición de los alimentos o provocar un deterioro de este. Por otro lado, en cumplimiento con la legislación alimentaria el artículo 4 regula facilitar una información adecuada en forma de etiquetado a los usuarios, que les ayude a utilizar de manera segura y correcta los materiales y objetos activos, así como el requerimiento de que la información transmitida a través de envases inteligentes no engañe al consumidor.¹⁰

El Reglamento CE N° 450/2009 trata con más detalle los requisitos y la aprobación/prohibición de sustancias o componentes destinados a entrar en contacto con alimentos. Todo nuevo componente activo inicialmente debe ser evaluado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). El resultado de esa evaluación debe ir seguido de una decisión de gestión del riesgo sobre si la sustancia debe o no incluirse en la lista comunitaria de sustancias autorizadas.¹¹

1.1.3 Indicadores de calidad

La frescura de los alimentos es uno de los temas más preocupantes para los consumidores y la industria alimentaria. Las aminas biogénicas (BAs) son pequeñas moléculas orgánicas, producidas en el deterioro de alimentos, que muestran una alta actividad biológica. Surgen como resultado de la descarboxilación enzimática de aminoácidos como se detalla en la Figura 1.1.¹² Su concentración depende de la naturaleza y ambiente bacteriano del alimento, pero pueden aumentar rápidamente con un almacenamiento inadecuado. Debido a su

⁹ De Jong, A. R.; Boumans, H.; Slaghek, T.; Van Veen, J.; Rijk, R.; Van Zandvoort, M. Active and intelligent packaging for food: Is it the future? *Food Additives & Contaminants* **2005**, *22* (10), 975-979.

¹⁰ REGLAMENTO (CE) No 1935/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CE; pp 4-17.

¹¹ REGLAMENTO (CE) N o 450/2009 DE LA COMISIÓN de 29 de mayo de 2009 sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos (Texto pertinente a efectos del EEE); pp 3-11.

¹² Danchuk, A. I.; Komova, N. S.; Mobarez, S. N.; Doronin, S. Y.; Burmistrova, N. A.; Markin, A. V.; Duerkop, A. Optical sensors for determination of biogenic amines in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2020**, *412* (17), 4023-4036.

naturaleza tóxica, la detección de BAs en la industria alimentaria y el mantenimiento de su nivel dentro de los límites de seguridad es una parte obligatoria del análisis como indicador de calidad. Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), hay rangos de concentración que apuntan a varios niveles de calidad o degradación de los alimentos. La toxicidad depende de la exposición y de la sensibilidad humana individual a cada BA. Por ejemplo, las dosis de tiramina pueden variar desde 600 hasta 2000 mg, dependiendo de la tolerancia individual de cada persona.¹³

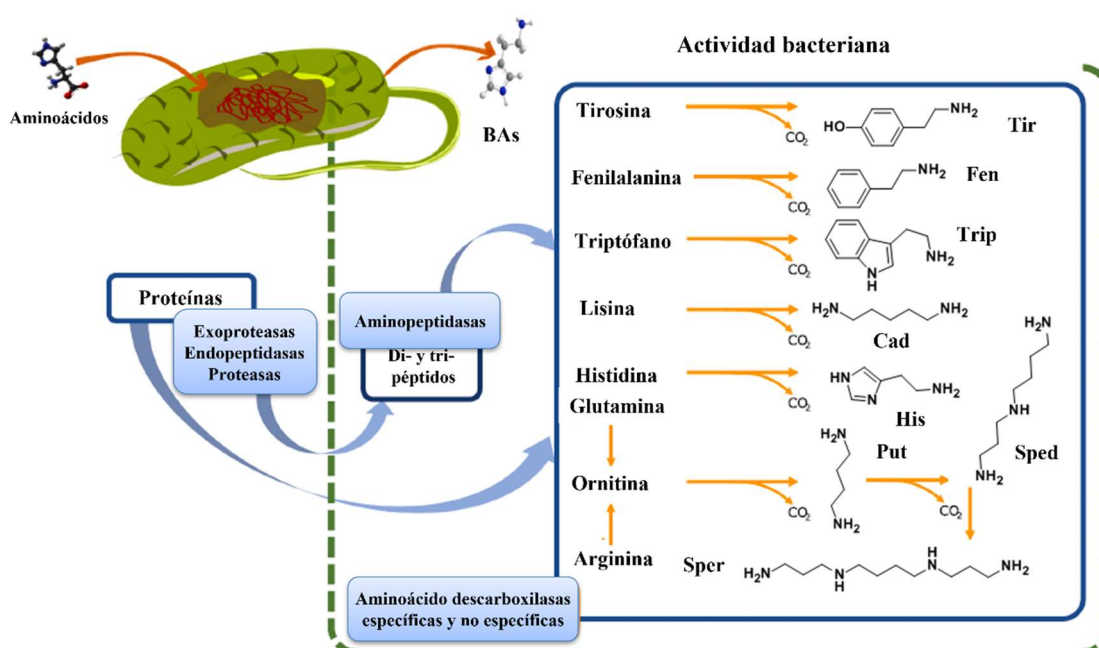


Figura 1.1. Formación de BAs a partir de péptidos y proteínas por acción de enzimas (modificado de ref. 16).

La legislación solo define límites para una sola amina biogénica (histamina) y no se han establecido criterios para otras aminas, las cuales presentan niveles importantes en alimentos que se consumen regularmente en determinados sectores de la sociedad.¹⁴ El Reglamento de la Comisión Europea (2073/2005, 144/2007, 365/2010) establece 100–200 mg·kg⁻¹ como el límite máximo de histamina en ciertas especies de peces. El código estándar

¹³ Papageorgiou, M.; Lambropoulou, D.; Morrison, C.; Kłodzińska, E.; Namieśnik, J.; Płotka-Wasyłka, J. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *98*, 128-142.

¹⁴ Ruiz-Capillas, C.; Herrero, A. M. Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. *Foods* **2019**, *8* (2), 62.

de Australia y Nueva Zelanda establece 100–200 mg·kg⁻¹ como límite máximo. Por otro lado, la FDA establece 50 mg·kg⁻¹ como límite seguro para histamina.¹⁵ La histamina es bioactiva y tóxica, pudiendo desencadenar una reacción alérgica en humanos. Las concentraciones de histamina entre 50 y 200 mg·kg⁻¹ pueden causar efectos adversos para la salud y niveles superiores a 200 mg·kg⁻¹ de histamina causan efectos tóxicos en humanos. Por otro lado, las poliaminas (putrescina, espermina, espermidina y cadaverina) juegan funciones esenciales en la vida y pueden estar presentes en concentraciones micromolares o, incluso, milimolares. Sin embargo, algunas pueden reaccionar con nitrito para formar nitrosaminas cancerígenas.¹⁶

Hasta la fecha, la evaluación sensorial es el método más importante para la evaluación de la frescura de los productos. Otros enfoques para determinar el estado o índice de frescura se basan en métodos microbianos y químicos descritos,¹⁷ entre los que podemos destacar:

- El recuento de viables totales (TVC) se utiliza como un indicador de calidad en la industria de alimentos sólidos y líquidos. Se trata de un índice de estimación cuantitativa de la concentración de microorganismos y se utiliza como una de las pruebas llevadas a cabo para asegurar la seguridad del consumidor. Para dicho parámetro, se estima el umbral de deterioro bacteriano para llegar al final de la vida útil en 10⁷ CFU/g.¹⁸ No obstante, es difícil definir umbrales de deterioro exactos, ya que pueden variar dependiendo de diferentes factores como el tipo de producto, origen o ubicación geográfica.
- El valor K_I es un índice de frescura basado en el grado de degradación del ATP. Este valor establece una relación entre los compuestos de degradación de ATP (inosina e hipoxantina) respecto de todos los compuestos relacionados con ATP.¹⁹

¹⁵ Kannan, S. K.; Ambrose, B.; Sudalaimani, S.; Pandiaraj, M.; Giribabu, K.; Kathiresan, M. A review on chemical and electrochemical methodologies for the sensing of biogenic amines. *Analytical Methods* **2020**, *12* (27), 3438-3453.

¹⁶ Jaguey-Hernández, Y.; Aguilar-Arteaga, K.; Ojeda-Ramirez, D.; Añorve-Morga, J.; González-Olivares, L. G.; Castañeda-Ovando, A. Biogenic amines levels in food processing: Efforts for their control in foodstuffs. *Food Research International* **2021**, *144*, 110341.

¹⁷ Olafsdóttir, G.; Martinsdóttir, E.; Oehlenschläger, J.; Dalgaard, P.; Jensen, B.; Undeland, I.; Mackie, I. M.; Henahan, G.; Nielsen, J.; Nilsen, H. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology* **1997**, *8* (8), 258-265.

¹⁸ Koutsoumanis, K. Predictive Modeling of the Shelf Life of Fish under Nonisothermal Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **2001**, *67* (4), 1821-1829.

¹⁹ Hamada-Sato, N.; Usui, K.; Kobayashi, T.; Imada, C.; Watanabe, E. Quality assurance of raw fish based on HACCP concept. *Food Control* **2005**, *16* (4), 301-307.

- El nitrógeno básico volátil total (TVBN) se trata de un índice importante que representa el contenido de nitrógeno a partir de compuestos volátiles como amoníaco, dimetilamina y trimetilamina. Son productos de degradación microbiana generados en el deterioro de alimentos y se consideran posibles indicadores del índice de frescura. El método de referencia para la determinación de TVBN, adoptado por la comunidad europea, implica una extracción laboriosa basada en la valoración o titulación de aminas con HCl (Decisión de la Comisión 95/149/CE de 8 de marzo de 1995).²⁰ En Europa, los valores de TVBN establecidos como límite de aceptabilidad para productos aptos para consumo humano oscilan entre 25 y 35 mg·100 g⁻¹ para productos pesqueros o menos de 20 mg·100 g⁻¹ para productos cárnicos en China o Egipto. Sin embargo, estos umbrales pueden variar dependiendo del producto o de la regulación del país considerado. Por ejemplo, los valores para la frescura de los productos cárnicos se suelen establecer en un rango entre 15-40 mg·100 g⁻¹ de producto dependiendo del tipo de carne.²¹

1.1.4 Food packaging (“Envasado inteligente y activo”)

El envasado de alimentos es un componente indispensable de la cadena de suministro de alimentos, ya que sirve como capa de protección o barrera contra la contaminación, el entorno externo y los daños mecánicos durante el transporte, que de lo contrario podrían tener efectos de deterioro en la calidad del producto. También sirve como una herramienta preventiva para garantizar que el producto esté sellado en todas las etapas de distribución hasta que el usuario final lo abre con garantía y verifica los problemas asociados con la manipulación.²² Es importante destacar que el envasado de alimentos sirve como una herramienta de identificación y comunicación entre el productor y el consumidor, presentando detalles del producto, como datos nutricionales, beneficios para la salud, instrucciones de uso y almacenamiento, lugar de fabricación, fecha de fabricación, fecha de caducidad/fecha de consumo preferente entre la información más relevante como se indica en la Figura 1.2. Además, un envasado apropiado es una herramienta de marketing que se relaciona directamente con un atractivo para diferentes clases de consumidores que varían

²⁰ 95/149/CE: Decisión de la Comisión, de 8 de marzo de 1995, por la que se establecen los valores límite de nitrógeno básico volátil total NBVT de determinadas categorías de productos pesqueros y los métodos de análisis que deben utilizarse. 1995; pp 84-87.

²¹ Bekhit, A. E.-D. A.; Holman, B. W. B.; Giteru, S. G.; Hopkins, D. L. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review. *Trends in Food Science & Technology* **2021**, *109*, 280-302.

²² Cheng, H.; Xu, H.; Julian McClements, D.; Chen, L.; Jiao, A.; Tian, Y.; Miao, M.; Jin, Z. Recent advances in intelligent food packaging materials: Principles, preparation and applications. *Food Chemistry* **2022**, *375*, 131738.

según la edad, el género, la cultura y otros factores. Además, es una herramienta de optimización que ayuda en la compra de una cantidad deseada de productos e indirectamente ayuda en la reducción de desperdicios.²³

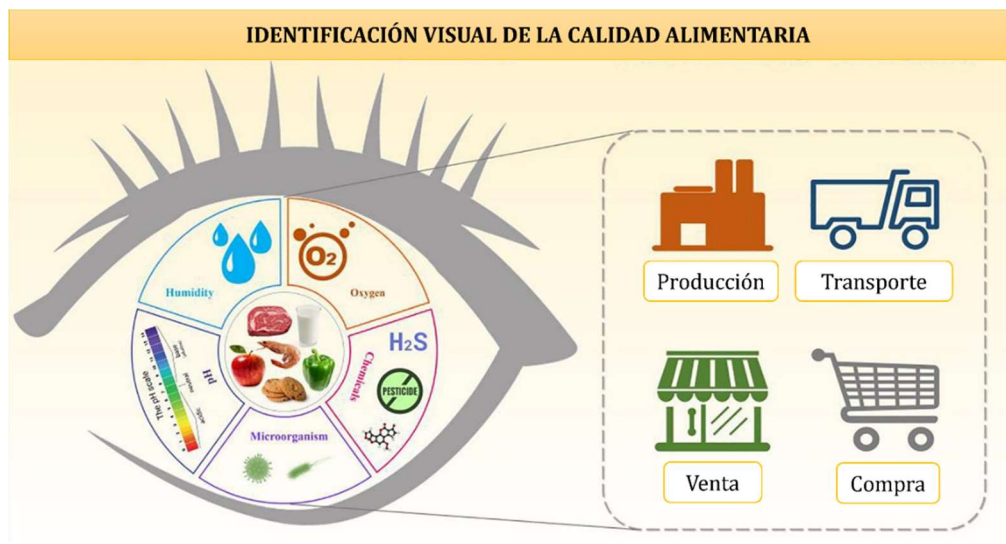


Figura 1.2. El envasado inteligente de alimentos puede realizar un seguimiento visual de la calidad de los alimentos (modificado de ref. 22).

El mercado del envasado inteligente está muy fragmentado, tal y como muestra la Figura 1.3. Sin embargo, esta tecnología está creciendo con un potencial enorme para mejorar la comodidad de los consumidores y se espera un potencial incremento del mercado con una tasa anual de 4.15 % durante el período de previsión de 2021 al 2026.

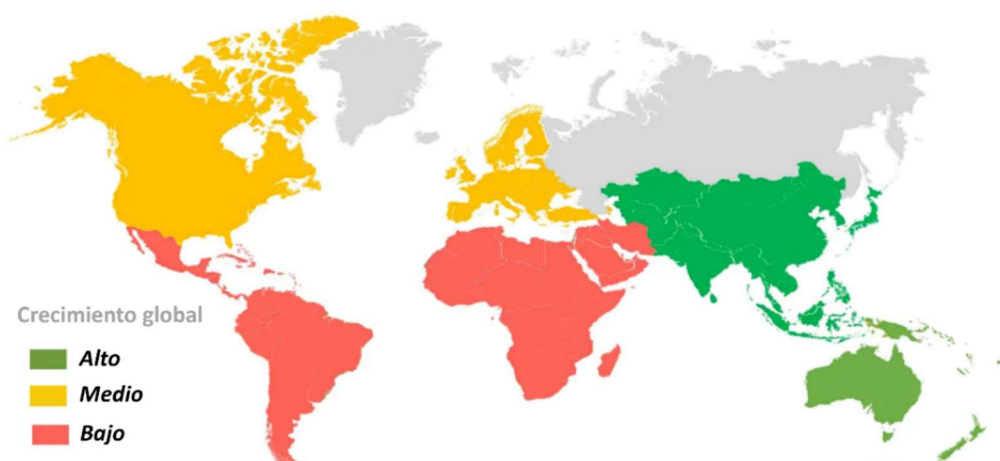


Figura 1.3. Crecimiento del mercado global para envasado activo e inteligente entre 2020-2025 (modificado de <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/active-and-intelligent-packaging-market-industry>).

²³ Kalpana, S.; Priyadarshini, S. R.; Maria Leena, M.; Moses, J. A.; Anandharamakrishnan, C. Intelligent packaging: Trends and applications in food systems. *Trends in Food Science & Technology* **2019**, *93*, 145-157.

El envasado de alimentos es un término amplio que describe nuevos conceptos de envasado, la mayoría de los cuales se pueden clasificar en dos categorías principales: envases activos o inteligentes.²⁴

La EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) define el envasado inteligente y activo como “materiales que controlan el estado y las condiciones del entorno del alimento envasado, pero no interactúan con el producto”. Su objetivo es monitorizar el producto y transmitir la información a los consumidores. Se considera activo si el componente o sustancia está destinado a prolongar la vida útil o mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados. Por otro lado, inteligente significa que controla el estado del alimento envasado o el entorno que rodea.

Las definiciones establecidas en el Reglamento 1935/2004/CE y en el Reglamento 450/2009/EC consideran:

- Envasado activo: “materiales y artículos destinados a prolongar la vida útil o a mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados”. Están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que liberan o absorben sustancias desde el alimento envasado o desde el medio ambiente que lo rodea.
- Envasado inteligente: “materiales y artículos que controlan el estado de los alimentos envasados o el entorno que rodea al alimento”.

De ello, se deduce que la finalidad del envase activo es la ampliación de la vida útil de los alimentos y el mantenimiento o, incluso, la mejora de su calidad.²⁵ Por otra parte, el propósito de los envases inteligentes es dar indicaciones y monitorear la frescura de los alimentos.²⁶

1.1.5 Alergias y seguridad alimentaria

Según el libro Blanco de la WAO (World Allergy Organization) se estima que las alergias alimentarias afectan alrededor del 2-5% de los adultos y del 6-8% de los niños, a nivel

²⁴ Kerry, J. P. 20 - Application of smart packaging systems for conventionally packaged muscle-based food products. In *Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging*, Kerry, J. P. Ed.; Woodhead Publishing, 2012; pp 522-564.

²⁵ Brody, A. L. What's active in active packaging. *Food Technology* **2001**, 55, 104-106.

²⁶ Han, J. H.; Ho, C. H. L.; Rodrigues, E. T. 9 - Intelligent packaging. In *Innovations in Food Packaging*, Han, J. H. Ed.; Academic Press, 2005; pp 138-155.

mundial.^{27,28,29} Los alérgenos alimentarios son componentes específicos de los alimentos o ingredientes dentro de los alimentos, por lo general proteínas, que son reconocidos por células específicas que desencadenan la reacción inmune y que resultan en síntomas característicos que van desde leves hasta mortales.

La alergia alimentaria generalmente se describe como una reacción inmunológica resultante de la exposición a un alimento en particular desencadenando síntomas como picazón, diarrea, dolor de estómago, eczema, dificultad para respirar, pérdida de la conciencia o shock anafiláctico.³⁰ En términos clínicos, la hipersensibilidad alimentaria se puede clasificar en alergia alimentaria mediada o no mediada por inmunoglobulina E o IgE (como por ejemplo, la celiaquía) e hipersensibilidad alimentaria no alérgica, conocida colectivamente como intolerancia alimentaria que incluye trastornos metabólicos como la intolerancia a la lactosa.³¹

Los anticuerpos IgE son proteínas fabricadas por el sistema inmunitario, también llamados inmunoglobulinas, en respuesta a algún factor o agente que el organismo percibe como una amenaza. En las alergias alimentarias mediadas por IgE, después de una fase previa de sensibilización, los antígenos son reconocidos por las células inmunes específicas de los alérgenos y provocan reacciones inmediatas de hipersensibilidad.

En este proceso, los anticuerpos IgE se unen a las superficies de las células efectoras como los mastocitos en los tejidos o basófilos en la sangre. Cuando se encuentra el mismo alérgeno alimentario en una fase posterior, el alérgeno se asocia con la IgE asociada al mastocito o al basófilo y enlaza al menos dos anticuerpos IgE (Figura 1.4). Esto origina una cascada de procesos bioquímicos que causa la ruptura de la membrana celular y la liberación de mediadores contenidos que desencadenan la sintomatología alérgica.³²

²⁷ Roberts, G.; Grimshaw, K.; Beyer, K.; Boyle, R.; Lack, G.; Austin, M.; Garcia-Larsen, V.; Grabenhenrich, L.; Halken, S.; Keil, T.; et al. Can dietary strategies in early life prevent childhood food allergy? A report from two iFAAM workshops. *Clinical & Experimental Allergy* **2019**, *49* (12), 1567-1577.

²⁸ Sicherer, S. H.; Sampson, H. A. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2014**, *133* (2), 291-307.

²⁹ Poms, R. E.; Klein, C. L.; Anklam, E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives & Contaminants* **2004**, *21* (1), 1-31.

³⁰ Mills, E. N. C.; Mackie, A. R.; Burney, P.; Beyer, K.; Frewer, L.; Madsen, C.; Botjes, E.; Crevel, R. W. R.; Van Ree, R. The prevalence, cost and basis of food allergy across Europe. *Allergy* **2007**, *62* (7), 717-722.

³¹ Taylor, S. 1 - The nature of food allergy. In *Detecting Allergens in Food*, Koppelman, S. J., Hefle, S. L. Eds.; Woodhead Publishing, 2006; pp 3-20.

³² Alves, R. C.; Barroso, M. F.; González-García, M. B.; Oliveira, M. B. P. P.; Delerue-Matos, C. New Trends in Food Allergens Detection: Toward Biosensing Strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2016**, *56* (14), 2304-2319.

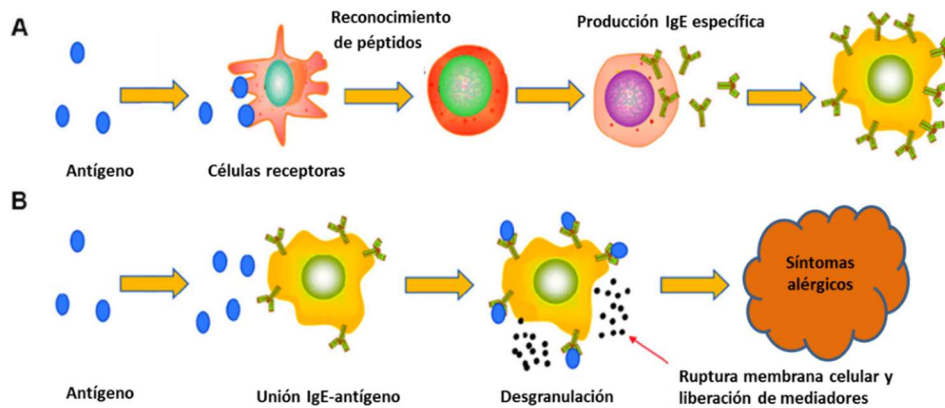


Figura 1.4. Mecanismo de alergia alimentaria. Son necesarios dos pasos para que esto ocurra: una fase inicial de sensibilización a un antígeno específico (A) y la provocación de una reacción alérgica después de una segunda exposición al mismo antígeno (B) (modificado de ref. 32).

Actualmente, no existe ningún tratamiento efectivo para las personas que sufren alergias alimentarias y la estrategia más eficaz de evitar una reacción alérgica es asegurarse de no consumir los alimentos que las producen. Los informes clínicos han identificado un total de 160 alérgenos alimentarios. Alrededor del 90% de los casos de pacientes son causados por los ocho principales alérgenos: huevos, leche, crustáceos, mariscos, pescado, cacahuetes, frutos secos, soja y trigo, tal y como se representa en la Figura 1.5.^{33,34}

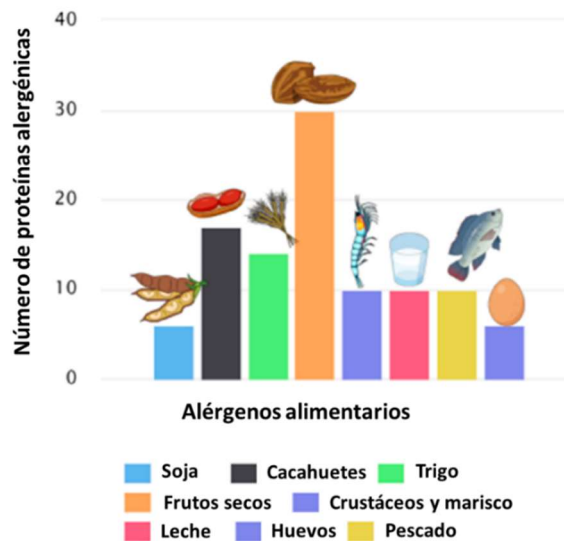


Figura 1.5. Esquema del número de proteínas alergénicas presentes en los principales alimentos alergénicos. En esta figura se representan los "ocho grandes" alimentos alergénicos (modificado de ref. 34).

³³ Neethirajan, S.; Weng, X.; Tah, A.; Cordero, J. O.; Ragavan, K. V. Nano-biosensor platforms for detecting food allergens – New trends. *Sensing and Bio-Sensing Research* **2018**, *18*, 13-30.

³⁴ Aquino, A.; Conte-Junior, C. A. A Systematic Review of Food Allergy: Nanobiosensor and Food Allergen Detection. In *Biosensors*, **2020**, *10* (12), 194.

La alergia alimentaria se considera una de las principales amenazas para la salud y la incidencia de hipersensibilidad a los alérgenos está aumentando³⁵ por una suma de factores como la globalización, la creciente complejidad en el procesamiento de los alimentos contaminados inadvertidamente a través de ingredientes que contienen alérgenos no declarados o la contaminación cruzada asociada a una exposición accidental por el uso inadecuado de equipos e instalaciones compartidas³⁶ o por cuestiones relacionadas con falta de buenas prácticas de limpieza o fabricación. Esto conduce a la presencia de los llamados "alérgenos ocultos".

Dado que no existe un marco legislativo específico para el etiquetado de los productos alimenticios posiblemente contaminados con alérgenos, la aplicación del etiquetado preventivo sigue siendo incoherente en la industria y no siempre está claro para los productores de alimentos cómo gestionar esta cuestión.

Este tipo de etiquetado se denomina "Etiquetado Precautorio de Alérgenos" (EPA) y, se define como el etiquetado voluntario empleado para indicar que uno o más alérgenos legislados podrían estar de forma involuntaria representando un riesgo para los consumidores susceptibles. Para ello, se utilizan expresiones como "Puede contener..." o "Puede contener trazas de...". Sin embargo, el uso extensivo y excesivo de tales mensajes de advertencia puede ser confuso e impone severas restricciones a las opciones dietéticas de los consumidores alérgicos, quienes se ven obligados a depender principalmente de los alimentos preparados en casa en lugar de alimentos cocinados en restauración.³⁷ Por tanto, a la hora de realizar el etiquetado de alérgenos alimentarios es importante tener en cuenta todos los factores que influyen en el proceso del alimento (ver Figura 1.6).

³⁵ Ciardiello, M. A.; Tamburrini, M.; Liso, M.; Crescenzo, R.; Rifaiani, C.; Mari, A. Food allergen profiling: A big challenge. *Food Research International* **2013**, *54* (1), 1033-1041.

³⁶ RÖDer, M.; Ibach, A.; Baltruweit, I.; Gruyters, H.; Janise, A.; Suwelack, C.; Matissek, R.; Vieths, S.; Holzhauser, T. Pilot Plant Investigations on Cleaning Efficiencies To Reduce Hazelnut Cross-Contamination in Industrial Manufacture of Cookies. *Journal of Food Protection* **2008**, *71* (11), 2263-2271.

³⁷ Cucu, T.; Jacxsens, L.; De Meulenaer, B. Analysis To Support Allergen Risk Management: Which Way To Go? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61* (24), 5624-5633.



Figura 1.6. Árbol de decisiones para el etiquetado de alérgenos alimentarios.

1.1.6 El etiquetado de alérgenos alimentarios

El reglamento nº 1169/2011 de la Ley de Información Alimentaria obliga a informar sobre la presencia de cualquiera de los 14 alérgenos alimentarios de declaración obligatoria. El reglamento no establece ningún límite de concentración de alérgeno alimentario a partir del cual la declaración de dicha presencia sea obligatoria.³⁸ Sólo se especifica para el caso del dióxido de azufre y sulfitos, con un valor de concentración superior a los 10 mg·kg⁻¹ o 10 mg·L⁻¹ en términos de SO₂ total. Este hecho se debe a la falta de datos para establecer los límites cuantitativos a partir de los cuales los alimentos producen la reacción alérgica en las personas alérgicas. La evaluación de riesgo resulta extremadamente complicada debido al amplio rango de reactividad de los alérgenos. Inicialmente, la industria alimentaria optó por un enfoque denominado “tolerancia cero”. Sin embargo, la “tolerancia cero” no se puede equiparar con riesgo cero.

³⁸ DIRECTIVA 2007/68/CE DE LA COMISIÓN de 27 de noviembre de 2007 que modifica el anexo III bis de la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que se refiere a determinados ingredientes alimentarios, pp 11-14.

Tabla 1.1. Valores de dosis de referencia para el etiquetado voluntario de trazas de alérgenos.

| Alérgeno alimentario | Dosis de referencia (mg de proteína) | Nivel de acción (ppm) | |
|----------------------|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | | *tamaño de porción 50 g | *tamaño de porción 250 g |
| Cacahuete | 0.20 | 4.0 | 0.80 |
| Leche | 0.10 | 2.0 | 0.40 |
| Huevo | 0.03 | 0.6 | 0.12 |
| Avellana | 0.10 | 2.0 | 0.40 |
| Soja | 1.00 | 20.0 | 4.00 |
| Trigo | 1.00 | 20.0 | 4.00 |
| Anacardo | 2.00 | 40.0 | 8.00 |
| Mostaza | 0.05 | 1.0 | 0.20 |
| Altramuz | 4.00 | 80.0 | 16.00 |
| Sésamo | 0.20 | 4.0 | 0.80 |
| Gamba | 10.00 | 200.0 | 40.00 |

La Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) ha establecido dosis de referencia según la iniciativa VITAL (del inglés “Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling”) sobre el etiquetado voluntario de la presencia accidental de trazas de alérgenos, desarrollada por Allergen Bureau (Tabla 1.1). El programa proporciona una metodología donde se establecen las dosis de referencia (mg de proteína) por debajo de las cuales sólo los individuos más sensibles (entre 1 y 5%) son propensos a experimentar una reacción adversa.^{39,40} VITAL está diseñado para situaciones en las que el alérgeno involuntario se distribuye uniformemente (homogéneamente) en el producto. En caso contrario, el uso de EPA es la única opción.

No obstante, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), la Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos (CFIA) y otras organizaciones de gestión de la seguridad alimentaria están trabajando en colaboración para estandarizar los métodos de detección de alérgenos y los valores umbral para así establecer requisitos de etiquetado de alimentos.

³⁹ Muraro, A.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Holzhauser, T.; Poulsen, L. K.; Gowland, M. H.; Akdis, C. A.; Mills, E. N. C.; Papadopoulos, N.; Roberts, G.; Schnadt, S.; et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Protecting consumers with food allergies: understanding food consumption, meeting regulations and identifying unmet needs. *Allergy* **2014**, *69* (11), 1464-1472.

⁴⁰ Allen, K. J.; Remington, B. C.; Baumert, J. L.; Crevel, R. W. R.; Houben, G. F.; Brooke-Taylor, S.; Kruijzinga, A. G.; Taylor, S. L. Allergen reference doses for precautionary labeling (VITAL 2.0): Clinical implications. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2014**, *133* (1), 156-164.

Por ejemplo, la norma internacional del Código Alimentario exige que el término “libre de gluten” indique un nivel de gluten inferior a 20 mg·kg⁻¹ y un “nivel de gluten muy bajo” indique un nivel de 20 a 100 mg·kg⁻¹.⁴¹ Además, la FDA y la CFIA exigen que las pruebas de detección de alérgenos alimentarios utilicen 100 mL de solución para muestras líquidas, como agua potable, o al menos 25 g para muestras sólidas de alimentos, como productos cárnicos. Por otro lado, la intolerancia a la lactosa no es una alergia a la leche, ya que no afecta al sistema inmunitario. Sin embargo, afecta a un 65 % estimado de la población adulta humana,⁴² de ahí la importancia de los productos alimenticios sin lactosa/bajos en lactosa. El nivel máximo admisible de lactosa en la leche sin lactosa es del 0.01 %, lo que confirma la necesidad de técnicas analíticas fiables para certificar la concentración de lactosa en varios productos.^{43,44}

El reglamento UE nº 1169/2011 (también conocido como Ley de Información Alimentaria) obliga a todo operador alimentario a informar al cliente de todos los alérgenos que contienen sus alimentos a través de un sistema de etiquetado que permita identificarlos con claridad.⁴⁵ El propósito es conseguir un alto nivel de protección de la salud y garantizar su derecho a la información.

En España y otros países de la Unión Europea, la industria alimentaria está obligada a aplicar un sistema de control, llamado Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC), con el objetivo de obtener alimentos seguros, controlar o evitar la contaminación cruzada y cumplir con las obligaciones legales de seguridad alimentaria. Existen diversas medidas como la planificación de producción y envasado, la formación del personal, la elaboración de protocolos de actuación o un plan de limpieza y desinfección.

⁴¹ Yin, H.-Y.; Chu, P.-T.; Tsai, W.-C.; Wen, H.-W. Development of a barcode-style lateral flow immunoassay for the rapid semi-quantification of gliadin in foods. *Food Chemistry* **2016**, *192*, 934-942.

⁴² Vasilescu, A.; Polonschii, C.; Titoiu, A. M.; Mishra, R.; Peteu, S.; Marty, J.-L. Chapter Nine - Bioassays and biosensors for food analysis: focus on allergens and food packaging. In *Commercial Biosensors and Their Applications*, Sezgintürk, M. K. Ed.; Elsevier, 2020; pp 217-258.

⁴³ Panseri, S.; Pavlovic, R.; Castrica, M.; Nobile, M.; Di Cesare, F.; Chiesa, L. M. Determination of Carbohydrates in Lactose-Free Dairy Products to Support Food Labelling. *Foods* **2021**, *10* (6), 1219.

⁴⁴ Bayless, T. M.; Brown, E.; Paige, D. M. Lactase Non-persistence and Lactose Intolerance. *Current Gastroenterology Reports* **2017**, *19* (5), 23.

⁴⁵ REGLAMENTO (UE) No 1169/2011 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) no 1924/2006 y (CE) no 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) no 608/2004 de la Comisión, pp 18-63.

En este sentido, cobra una especial importancia el nivel de la técnica para la detección del alérgeno. Por este motivo, el desarrollo de kits de análisis para la detección de alérgenos se ha vuelto una necesidad crítica para la industria alimentaria.

1.2 Sistemas de detección en la industria alimentaria

Tradicionalmente, los materiales de envasado se han utilizado principalmente como barreras pasivas, inactivas e inertes diseñadas para evitar que la humedad, el oxígeno y los contaminantes lleguen al producto alimentario.⁴⁶ En el envasado activo, el producto, el empaquetamiento y el entorno interactúan entre sí y trabajan activamente para mejorar la condición de los alimentos y aumentar su vida útil.⁴⁷ Por otra parte, el objetivo del envasado inteligente es permitir la monitorización de los alimentos envasados y/o el entorno, para proporcionar a los clientes información sobre la calidad y seguridad de los alimentos a través de una variedad de señales.⁴⁸ En la Figura 1.7 se resume la clasificación y los tipos de envasado activo e inteligente que se detallan en los apartados posteriores.

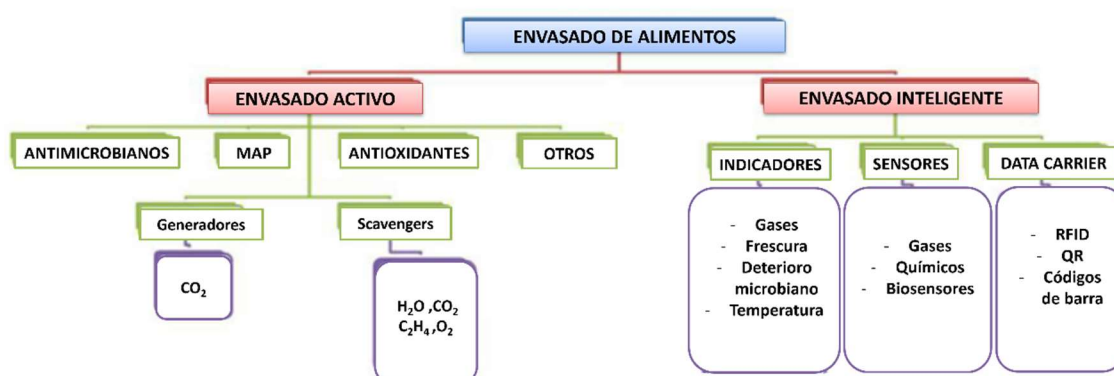


Figura 1.7. Clasificación del tipo de envasado de alimentos (modificado de ref. 47).

1.2.1 Envasado activo

Un envase activo se entiende que modifica el estado de los alimentos envasados para prolongar su vida útil o mejorar su seguridad, manteniendo su calidad. Unas veces esto se logra por las propiedades intrínsecas del material de envasado y otras agregando algunos aditivos específicos al material para lograr un mejor rendimiento. En este sentido, estos

⁴⁶ Yam, K. L.; Takhistov, P. T.; Miltz, J. Intelligent Packaging: Concepts and Applications. *Journal of Food Science* **2005**, *70* (1), R1-R10.

⁴⁷ Salgado, P.R.; Di Giorgio, L.; Musso, Y.S.; Mauri, A.N. Recent Developments in Smart Food Packaging Focused on Biobased and Biodegradable Polymers. *Front. Sustain. Food Syst.* **2021**, *5*, 125.

⁴⁸ Vanderroost, M.; Ragaert, P.; Devlieghere, F.; De Meulenaer, B. Intelligent food packaging: The next generation. *Trends in Food Science & Technology* **2014**, *39* (1), 47-62.

materiales están destinados a incorporar deliberadamente componentes que liberen o absorban sustancias hacia o desde los alimentos envasados y el entorno que rodea a los alimentos.^{49,50} Por lo tanto, el envase activo se consideraría como una extensión de la función de protección y preservación de envases de alimentos tradicionales. De este modo, los sistemas de envase activo para la industria alimentaria, con diferentes funcionalidades, se pueden clasificar principalmente en antimicrobianos, antioxidantes y envases de atmósfera modificada (MAP) basados en eliminación de O₂, absorción de etileno (C₂H₄), absorción/emisión de CO₂, controladores de humedad y sistemas de liberación/absorción de sabores y olores.

1.2.1.1 Antimicrobiano

Se basa en una forma de envasado activo como un enfoque prometedor para inhibir, reducir o retardar el crecimiento de microorganismos. Se pueden clasificar en dos tipos como se muestra en la Figura 1.8: (A) los que contienen agentes antimicrobianos que migran a la superficie de los alimentos y (B) los que son efectivos contra los microbios de la superficie sin migración del agente activo a los alimentos.^{51,52}

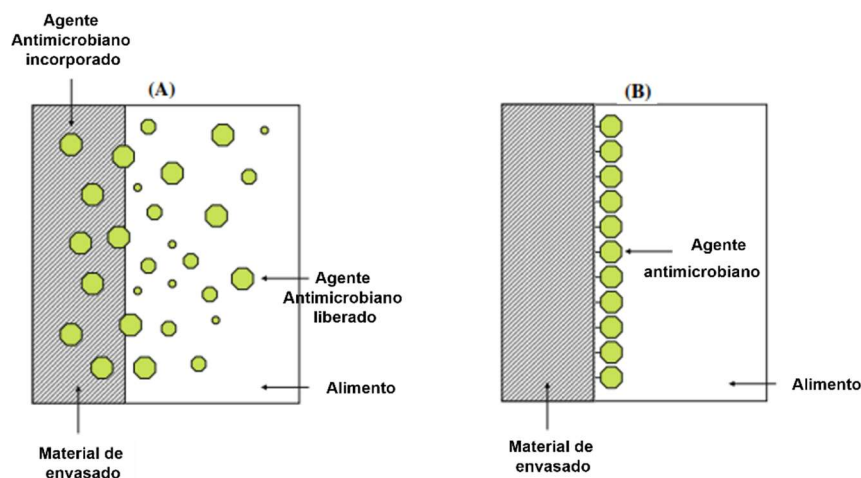


Figura 1.8. Mecanismo de sistemas antimicrobianos para envasado activo de alimentos (modificado de ref. 52).

⁴⁹ Robertson, G.L. (2012). *Food Packaging: Principles and Practice*, Third Edition (3rd ed.). CRC Press.

⁵⁰ Kuswandi, B.; Jumina. 12 - Active and intelligent packaging, safety, and quality controls. In *Fresh-Cut Fruits and Vegetables*, Siddiqui, M. W. Ed.; Academic Press, 2020; pp 243-294.

⁵¹ Han, J. H. 4 - Antimicrobial food packaging. In *Novel Food Packaging Techniques*, Ahvenainen, R. Ed.; Woodhead Publishing, 2003; pp 50-70.

⁵² Bastarrachea, L.; Dhawan, S.; Sablani, S. S. Engineering Properties of Polymeric-Based Antimicrobial Films for Food Packaging: A Review. *Food Engineering Reviews* **2011**, 3 (2), 79-93.

La aplicación superficial directa de sustancias antibacterianas sobre los alimentos tiene aplicaciones limitadas porque la sustancia activa se neutraliza al contacto o se difunde rápidamente desde la superficie hasta el alimento. El primer mecanismo presenta limitaciones tales como la inactivación parcial del crecimiento microbiano si la liberación o migración del agente microbiano no está controlada, y el riesgo de seguridad derivado de la migración directa de sustancias bioactivas a la matriz del alimento destinado al consumo.⁵³

Se ha investigado intensamente una amplia gama de tipos de agentes antimicrobianos y materiales de envasado de alimentos para aumentar la eficacia antimicrobiana del envase activo. Entre ellos, se pueden destacar ácidos orgánicos,⁵⁴ aceites esenciales,⁵⁵ nanopartículas basadas en óxidos metálicos,^{56,57} agentes volátiles antimicrobianos (como etanol,^{58,59} SO₂,⁶⁰ ClO₂,⁶¹ e isocianato de alilo⁶²), polímeros,⁶³ e incluso, la aplicación de líquidos iónicos.^{64,65}

⁵³ Quintavalla, S.; Vicini, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* **2002**, *62* (3), 373-380.

⁵⁴ Coban, H. B. Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2020**, *43* (4), 569-591.

⁵⁵ Maisanaba, S.; Llana-Ruiz-Cabello, M.; Gutiérrez-Praena, D.; Pichardo, S.; Puerto, M.; Prieto, A. I.; Jos, A.; Cameán, A. M. New advances in active packaging incorporated with essential oils or their main components for food preservation. *Food Reviews International* **2017**, *33* (5), 447-515.

⁵⁶ García, C. V.; Shin, G. H.; Kim, J. T. Metal oxide-based nanocomposites in food packaging: Applications, migration, and regulations. *Trends in Food Science & Technology* **2018**, *82*, 21-31.

⁵⁷ Dobrucka, R.; Ankiel, M. Possible applications of metal nanoparticles in antimicrobial food packaging. *Journal of Food Safety* **2019**, *39* (2), e12617.

⁵⁸ Hempel, A. W.; Papkovsky, D. B.; Kerry, J. P. Use of Optical Oxygen Sensors in Non-Destructively Determining the Levels of Oxygen Present in Combined Vacuum and Modified Atmosphere Packaged Pre-Cooked Convenience-Style Foods and the Use of Ethanol Emitters to Extend Product Shelf-Life. *Foods* **2013**, *2* (4), 507-520.

⁵⁹ Mu, H.; Gao, H.; Chen, H.; Fang, X.; Han, Q. A novel controlled release ethanol emitter: preparation and effect on some postharvest quality parameters of Chinese Burberry during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2017**, *97* (14), 4929-4936.

⁶⁰ Machado, N. M. P.; Melo, G. C.; Camargo, M. F.; Feijó, G. G.; Putton, B. M. S.; Steffens, C.; Cansian, R. L.; Pessan, L. A.; Moreira, F. K. V. Melt Extrusion of Environmentally Friendly Poly(L-lactic acid)/Sodium Metabisulfite Films for Antimicrobial Packaging Applications. *Journal of Renewable Materials* **2021**, *9* (2), 337-349.

⁶¹ Kim, H.; Lee, J.; Sadeghi, K.; Seo, J. Controlled self-release of ClO₂ as an encapsulated antimicrobial agent for smart packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2021**, *74*, 102802.

⁶² Kara, H. H.; Xiao, F.; Sarker, M.; Jin, T. Z.; Sousa, A. M. M.; Liu, C.-K.; Tomasula, P. M.; Liu, L. Antibacterial poly(lactic acid) (PLA) films grafted with electrospun PLA/allyl isothiocyanate fibers for food packaging. *Journal of Applied Polymer Science* **2016**, *133* (2), 42475.

⁶³ Lunkov, A. P.; Ilyina, A. V.; Varlamov, V. P. Antioxidant, Antimicrobial, and Fungicidal Properties of Chitosan Based Films (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* **2018**, *54* (5), 449-458.

⁶⁴ Mehta, M. J.; Kumar, A. Ionic Liquid Assisted Gelatin Films: Green, UV Shielding, Antioxidant, and Antibacterial Food Packaging Materials. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2019**, *7* (9), 8631-8636.

⁶⁵ Shimul, I. M.; Moshikur, R. M.; Minamihata, K.; Moniruzzaman, M.; Kamiya, N.; Goto, M. Amino Acid Ester based Phenolic Ionic Liquids as a Potential Solvent for the Bioactive Compound Luteolin:

Al desarrollar y fabricar sistemas activos, se deben seguir los requisitos y estándares de las diferentes agencias reguladoras que establecen la base legal para su uso preciso, seguridad y comercialización. Algunos sistemas de envasado antimicrobiano (AMP) comerciales y disponibles en el mercado se resumen en la Tabla 1.2. Sin embargo, estos sistemas presentan ciertas desventajas como respuesta hipersensible (por ejemplo, el SO₂ se incluye en los sulfitos y se considera un alérgeno con una concentración límite de 10 mg·L⁻¹),⁶⁶ fuerte olor o alteración visual del producto envasado.

Tabla 1.2. Técnicas comercialmente disponibles de envasado antimicrobiano.

| Nombre comercial | Sustancia activa | Mecanismo |
|---------------------|---|--|
| Agion (USA) | Ag | Ag ⁺ inhibe replicación ATP o ADN, daño |
| Zeomic (Japón) | Ag | de la membrana celular o generación |
| Bactiblock (España) | Ag | de especies O ₂ ⁶⁷ |
| Uvasy (Sudáfrica) | SO ₂ (como S ₂ O ₅ ²⁻) | Mata proteínas y enzimas celulares |
| Microgarde (USA) | ClO ₂ (como ClO ₂ ⁻) | Rompe la membrana celular |
| WasaOuro (Japón) | Isocianato de alilo | Altera la estructura proteica ⁶⁸ |
| Ethicap (USA) | Etanol | Inhibe el crecimiento |

1.2.1.2 Antioxidante

La degradación oxidativa es la segunda causa del deterioro de los alimentos, ya que las reacciones oxidativas son las responsables de la disminución del valor nutritivo de los alimentos provocado por la degradación de ácidos grasos esenciales, proteínas y lípidos, producción de sabores y olores desagradables, y cambio de color debido a la degradación del pigmento.⁶⁹ Con respecto a alimentos, los agentes antioxidantes se utilizan principalmente para alimentos envasados con alto contenido de lípidos, como carne, pescado, nueces y aceites vegetales.⁷⁰ Existen dos métodos de acción como se refleja en la Figura 1.9: (A) la adición de compuestos antioxidantes, también conocidos como “free-

Synthesis, Characterization, and Food Preservation Activity. *Journal of Molecular Liquids* **2022**, 349, 118103.

⁶⁶ Pisoschi, A. M.; Pop, A.; Gajaila, I.; Iordache, F.; Dobre, R.; Cazimir, I.; Serban, A. I. Analytical methods applied to the assay of sulfur-containing preserving agents. *Microchemical Journal* **2020**, 155, 104681.

⁶⁷ de Azeredo, H. M. C. Antimicrobial nanostructures in food packaging. *Trends in Food Science & Technology* **2013**, 30 (1), 56-69.

⁶⁸ Lin, C.-M.; Preston, J. F., III; Wei, C.-I. Antibacterial Mechanism of Allyl Isothiocyanate†. *Journal of Food Protection* **2000**, 63 (6), 727-734.

⁶⁹ Gómez-Estaca, J.; López-de-Dicastillo, C.; Hernández-Muñoz, P.; Catalá, R.; Gavara, R. Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology* **2014**, 35 (1), 42-51.

⁷⁰ Ganiari, S.; Choulitoudi, E.; Oreopoulou, V. Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. *Trends in Food Science & Technology* **2017**, 68, 70-82.

radical scavengers” o (B) la eliminación de compuestos no deseados que pueden acelerar las reacciones de oxidación, como el O₂, el oxígeno singlete (¹O₂), luz ultravioleta o iones metálicos.⁷¹ La ventaja del segundo tipo radica en su capacidad para reducir o prevenir la aparición de reacciones de oxidación, mientras que los antioxidantes primarios reaccionan con los radicales libres para convertirlos en productos que no participen en otras reacciones oxidativas. La incorporación de los agentes antioxidantes en la formulación del material de envasado surge como una alternativa para mejorar la estabilidad de la comida y satisfacer la demanda del consumidor que prefiere excluir o reducir la presencia de aditivos. No obstante, el principal inconveniente en cuanto al uso de recursos naturales antioxidantes incorporados al envase es el requisito de cantidades más grandes para alcanzar la misma actividad antioxidante en el sistema alimentario.⁷²

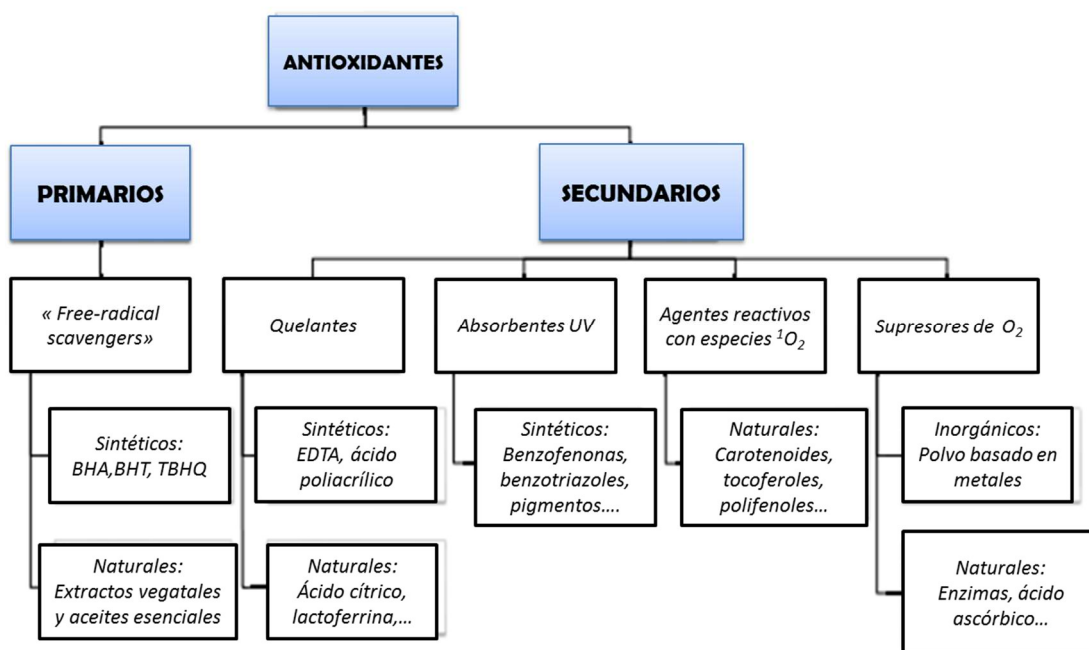


Figura 1.9. Clasificación de los compuestos antioxidantes según su mecanismo de acción (modificado de ref. 71).

⁷¹ Vilela, C.; Kurek, M.; Hayouka, Z.; Röcker, B.; Yildirim, S.; Antunes, M. D. C.; Nilsen-Nygaard, J.; Pettersen, M. K.; Freire, C. S. R. A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology* **2018**, *80*, 212-222.

⁷² Tian, F.; Decker, E. A.; Goddard, J. M. Controlling lipid oxidation of food by active packaging technologies. *Food & Function* **2013**, *4* (5), 669-680.

En el primer tipo, se pueden encontrar antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT), la terbutilhidroquinona (TBHQ)⁷³ o butilhidroxianisol (BHA),⁷⁴ aunque se ha demostrado que el BHA muestra carácter carcinogénico sobre la salud humana.⁷⁵ Por ello, se prefieren antioxidantes naturales tales como extractos vegetales, tocoferoles y aceites esenciales.⁷⁶

Por otro lado, los antioxidantes secundarios pueden ser agentes quelantes (para derivados de cobre o hierro) de origen sintético⁷⁷ y de origen natural,⁷⁸ absorbentes de luz UV basados en benzofenonas, benzotriazoles y pigmentos,⁷⁹ y agentes reactivos con $^1\text{O}_2$ como caretonoides, tocoferoles y polifenoles que tienen la capacidad prevenir la fotooxidación.⁸⁰

En el aspecto comercial, ATOX es el nombre de un envase antioxidante producido en España, el cual consiste en un recubrimiento a base de aceites esenciales de orégano para la protección de los alimentos perecederos. En la bibliografía, también se pueden encontrar algunas referencias basadas en líquidos iónicos.⁸¹

1.2.1.3 Absorción de humedad

La humedad es uno de los factores más críticos en la industria alimentaria, ya que acelera el crecimiento de microorganismos y la degradación de los alimentos. Este factor puede tener efectos nocivos y destructivos desde el transporte hasta el almacenamiento.⁸² Una buena

⁷³ Tongdeesoontorn, W.; Mauer, L. J.; Wongruong, S.; Sriburi, P.; Rachtanapun P. Physical and Antioxidant Properties of Cassava Starch-Carboxymethyl Cellulose Incorporated with Quercetin and TBHQ as Active Food Packaging. *Polymers* **2020**, *12* (2), 366.

⁷⁴ Jamshidian, M.; Arab Tehrani, E.; Cleymand, F.; Leconte, S.; Falher, T.; Desobry, S. Effects of synthetic phenolic antioxidants on physical, structural, mechanical and barrier properties of poly lactic acid film. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87* (2), 1763-1773.

⁷⁵ Nieva-Echevarría, B.; Manzano, M. J.; Goicoechea, E.; Guillén, M. D. 2,6-Di-Tert-Butyl-Hydroxytoluene and Its Metabolites in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2015**, *14* (1), 67-80.

⁷⁶ Sanches-Silva, A.; Costa, D.; Albuquerque, T. G.; Buonocore, G. G.; Ramos, F.; Castilho, M. C.; Machado, A. V.; Costa, H. S. Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2014**, *31* (3), 374-395.

⁷⁷ Tian, F.; Decker, E. A.; Goddard, J. M. Development of an Iron Chelating Polyethylene Film for Active Packaging Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60* (8), 2046-2052.

⁷⁸ Baker, E. N.; Baker, H. M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie* **2009**, *91* (1), 3-10.

⁷⁹ Coltro, L.; Borghetti, J. Plastic packages for personal care products - Evaluation of light barrier properties. *Polimeros-ciencia E Tecnologia - POLIMEROS* **2007**, *17*.

⁸⁰ Manassis, G.; Kalogianni, A. I.; Lazou, T.; Moschovas, M.; Bossis, I.; Gelasakis, A. I. Plant-Derived Natural Antioxidants in Meat and Meat Products. *Antioxidants* **2020**, *9* (12), 1215.

⁸¹ Rizzo, C.; Marullo, S.; Dintcheva, N. T.; Gambarotti, C.; Billeci, F.; D'Anna, F. Ionic liquid gels and antioxidant carbon nanotubes: Hybrid soft materials with improved radical scavenging activity. *Journal of Colloid and Interface Science* **2019**, *556*, 628-639.

⁸² Gaikwad, K. K.; Singh, S.; Aji, A. Moisture absorbers for food packaging applications. *Environmental Chemistry Letters* **2019**, *17* (2), 609-628.

solución es el uso de absorbentes de humedad para controlar y regular la presencia y el nivel de agua, así como reducir su actividad. Los absorbentes activos de humedad, que son generalmente sustancias higroscópicas, se pueden dividir en dos categorías principales: Controladores de humedad relativa (como desecantes) que absorben la humedad en el espacio superior del paquete, y eliminadores de humedad que absorben líquidos exudados de productos alimenticios.⁸³ Según su naturaleza química, hay absorbentes orgánicos con muchas cualidades y ventajas requeridas para la percepción del consumidor y la sostenibilidad (como fructosa⁸⁴ o sorbitol⁸⁵). Las principales desventajas es que son más caros y tienen menor capacidad de absorción en comparación con los absorbentes inorgánicos. Los inorgánicos basados en sales (gel de sílice, CaCl₂ o KCl) y arcillas (bentonita), son los más comunes para el envasado de alimentos debido a su naturaleza no tóxica y no corrosiva. Se encuentran también zeolitas⁸⁶ o polímeros que contiene sales comunes. Finalmente, los absorbentes poliméricos son la nueva área de atención, ya que pueden combinar tanto la propiedad de envasado como la propiedad de absorbente de humedad. Se pueden destacar derivados de la celulosa (CMC),⁸⁷ sales del ácido poliacrílico⁸⁸ o polivinilalcohol (PVA).⁸⁹

1.2.1.4 Modified Atmosphere Packaging (MAP)

La tecnología MAP implica la alteración de la atmósfera gaseosa dentro de un paquete de alimentos para preservar la calidad de los alimentos, extender su vida útil y reducir la generación de olores.⁹⁰ El O₂ es esencial para ciertas actividades biológicas que provocan la degradación de la calidad de los alimentos. Por otro lado, el CO₂ es un gas incoloro e inodoro

⁸³ Yildirim, S.; Röcker, B.; Pettersen, M. K.; Nilsen-Nygaard, J.; Ayhan, Z.; Rutkaite, R.; Radusin, T.; Suminska, P.; Marcos, B.; Coma, V. Active Packaging Applications for Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2018**, *17* (1), 165-199.

⁸⁴ Bovi, G. G.; Caleb, O. J.; Klaus, E.; Tintchev, F.; Rauh, C.; Mahajan, P. V. Moisture absorption kinetics of FruitPad for packaging of fresh strawberry. *Journal of Food Engineering* **2018**, *223*, 248-254.

⁸⁵ Roy, S.; Anantheswaran, R.; Beelman, R. Sorbitol Increases Shelf Life of Fresh Mushrooms Stored in Conventional Packages. *Journal of Food Science* **2006**, *60*, 1254-1259.

⁸⁶ Wu, C.-S.; Liao, J.-Y.; Fang, S.-Y.; Chiang, A. Flexible and transparent moisture getter film containing zeolite. *Adsorption* **2010**, *16*, 69-74.

⁸⁷ Boruvkova, K.; Wiener, J. Water absorption in carboxymethyl cellulose. *Autex Research Journal* **2011**, *11*, 110-113.

⁸⁸ Mbugue, D. O.; Negrini, R.; Nyakundi, L. O.; Kuate, S. P.; Bandyopadhyay, R.; Muiru, W. M.; Torto, B.; Mezzenga, R. Application of superabsorbent polymers (SAP) as desiccants to dry maize and reduce aflatoxin contamination. *Journal of Food Science and Technology* **2016**, *53* (8), 3157-3165.

⁸⁹ Chen, C.-W.; Xie, J.; Yang, F.-X.; Zhang, H.-L.; Xu, Z.-W.; Liu, J.-L.; Chen, Y.-J. Development of moisture-absorbing and antioxidant active packaging film based on poly(vinyl alcohol) incorporated with green tea extract and its effect on the quality of dried eel. *Journal of Food Processing and Preservation* **2018**, *42* (1), e13374.

⁹⁰ Zhang, M.; Meng, X.; Bhandari, B.; Fang, Z.; Chen, H. Recent Application of Modified Atmosphere Packaging (MAP) in Fresh and Fresh-Cut Foods. *Food Reviews International* **2015**, *31* (2), 172-193.

que inhibe el crecimiento bacteriano, ya que al crear un entorno anaeróbico impide la descarboxilación enzimática.⁹¹ En este contexto, surge el método de envase de atmósfera modificada (MAP).⁹² Esta tecnología permite preservar la calidad del alimento y extender la duración de vida útil, ya que consiste generalmente en una baja concentración de O₂ (0–2 %) y una alta concentración de CO₂ (20–80 %).⁹³ Por ello, controlar la cantidad de CO₂ es muy importante para prolongar la vida útil de los alimentos.⁹⁴ Cabe destacar que los usos potenciales del MAP aumentan cuando se utiliza en conjunto con aditivos o biopolímeros, así como tecnologías como la nanotecnología.⁹⁵ Principalmente, pueden clasificarse en “scavengers” de O₂, controladores de CO₂ y “scavengers” de etileno (C₂H₄).

- **“Scavengers” de O₂**

Se diseñan para oxidar rápidamente y reducir el nivel de O₂ libre de manera selectiva en sistemas herméticamente cerrados o sensibles a la permeación de O₂.⁹⁶ El oxígeno acelera el deterioro oxidativo de los alimentos y el crecimiento de microorganismos reduciendo su estabilidad y vida útil.⁹⁷ La mayoría de los “scavengers” de O₂ se basan en Fe⁹⁸ y otros metales (Co,⁹⁹ Pd¹⁰⁰ y Ti¹⁰¹), ácidos orgánicos (ácidos ascórbico¹⁰² o gálico¹⁰³), colorantes

⁹¹ Lee, S. Y.; Lee, S. J.; Choi, D. S.; Hur, S. J. Current topics in active and intelligent food packaging for preservation of fresh foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2015**, *95* (14), 2799-2810.

⁹² Floros, J. D.; Matsos, K. I. 10 - Introduction to modified atmosphere packaging. In *Innovations in Food Packaging*, Han, J. H. Ed.; Academic Press, 2005; pp 159-172.

⁹³ Shen, Q.; Kong, F.; Wang, Q. Effect of modified atmosphere packaging on the browning and lignification of bamboo shoots. *Journal of Food Engineering - J FOOD ENG* **2006**, *77*, 348-354.

⁹⁴ Coyne, F. P.; Hardy, W. B. The effect of carbon dioxide on bacteria growth. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* **1933**, *113* (782), 196-217.

⁹⁵ Tajeddin, B.; Ahmadi, B.; Sohrab, F.; Chenarbon, H. A. Chapter 14 - Polymers for Modified Atmosphere Packaging Applications. In *Food Packaging and Preservation*, Grumezescu, A. M., Holban, A. M. Eds.; Academic Press, 2018; pp 457-499.

⁹⁶ Gaikwad, K. K.; Singh, S.; Lee, Y. S. Oxygen scavenging films in food packaging. *Environmental Chemistry Letters* **2018**, *16* (2), 523-538.

⁹⁷ Hogan, S. A.; Kerry, J. P. Smart Packaging of Meat and Poultry Products. In *Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods*, 2008; pp 33-59.

⁹⁸ Foltynowicz, Z.; Bardenshtein, A.; Sangerlaub, S.; Antvorskov, H.; Kozak, W. Nanoscale, zero valent iron particles for application as oxygen scavenger in food packaging. *Food Packaging and Shelf Life* **2017**, *11*, 74-83.

⁹⁹ Damaj, Z.; Joly, C.; Guillon, E. Toward New Polymeric Oxygen Scavenging Systems: Formation of Poly(vinyl alcohol) Oxygen Scavenger Film. *Packaging Technology and Science* **2014**, *28*, 293-302.

¹⁰⁰ Yildirim, S.; Rocker, B.; Ruegg, N.; Lohwasser, W. Development of Palladium-based Oxygen Scavenger: Optimization of Substrate and Palladium Layer Thickness. *Packaging Technology and Science* **2015**, *28* (8), 710-718.

¹⁰¹ Tulsyan, G.; Richter, C.; Diaz, C. A. Oxygen Scavengers Based on Titanium Oxide Nanotubes for Packaging Applications. *Packaging Technology and Science* **2017**, *30* (6), 251-256.

¹⁰² Lee, J.-S.; Chang, Y.; Lee, E.-S.; Song, H.-G.; Chang, P.-S.; Han, J. Ascorbic Acid-Based Oxygen Scavenger in Active Food Packaging System for Raw Meatloaf. *Journal of Food Science* **2018**, *83* (3), 682-688.

¹⁰³ Pant, A. F.; Sangerlaub, S.; Muller, K. Gallic Acid as an Oxygen Scavenger in Bio-Based Multilayer Packaging Films. *Materials (Basel, Switzerland)* **2017**, *10* (5), 489.

fotosensibles (eosina y curcumina) y enzimas (glucosa oxidasa¹⁰⁴ o lacasa¹⁰⁵). Algunos de los “scavengers” de O₂ disponibles comercialmente se mencionan en la Tabla 1.3.¹⁰⁶

Tabla 1.3. “Scavengers” de O₂ comerciales

| Nombre comercial | Sustancia activa | Mecanismo |
|-------------------------------|-------------------------|---|
| Ageless (Japón) | Fe | Oxidación de Fe (0) a Fe (III) |
| Oxbar (UK) | Co | Alilo susceptible de oxidación |
| Bioka (Finlandia) | Enzima | Requiere glucosa |
| Zero ₂ (Australia) | Fotosensible-UV | Formación de oxígeno singlete (¹ O ₂) |
| Darex (USA) | Ácido ascórbico | Oxidación a dehidroascórbico |

▪ **Controladores de CO₂**

El dióxido de carbono se aplica ampliamente en la industria alimentaria para prolongar la vida útil y conservar la calidad de los productos. Se trata de una molécula gaseosa soluble en las fases acuosas y grasas de los alimentos, lo que resulta en la acidificación del medio (H₂CO₃) que favorece la inhibición del crecimiento de microorganismos mediante un conjunto de mecanismos como alteración de la membrana celular bacteriana o cambios de pH citoplasmático.^{107,108} Sin embargo, niveles altos pueden causar efectos adversos en los productos alimenticios y en la integridad del envase, así que existen “scavengers” y generadores de CO₂. En la bibliografía se encuentran referencias sobre liberación de CO₂ para la conservación de alimentos.^{109,110} Por otro lado, la tecnología comercial comúnmente utilizada involucra mezclas de dos sustancias activas como bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y un ácido orgánico, así como ácido ascórbico(Verifrais™) o cítrico (SuperFresh o CO₂Pad).

¹⁰⁴ Wong, D. E.; Andler, S. M.; Lincoln, C.; Goddard, J. M.; Talbert, J. N. Oxygen scavenging polymer coating prepared by hydrophobic modification of glucose oxidase. *Journal of Coatings Technology and Research* **2017**, *14* (2), 489-495.

¹⁰⁵ Johansson, K.; Gillgren, T.; Winestrand, S.; Järnström, L.; Jönsson, L. J. Comparison of lignin derivatives as substrates for laccase-catalyzed scavenging of oxygen in coatings and films. *Journal of Biological Engineering* **2014**, *8* (1).

¹⁰⁶ Souza, R.; Peruch, G.; Pires, A. C. Oxygen Scavengers: An Approach on Food Preservation. 2012.

¹⁰⁷ Sivertsvik, M.; Jeksrud, W. K.; Rosnes, J. T. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science & Technology* **2002**, *37* (2), 107-127.

¹⁰⁸ Hansen, A.; Moen, B.; Rødbotten, M.; Berget, I.; Pettersen, M. Effect of vacuum or modified atmosphere packaging (MAP) in combination with a CO₂ emitter on quality parameters of cod loins (*Gadus morhua*). *Food Packaging and Shelf Life* **2016**, *9*, 29-37.

¹⁰⁹ Pettersen, M. K.; Hansen, A. Å.; Mielnik, M. Effect of Different Packaging Methods on Quality and Shelf Life of Fresh Reindeer Meat. *Packaging Technology and Science* **2014**, *27* (12), 987-997.

¹¹⁰ Holck, A. L.; Pettersen, M. K.; Moen, M. H.; SØRheim, O. Prolonged Shelf Life and Reduced Drip Loss of Chicken Filets by the Use of Carbon Dioxide Emitters and Modified Atmosphere Packaging. *Journal of Food Protection* **2014**, *77* (7), 1133-1141.

De igual modo, se encuentran también ejemplos basados en FeCO_3 (Ageless® G o FreshPax® M).¹¹¹

- “Scavengers” de etileno (C_2H_4).

Es un gas que actúa como una fitohormona responsable de la maduración y el ablandamiento de frutas y verduras, incluso en pequeñas cantidades. (< 0.1 ppm). Por lo tanto, el control durante el envío, almacenamiento y manejo es de gran importancia.¹¹² Como se muestra en la Figura 1.10, los métodos para el tratamiento del etileno se dividen en dos categorías¹¹³: inhibición o eliminación del etileno por métodos químicos o físicos (en la figura se reflejan productos disponibles comercialmente). El componente reactivo más utilizado es el permanganato de potasio (KMnO_4),¹¹⁴ aunque nunca se utiliza en contacto directo con alimentos debido a su alta toxicidad.

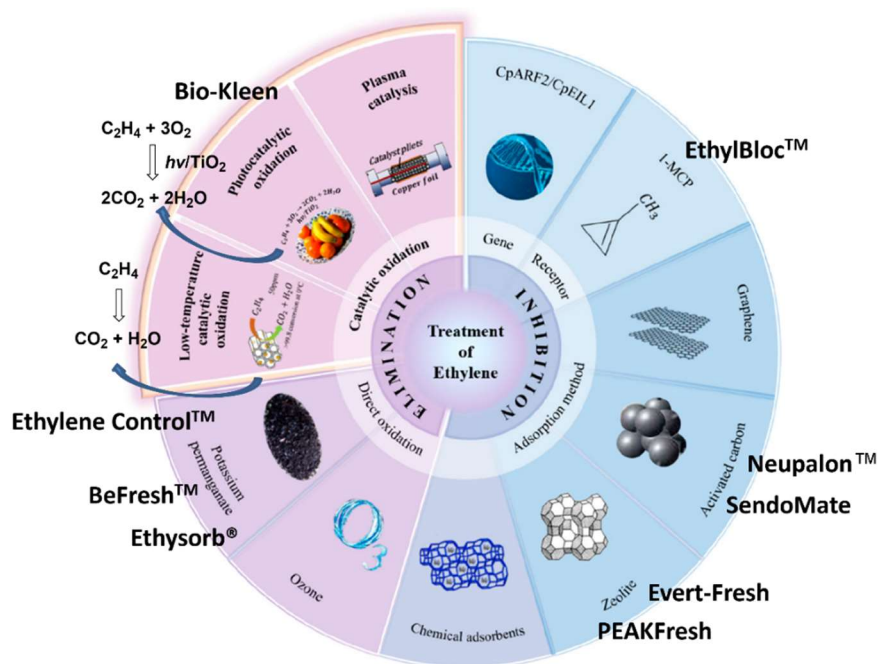


Figura 1.10. Métodos de eliminación de etileno y productos comerciales asociados (modificado de ref. 113).

¹¹¹ Alves, J.; Gaspar, P. D.; Lima, T. M.; Silva, P. D. What is the role of active packaging in the future of food sustainability? A systematic review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2022**.

¹¹² Gaikwad, K. K.; Singh, S.; Negi, Y. S. Ethylene scavengers for active packaging of fresh food produce. *Environmental Chemistry Letters* **2020**, *18* (2), 269-284.

¹¹³ Qi, Y.; Li, C.; Li, H.; Yang, H.; Guan, J. Elimination or Removal of Ethylene for Fruit and Vegetable Storage via Low-Temperature Catalytic Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2021**, *69* (36), 10419-10439.

¹¹⁴ Spricigo, P.; Foschini, M.; Ribeiro, C.; Correa, D.; Ferreira, M. Nanoscaled Platforms Based on SiO_2 and Al_2O_3 Impregnated with Potassium Permanganate Use Color Changes to Indicate Ethylene Removal. *Food and Bioprocess Technology* **2017**, *10*, 1622-1630.

El etileno también se puede eliminar por adsorción física en superficies activas como carbón activado, fibra de carbón, gel de sílice y zeolitas.¹¹⁵ Por otro lado, el uso de 1-metilciclopropano (1-MCP)¹¹⁶ es otra opción mediante unión irreversible. Finalmente, el óxido de titanio (TiO₂)¹¹⁷ produce la oxidación fotocatalítica mediante la iluminación con radiación UV que genera especies de oxígeno reactivo (ROS), las cuales oxidan el etileno en CO₂ y agua.

1.2.2 Envasado inteligente

A diferencia del envasado activo, el envasado inteligente puede revelar las condiciones del producto sin entrar en contacto directo, ya que no se liberan los constituyentes en los alimentos. Por ello, los sistemas de envasado inteligente son tecnologías capaces de monitorizar la interacción entre los alimentos, el envase y el medio ambiente a través de indicadores internos y externos.^{118,119} Para representar cuantitativa o cualitativamente el estado del producto alimenticio, el deterioro suele estar relacionado con cambios físicos o químicos en las características del alimento específico. La detección temprana puede prevenir el consumo de alimentos no seguros y, en consecuencia, utilizarse para que las decisiones de retirada sean más precisas y disminuir las posibilidades de enfermedades transmitidas. Los sistemas de envasado inteligente pueden clasificarse en tres categorías: indicadores, sensores y “*data carriers*”.

1.2.2.1 Indicadores

Se pueden definir como dispositivos que indican y determinan la presencia o ausencia de un analito, así como la concentración de la sustancia en particular mediante un cambio

¹¹⁵ Álvarez-Hernández, M. H.; Artés-Hernández, F.; Ávalos-Belmontes, F.; Castillo-Campohermoso, M. A.; Contreras-Esquivel, J. C.; Ventura-Sobrevilla, J. M.; Martínez-Hernández, G. B. Current Scenario of Adsorbent Materials Used in Ethylene Scavenging Systems to Extend Fruit and Vegetable Postharvest Life. *Food and Bioprocess Technology* **2018**, *11* (3), 511-525.

¹¹⁶ Ortiz, C.; Mauri, A.; Vicente, A. Use of soy protein based 1-methylcyclopropene-releasing pads to extend the shelf life of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2013**, *20*, 281-287.

¹¹⁷ Kaewklin, P.; Siripatrawan, U.; Suwanagul, A.; Lee, Y. S. Active packaging from chitosan-titanium dioxide nanocomposite film for prolonging storage life of tomato fruit. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *112*, 523-529.

¹¹⁸ Fuertes, G.; Soto, I.; Carrasco, R.; Vargas, M.; Sabattin, J.; Lagos, C. Intelligent Packaging Systems: Sensors and Nanosensors to Monitor Food Quality and Safety. *Journal of Sensors* **2016**, *2016*, 4046061.

¹¹⁹ Biji, K. B.; Ravishankar, C. N.; Mohan, C. O.; Srinivasa Gopal, T. K. Smart packaging systems for food applications: a review. *Journal of Food Science and Technology* **2015**, *52* (10), 6125-6135.

colorimétrico (en este contexto, detectable visualmente).¹²⁰ Hay diferentes tipos de indicadores que incluyen: indicadores de gases (como detectores de O₂ o CO₂), indicadores de frescura o deterioro microbiano (pH, humedad o metabolitos específicos) o indicadores de temperatura.

- **Indicadores de gases**

Los indicadores de gas indican el estado de calidad en función de la atmósfera interior. Las modificaciones se basan en reacciones enzimáticas o químicas, así como la generación de gas por el metabolismo de microorganismos o la transmisión de gas a través del envase. La mayoría se basan en la detección de O₂ y CO₂, pero también se referencian otros gases como vapor de agua, etileno o H₂S. La mayoría de los indicadores de O₂ utilizados son indicadores colorimétricos, basados en una reacción redox, que incluyen: un agente colorante redox, un compuesto reductor como azúcares (glucosa) y un compuesto alcalino como KOH o NaOH. Así por ejemplo, se tiene el indicador reversible “Ageless Eye”¹²¹ que cambia de rosa a morado cuando el nivel de O₂ es superior a 0.5 %. Por otro lado, se encuentran indicadores de O₂ activados por UV o luz visible.¹²² Estos sistemas comprenden un colorante redox, un semiconductor (TiO₂) y un donante de electrones. En la bibliografía, se pueden encontrar diferentes tipos de agentes colorantes redox como el azul de metileno (MB),^{123,124} poliviologenos¹²⁵ o la antraquinona conocida como azul brillante de remazol R (RBBR).¹²⁶ En el caso del azul de metileno, se han desarrollado prototipos mediante el empleo de tecnologías avanzadas como la impresión inkjet.^{127,128} El principal problema asociado es el

¹²⁰ Ghaani, M.; Cozzolino, C. A.; Castelli, G.; Farris, S. An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. *Trends in Food Science & Technology* **2016**, *51*, 1-11.

¹²¹ Mitsubishi Gas Chemical Company Inc. Ageless Eye Oxygen Indicator; <http://www.mgc.co.jp/eng/products/abc/ageless/eye.html> (accessed Mar 31, 2018).

¹²² Mills, A. Oxygen indicators and intelligent inks for packaging food. *Chemical Society Reviews* **2005**, *34* (12), 1003-1011.

¹²³ Wen, J.; Huang, S.; Sun, Y.; Chen, Z.; Wang, Y.; Li, H.; Liu, X. Titanium Dioxide Nanotube-Based Oxygen Indicator for Modified Atmosphere Packaging: Efficiency and Accuracy. *Materials* **2018**, *11* (12), 2410.

¹²⁴ Wen, J.; Huang, S.; Jia, L.; Ding, F.; Li, H.; Chen, L.; Liu, X. Visible Colorimetric Oxygen Indicator Based on Ag-Loaded TiO₂ Nanotubes for Quick Response and Real-Time Monitoring of the Integrity of Modified Atmosphere Packaging. *Advanced Materials Technologies* **2019**, *4* (9), 1900121.

¹²⁵ Roberts, L.; Lines, R.; Reddy, S.; Hay, J. Investigation of polyviologens as oxygen indicators in food packaging. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *152* (1), 63-67.

¹²⁶ Khankaew, S.; Mills, A.; Yusufu, D.; Wells, N.; Hodgen, S.; Boonsupthip, W.; Suppakul, P. Multifunctional anthraquinone-based sensors: UV, O₂ and time. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *238*, 76-82.

¹²⁷ Fernández-Ramos, M. D.; Pageo-Cabrera, M.; Capitán-Vallvey, L. F.; Pérez de Vargas-Sansalvador, I. M. Inkjet-printed O₂ gas sensors in intelligent packaging. *Analyst* **2021**, *146* (10), 3177-3184.

¹²⁸ Lawrie, K.; Mills, A.; Hazafy, D. Simple inkjet-printed, UV-activated oxygen indicator. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *176*, 1154-1159.

lixiviado del colorante cuando entran en contacto con el agua de los alimentos siendo peligroso para la salud.¹²⁹ En este contexto, los polímeros de alginato se han empleado para prevenir la liberación del indicador colorimétrico.¹³⁰ Otros casos representan el empleo de otros colorantes leuco (colorante que puede variar entre dos formas químicas, una de las cuales es incolora) para indicadores irreversibles.¹³¹ En la Figura 1.11 se muestran algunos ejemplos de indicadores de O₂.

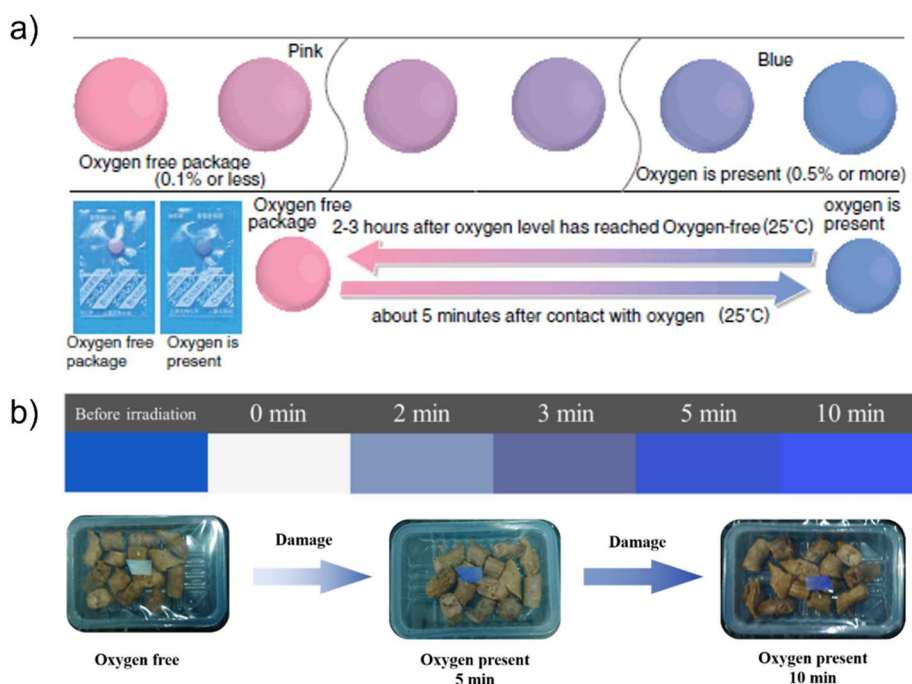


Figura 1.11. Ejemplos de indicadores de O₂. (a) Ageless Eye y (b) indicador redox basados en azul de metileno (tomados de ref. 121 y 123, respectivamente).

Los indicadores de CO₂ están basados en cambios de pH asociados a cambios de color visibles al ojo humano. Los indicadores colorimétricos son en general poco sensibles, pero emplean sustancias más baratas y no requieren el uso de instrumentación adicional. Entre los indicadores de pH utilizados para la detección de CO₂ se pueden citar morado de m-

¹²⁹ Gillman, P. K. CNS toxicity involving methylene blue: the exemplar for understanding and predicting drug interactions that precipitate serotonin toxicity. *Journal of Psychopharmacology* **2010**, *25* (3), 429-436.

¹³⁰ Vu, C. H. T.; Won, K. Novel water-resistant UV-activated oxygen indicator for intelligent food packaging. *Food Chemistry* **2013**, *140* (1), 52-56.

¹³¹ Wilhelm, S.; Wolfbeis, O. S. Irreversible sensing of oxygen ingress. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *153* (1), 199-204.

cresol,¹³² HPTS,¹³³ verde de bromocresol¹³⁴ o combinaciones de diferentes indicadores de pH.^{135,136,137,138} El principal problema en la industria del envasado es que los colorantes son fuertemente hidrofílicos y pueden migrar a los alimentos. Por ello, la selección del material es importante para el desarrollo del mejor indicador como pares iónicos hidrofóbicos.¹³⁹ En la bibliografía, se encuentran otras alternativas como composiciones de fuentes naturales.^{140,141} Para el desarrollo de indicadores de CO₂, se ha utilizado también la impresión inkjet.¹⁴² En la Figura 1.12 se muestran algunos ejemplos de indicadores de CO₂.

¹³² Mills, A.; Skinner, G. A. Water-based colourimetric optical indicators for the detection of carbon dioxide. *Analyst* **2010**, *135* (8), 1912-1917.

¹³³ Mills, A.; Yusufu, D. Highly CO₂ sensitive extruded fluorescent plastic indicator film based on HPTS. *Analyst* **2016**, *141* (3), 999-1008.

¹³⁴ Pacquit, A.; Frisby, J.; Diamond, D.; Lau, K. T.; Farrell, A.; Quilty, B.; Diamond, D. Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. *Food Chemistry* **2007**, *102* (2), 466-470.

¹³⁵ Nopwinyuwong, A.; Trevanich, S.; Suppakul, P. Development of a novel colorimetric indicator label for monitoring freshness of intermediate-moisture dessert spoilage. *Talanta* **2010**, *81* (3), 1126-1132.

¹³⁶ Rukchon, C.; Nopwinyuwong, A.; Trevanich, S.; Jinkarn, T.; Suppakul, P. Development of food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast. *Talanta* **2014**, *547-554*, 547-554.

¹³⁷ Baek, S.; Maruthupandy, M.; Lee, K.; Kim, D.; Seo, J. Preparation and characterization of a poly(ether-block-amide) film-based CO₂ indicator for monitoring kimchi quality. *Reactive and Functional Polymers* **2018**, *131*, 75-83.

¹³⁸ Chen, H.-z.; Zhang, M.; Bhandari, B.; Guo, Z. Applicability of a colorimetric indicator label for monitoring freshness of fresh-cut green bell pepper. *Postharvest Biology and Technology* **2018**, *140*, 85-92.

¹³⁹ Lyu, J. S.; Choi, I.; Hwang, K.-S.; Lee, J.-Y.; Seo, J.; Kim, S. Y.; Han, J. Development of a BTB⁻/TBA⁺ ion-paired dye-based CO₂ indicator and its application in a multilayered intelligent packaging system. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2019**, *282*, 359-365.

¹⁴⁰ Lee, K.; Meng, X.; Kang, T.-Y.; Ko, S. A dye-incorporated chitosan-based CO₂ indicator for monitoring of food quality focusing on makgeolli quality during storage. *Food Science and Biotechnology* **2015**, *24*, 905-912.

¹⁴¹ Saliu, F.; Della Pergola, R. Carbon dioxide colorimetric indicators for food packaging application: Applicability of anthocyanin and poly-lysine mixtures. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *258*, 1117-1124.

¹⁴² Zhang, Y.; Lim, L.-T. Inkjet-printed CO₂ colorimetric indicators. *Talanta* **2016**, *161*, 105-113.

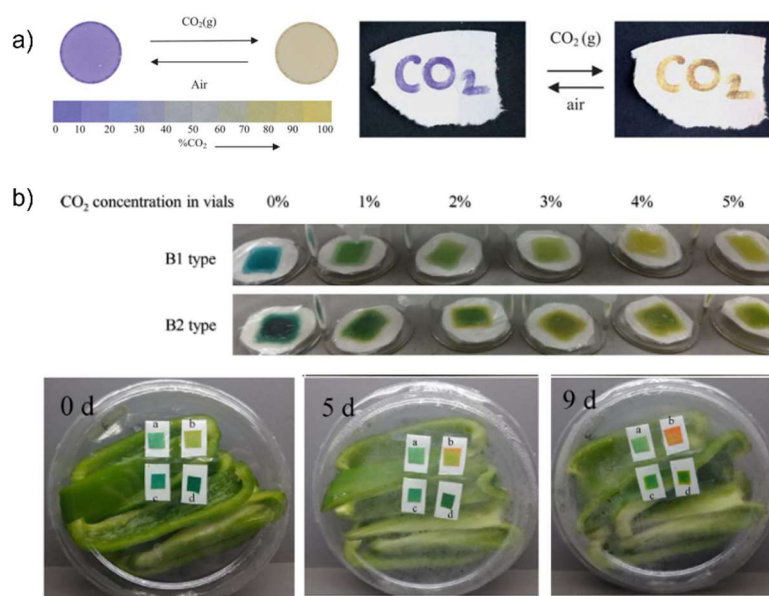


Figura 1.12. Ejemplos de indicadores de CO₂. (a) Indicador colorimétrico de morado de m-cresol y (b) indicador colorimétrico mixto de pH (tomados de ref. 132 y 138, respectivamente).

Para el resto de gases, la literatura es escasa. Hay algunas referencias para el sulfuro de hidrógeno (H₂S) basadas en cambios de color asociados a reacciones de oxidación-reducción, como Ag NPs,¹⁴³ mioglobina¹⁴⁴ o azul de metileno.¹⁴⁵ Del mismo modo, hay indicadores colorimétricos para el etileno (C₂H₄)^{146,147} y gases relacionados con los sabores como los aldehídos,¹⁴⁸ asociados al grado de madurez de los alimentos. Finalmente, los indicadores de gases conocidos y disponibles comercialmente se resumen en la Tabla 1.4.^{149,150}

¹⁴³ Zhai, X.; Li, Z.; Shi, J.; Huang, X.; Sun, Z.; Zhang, D.; Zou, X.; Sun, Y.; Zhang, J.; Holmes, M.; et al. A colorimetric hydrogen sulfide sensor based on gellan gum-silver nanoparticles bionanocomposite for monitoring of meat spoilage in intelligent packaging. *Food Chemistry* **2019**, *290*, 135-143.

¹⁴⁴ Smolander, M.; Hurme, E.; Latva-Kala, K.; Luoma, T.; Alakomi, H.-L.; Ahvenainen, R. Myoglobin-based indicators for the evaluation of freshness of unmarinated broiler cuts. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2002**, *3*, 279-288.

¹⁴⁵ Winter, G.; Curtin, C. In situ high throughput method for H₂S detection during micro-scale wine fermentation. *Journal of Microbiological Methods* **2012**, *91* (1), 165-170.

¹⁴⁶ Li, Z.; Suslick, K. S. Colorimetric Sensor Array for Monitoring CO and Ethylene. *Analytical Chemistry* **2019**, *91* (1), 797-802.






¹⁴⁷ Lang, C.; Hübert, T. A Colour Ripeness Indicator for Apples. *Food and Bioprocess Technology* **2012**, *5* (8), 3244-3249.

¹⁴⁸ Kim, Y. H.; Yang, Y. J.; Kim, J. S.; Choi, D. S.; Park, S. H.; Jin, S. Y.; Park, J. S. Non-destructive monitoring of apple ripeness using an aldehyde sensitive colorimetric sensor. *Food Chemistry* **2018**, *267*, 149-156.

¹⁴⁹ Kaushani, K. G.; Rathnasinghe, N.; Katuwavila, N.; Jayasinghe, R.; Nilmini, R.; Priyadarshana, G. Trends in Smart Packaging Technologies for Sustainable Monitoring of Food Quality and Safety. *2022*, *07*, 07-30.

¹⁵⁰ Klein, R. A.; Riley, M. R.; DeCianne, D.M. and Srinavakul, N. Non-invasive colorimetric ripeness indicator. 2006, United States Patent Application Publication US 2006/0127543 A1.

Tabla 1.4. Indicadores colorimétricos de gases disponibles comercialmente.

| Nombre comercial | Sustancia activa | Indicador colorimétrico |
|-----------------------------|--|---|
| EASY CAP™(USA) | CO ₂ | Morado de m-cresol () |
| YSI (USA) | CO ₂ | HPTS () |
| SAMI-CO ₂ (USA) | CO ₂ | Azul de bromotimol () |
| Ripe Sense® (Nueva Zelanda) | Compuestos aromáticos | Rojo de fenol () |
| RediRipe®(USA) | Etileno (C ₂ H ₄) | PdSO ₄ y ((NH ₄) ₂ MoO ₄) () |

▪ Indicadores de frescura

El control de los niveles de humedad es un factor clave para la calidad, ya que un alto nivel favorece un entorno de crecimiento de microorganismos que acelera el deterioro.¹⁵¹ En este contexto, hay indicadores colorimétricos de humedad basados en óxido de grafeno,¹⁵² en indicadores de pH como el azul de bromotimol¹⁵³ y derivados del azul de metileno,^{154,155} y el desarrollo de membranas mediante electrohilado o “electrospinning” como tecnología avanzada.¹⁵⁶ En la Figura 1.13 se muestran algunos ejemplos de indicadores de humedad.

¹⁵¹ Ayala-Zavala, J. F.; Del-Toro-Sánchez, L.; Alvarez-Parrilla, E.; González-Aguilar, G. A. High Relative Humidity In-Package of Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Advantage or Disadvantage Considering Microbiological Problems and Antimicrobial Delivering Systems? *Journal of Food Science* **2008**, *73* (4), R41-R47.

¹⁵² Chi, H.; Liu, Y. J.; Wang, F.; He, C. Highly Sensitive and Fast Response Colorimetric Humidity Sensors Based on Graphene Oxides Film. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7* (36), 19882-19886.

¹⁵³ Wang, Z.; Zhang, Y.; Wang, W.; an, q.; Tong, W. High performance of colorimetric humidity sensors based on minerals. *Chemical Physics Letters* **2019**, *727*, 90-94.

¹⁵⁴ Mills, A.; Grosshans, P.; Hazafy, D. A novel reversible relative-humidity indicator ink based on methylene blue and urea. *Analyst* **2010**, *135* (1), 33-35.

¹⁵⁵ Mills, A.; Hawthorne, D.; Burns, L.; Hazafy, D. Novel temperature-activated humidity-sensitive optical sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2016**, *240*, 1009-1015.

¹⁵⁶ You, M.-H.; Yan, X.; Zhang, J.; Wang, X.-X.; He, X.-X.; Yu, M.; Ning, X.; Long, Y.-Z. Colorimetric Humidity Sensors Based on Electrospun Polyamide/CoCl₂ Nanofibrous Membranes. *Nanoscale Research Letters* **2017**, *12* (1), 360.

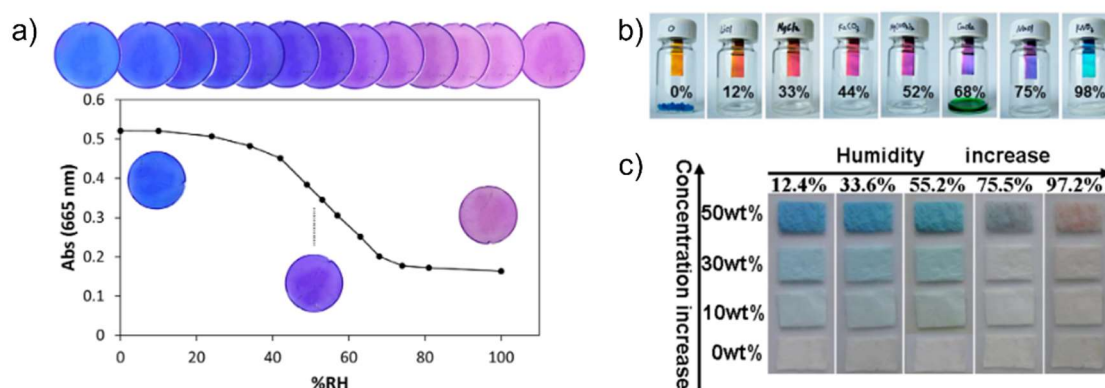


Figura 1.13. Ejemplos de indicadores de humedad. (a) Indicador colorimétrico basado en azul de metileno, (b) indicador colorimétrico basado en óxido de grafeno y (c) indicador basado en CoCl_2 y poliamida (tomados de ref. 155, 152 y 156, respectivamente).

Del mismo modo, los indicadores de frescura supervisan la calidad de los productos alimenticios proporcionando información sobre ciertos cambios químicos que ocurren durante el deterioro de los alimentos relacionados con el crecimiento microbiológico y la presencia de metabolitos tales como glucosa, lactato,¹⁵⁷ ácidos orgánicos o aminas biogénicas o volátiles que se pueden monitorizar por cambio de pH.¹⁵⁸ En el caso de ácidos orgánicos, se pueden encontrar indicadores colorimétricos sensibles al pH^{159,160,161} o basados en reacciones redox.¹⁶² En la Figura 1.14 se muestran algunos ejemplos.

¹⁵⁷ Promphet, N.; Rattanawaleedirojn, P.; Siralertmukul, K.; Soatthiyanon, N.; Potiyaraj, P.; Thanawattano, C.; Hinestroza, J. P.; Rodthongkum, N. Non-invasive textile based colorimetric sensor for the simultaneous detection of sweat pH and lactate. *Talanta* **2019**, *192*, 424-430.

¹⁵⁸ Yoshida, C. M. P.; Maciel, V. B. V.; Mendonça, M. E. D.; Franco, T. T. Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations. *LWT - Food Science and Technology* **2014**, *55* (1), 83-89.

¹⁵⁹ Kuswandi, B.; Maryska, C.; Jayus; Abdullah, A.; Heng, L. Y. Real time on-package freshness indicator for guavas packaging. *Journal of Food Measurement and Characterization* **2013**, *7* (1), 29-39.

¹⁶⁰ Weston, M.; Phan, M. A. T.; Arcot, J.; Chandrawati, R. Anthocyanin-based sensors derived from food waste as an active use-by date indicator for milk. *Food Chemistry* **2020**, *326*, 127017.

¹⁶¹ Weston, M.; Kuchel, R. P.; Chandrawati, R. A Polydiacetylene-Based Colorimetric Sensor as an Active Use-By Date for Plant-Based Milk Alternatives. *Macromolecular Rapid Communications* **2020**, *41* (18), 2000172.

¹⁶² Rattu, G.; Murali Krishna, P. Enzyme-free colorimetric nanosensor for the rapid detection of lactic acid in food quality analysis. *Journal of Agriculture and Food Research* **2022**, *7*, 100268.

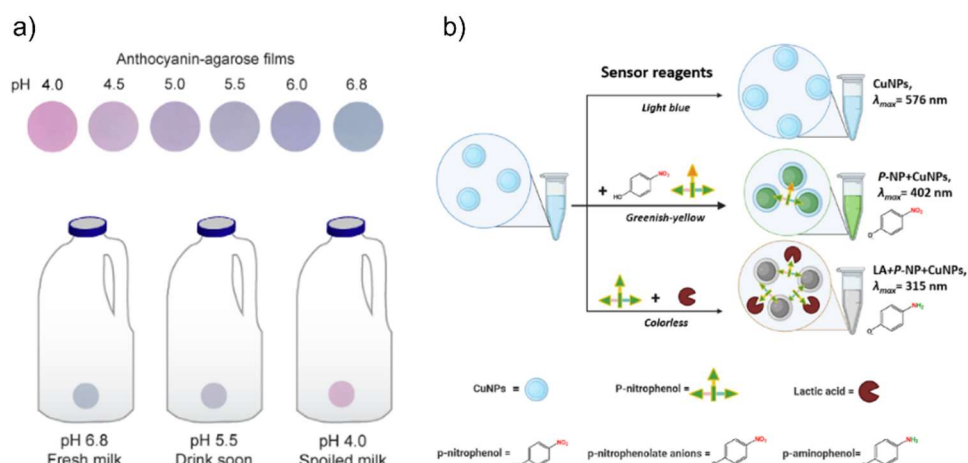


Figura 1.14. Ejemplos de indicadores de ácido láctico. (a) Indicador colorimétrico basado en antocianina y (b) indicador colorimétrico basado en reacciones redox en presencia de Cu-NPs (tomados de ref. 160 y 162).

Amoníaco (NH_3), dimetilamina (DMA), dietilamina (DEA), trimetilamina (TMA), histamina (His), putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermina (Sper), espermidina (Sped), la tiramina (Tir) y la triptamina (Trip) son las BAs típicas producidas durante el deterioro de los alimentos. El desarrollo de sistemas colorimétricos basados en indicadores, capaces de mostrar un cambio de color debido a una reacción con compuestos volátiles producidos en muestras envasadas, se ha convertido en la forma más sencilla, práctica y sin instrumentos, ya que se puede detectar directamente a simple vista. Los indicadores colorimétricos de pH resultan ser prometedores para ser utilizados para la detección de dichos metabolitos microbianos como indicadores de frescura. En este sentido, se han realizado un número considerable de investigaciones para encontrar una matriz de soporte ideal para dichos

colorantes, incluyendo metales,^{163,164,165,166,167} polímeros (como PCL,¹⁶⁸ PDMS,¹⁶⁹ PAN,¹⁷⁰ PET,¹³⁴ PVA,¹⁷¹ PLA,¹⁷² PA,¹⁷³ PANI¹⁷⁴ y otros^{175,176}), sílica,^{177,178,179} películas de

¹⁶³ Luo, Q.; Zhang, Y.; Zhou, Y.; Liu, S.; Gao, W.; Shi, X. Portable Functional Hydrogels based on Silver Metallization for Visual Monitoring of Fish Freshness. *Food Control* **2020**, *123*, 107824.

¹⁶⁴ Prabhash, P. G.; Haritha, V. S.; Nair, S. S.; Pilankatta, R. Localized surface plasmon resonance based highly sensitive room temperature pH sensor for detection and quantification of ammonia. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *240*, 580-585.

¹⁶⁵ Li, H.; Gan, J.; Yang, Q.; Fu, L.; Wang, Y. Colorimetric detection of food freshness based on amine-responsive dopamine polymerization on gold nanoparticles. *Talanta* **2021**, *234*, 122706.

¹⁶⁶ Fukushima, Y.; Aikawa, S. Colorimetric detection of spermine and spermidine by zincon in aqueous solution. *Tetrahedron Letters* **2019**, *60*, 151302.

¹⁶⁷ Mo, R.; Uan, Q.; Li, T.; Yuan, Q.; Su, T.; Yan, X.; Qian, Z.-J.; Hong, P.; Zhou, C.; Li, C. An Intelligent Label for Freshness of Fish Based on a Porous Anodic Aluminum Membrane and Bromocresol Green. *ChemistrySelect* **2017**, *2*, 8779-8784.

¹⁶⁸ Ulrich, S.; Moura, S. O.; Diaz, Y.; Clerc, M.; Guex, A. G.; de Alaniz, J. R.; Martins, A.; Neves, N. M.; Rottmar, M.; Rossi, R. M.; et al. Electrospun colourimetric sensors for detecting volatile amines. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2020**, *322*, 128570.

¹⁶⁹ Liu, B.; Gurr, P. A.; Qiao, G. G. Irreversible Spoilage Sensors for Protein-Based Food. *ACS Sensors* **2020**, *5* (9), 2903-2908.

¹⁷⁰ Hoang, A. T.; Cho, Y. B.; Park, J.-S.; Yang, Y.; Kim, Y. S. Sensitive naked-eye detection of gaseous ammonia based on dye-impregnated nanoporous polyacrylonitrile mats. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2016**, *230*, 250-259.

¹⁷¹ Zhai, X.; Shi, J.; Zou, X.; Wang, S.; Jiang, C.; Zhang, J.; Huang, X.; Zhang, W.; Holmes, M. Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring. *Food Hydrocolloids* **2017**, *69*, 308-317.

¹⁷² Siripongpreda, T.; Siralermukul, K.; Rodthongkum, N. Colorimetric sensor and LDI-MS detection of biogenic amines in food spoilage based on porous PLA and graphene oxide. *Food Chemistry* **2020**, *329*, 127165.

¹⁷³ González-Ceballos, L.; Melero, B.; Trigo-López, M.; Vallejos, S.; Muñoz, A.; García, F. C.; Fernández-Muñoz, M. A.; Sancho, M. T.; García, J. M. Functional aromatic polyamides for the preparation of coated fibres as smart labels for the visual detection of biogenic amine vapours and fish spoilage. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2020**, *304*, 127249.

¹⁷⁴ Kuswandi, B.; Jayus; Restyana, A.; Abdullah, A.; Heng, L. Y.; Ahmad, M. A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. *Food Control* **2012**, *25* (1), 184-189.

¹⁷⁵ Domínguez-Aragón, A.; Olmedo-Martínez, J. L.; Zaragoza-Contreras, E. Colorimetric sensor based on a poly(ortho-phenylenediamine-co-aniline) copolymer for the monitoring of tilapia (*Oreochromis niloticus*) freshness. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *259*, 270-276.

¹⁷⁶ Pablos, J. L.; Vallejos, S.; Muñoz, M. A.; Rojo, M.; Serna, F.; García, F.; García, J. M. Solid Polymer Substrates and Coated Fibers Containing 2,4,6-Trinitrobenzene Motifs as Smart Labels for the Visual Detection of Biogenic Amine Vapors. *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21*, 8733-8736.

¹⁷⁷ Wells, N.; Yusufu, D.; Mills, A. Colourimetric plastic film indicator for the detection of the volatile basic nitrogen compounds associated with fish spoilage. *Talanta* **2019**, *194*, 830-836.

¹⁷⁸ Morsy, M. K.; Zór, K.; Kostesha, N.; Alstrøm, T. S.; Heiskanen, A.; El-Tanahi, H.; Sharoba, A.; Papkovsky, D.; Larsen, J.; Khalaf, H.; et al. Development and validation of a colorimetric sensor array for fish spoilage monitoring. *Food Control* **2016**, *60*, 346-352.

¹⁷⁹ Huang, X.-w.; Zou, X.-b.; Shi, J.-y.; Guo, Y.; Zhao, J.-w.; Zhang, J.; Hao, L. Determination of pork spoilage by colorimetric gas sensor array based on natural pigments. *Food Chemistry* **2014**, *145*, 549-554.

plástico^{180,181,182} o películas de componentes naturales como celulosa^{183,184,185,186} o quitosan.^{187,188} Las películas de plástico y acetato de celulosa suelen contener componentes plastificantes para mejorar sus propiedades mecánicas. En la Tabla 1.5 se resumen los prototipos de sistemas colorimétricos desarrollados en la bibliografía. Por otro lado, se pueden encontrar referencias bibliográficas basadas en reacciones colorimétricas^{189,190,191} como se ilustra en la Figura 1.15.

¹⁸⁰ Lee, K.; Baek, S.; Kim, D.; Seo, J. A freshness indicator for monitoring chicken-breast spoilage using a Tyvek® sheet and RGB color analysis. *Food Packaging and Shelf Life* **2019**, *19*, 40-46.

¹⁸¹ Kuswandi, B.; Nurfawaidi, A. On-package dual sensors label based on pH indicators for real-time monitoring of beef freshness. *Food Control* **2017**, *82*, 91-100.

¹⁸² Chen, H.-z.; Zhang, M.; Bhandari, B.; Yang, C.-h. Development of a novel colorimetric food package label for monitoring lean pork freshness. *LWT* **2019**, *99*, 43-49.

¹⁸³ Kuswandi, B.; Jayus; Oktaviana, R.; Abdullah, A.; Heng, L. Y. A Novel On-Package Sticker Sensor Based on Methyl Red for Real-Time Monitoring of Broiler Chicken Cut Freshness. *Packaging Technology and Science* **2014**, *27* (1), 69-81.

¹⁸⁴ Schaude, C.; Meindl, C.; Fröhlich, E.; Attard, J.; Mohr, G. J. Developing a sensor layer for the optical detection of amines during food spoilage. *Talanta* **2017**, *170*, 481-487.

¹⁸⁵ Kuswandi, B.; Jayus, J.; yook heng, L. Real-Time Monitoring of Shrimp Spoilage Using On-Package Sticker Sensor Based on Natural Dye of Curcumin. *Food Analytical Methods* **2012**, *5*, 881.

¹⁸⁶ Listyarini, A.; Sholihah, W.; Imawan, C. A paper-based Colorimetric Indicator Label using Natural Dye for Monitoring Shrimp Spoilage. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* **2018**, *367*, 012045.

¹⁸⁷ Nguyen, L. H.; Naficy, S.; McConchie, R.; Dehghani, F.; Chandrawati, R. Polydiacetylene-based sensors to detect food spoilage at low temperatures. *Journal of Materials Chemistry C* **2019**, *7* (7), 1919-1926.

¹⁸⁸ Pacquit, A.; Lau, K. T.; McLaughlin, H.; Frisby, J.; Quilty, B.; Diamond, D. Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage. *Talanta* **2006**, *69* (2), 515-520.

¹⁸⁹ Diaz, Y. J.; Page, Z. A.; Knight, A. S.; Treat, N. J.; Hemmer, J. R.; Hawker, C. J.; Read de Alaniz, J. A Versatile and Highly Selective Colorimetric Sensor for the Detection of Amines. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (15), 3562-3566.

¹⁹⁰ (a) Patange, S. B.; Mukundan, M. K.; Ashok Kumar, K. A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. *Food Control* **2005**, *16* (5), 465-472, (b) Lv, R.; Huang, X.; Dai, C.; Ye, W.; Tian, X. A rapid colorimetric sensing unit for histamine content of mackerel using azo reagent. *Journal of Food Process Engineering* **2019**, *42* (5), e13099.

¹⁹¹ Leng, P.-Q.; Zhao, F.-L.; Yin, B.-C.; Ye, B.-C. A novel, colorimetric method for biogenic amine detection based on arylalkylamine N-acetyltransferase. *Chemical Communications* **2015**, *51* (41), 8712-8714.

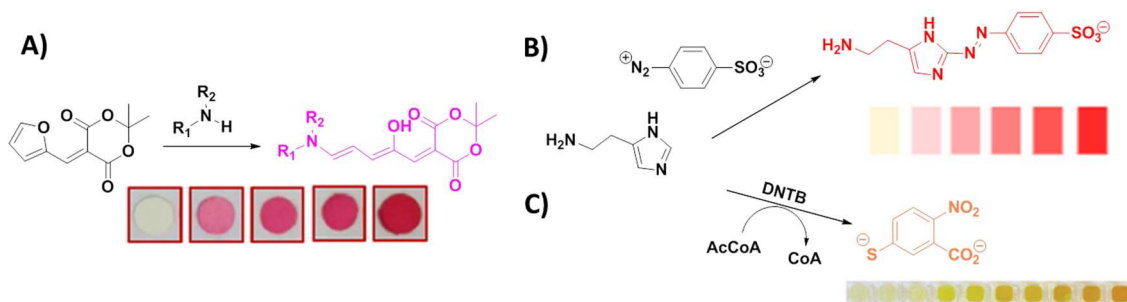


Figura 1.15. Reacciones químicas basadas en detección colorimétrica de aminas biogénicas. (a) apertura de furanos activados, (b) formación de un compuesto “azo” cromogénico y (c) transacetilación y ruptura de puente disulfuro (modificado de ref. 189, 190 y 191).

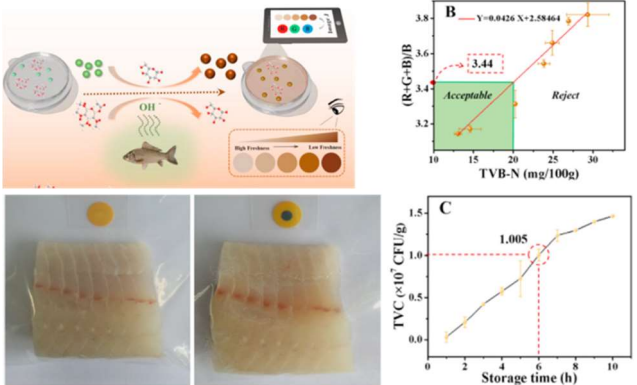
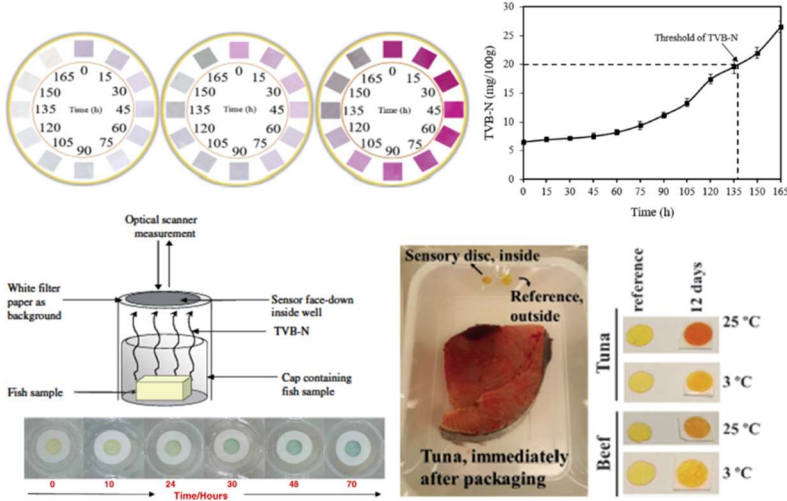
La eficacia de los sistemas de detección propuestos para evaluar la frescura de los alimentos se compara con la variación del pH y dos métodos de referencia estándar para el análisis de la frescura de los alimentos, como TVC¹⁹² y TVBN.²⁰ De esta manera, se estima la capacidad del sistema colorimétrico como indicador de frescura si existe una buena correlación con los niveles de los métodos de referencia. Generalmente, los límites de TVBN y TVC se alcanzan entre 8-12 horas y 7-9 días a temperaturas de 25°C y 4°C respectivamente.

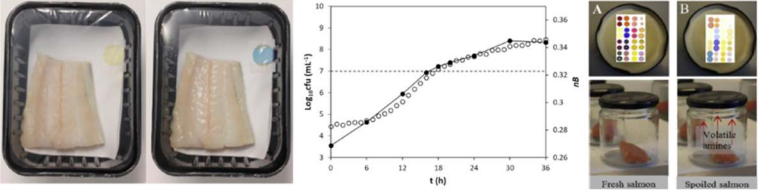
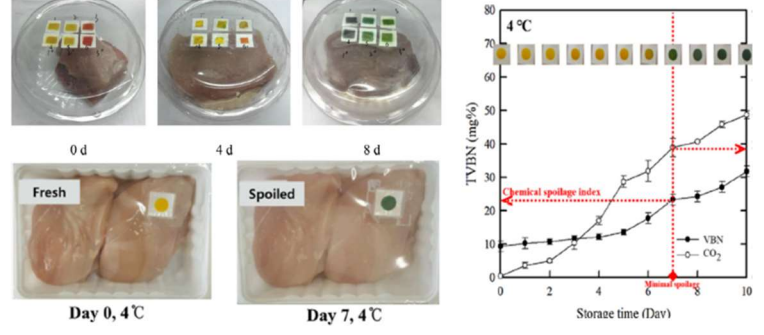
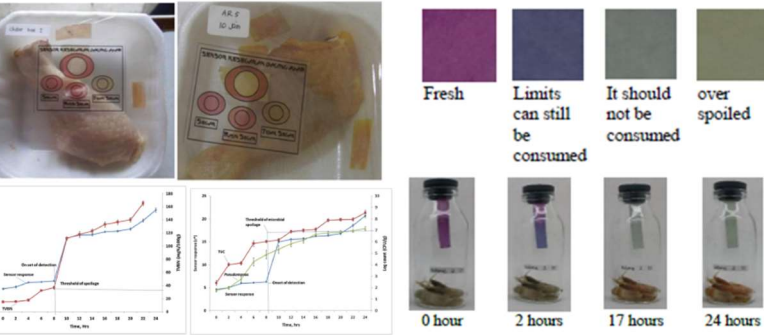
En el aspecto comercial, se pueden encontrar dos ejemplos de indicadores colorimétricos capaces de detectar aminas volátiles. Por un lado, se encuentra la etiqueta Sensor Q™(USA), basada en antocianinas, que indica el nivel crítico de crecimiento bacteriano (naranja-marrón). Por otro lado, la etiqueta FreshTag®(USA) cambia de amarillo a azul oscuro a medida que el pH aumenta. Sin embargo, este indicador fue introducido en 1999 y desaparece en 2004 debido a falta de un mayor desarrollo y comercialización.¹⁹³

¹⁹² Diez-Gonzalez, F. TOTAL VIABLE COUNTS | Specific Techniques. In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, Batt, C. A., Tortorello, M. L. Eds.; Academic Press, **2014**; pp 630-635.

¹⁹³ Kerry, J. P. Chapter 23 - New Packaging Technologies, Materials and Formats for Fast-Moving Consumer Products. In *Innovations in Food Packaging (Second Edition)*, Han, J. H. Ed.; Academic Press, **2014**; pp 549-584.

Tabla 1.5. Clasificación de indicadores colorimétricos de aminas biogénicas según el tipo de material empleado para el desarrollo del sistema de detección.

| | Indicador/Sustancia activa | Analito | Rango analítico | Ejemplos |
|-------------------------|---|-----------------------------|---------------------------|--|
| <p>Metales</p> | Ag ¹⁶³ | TMA | - |  |
| | Al ₂ O ₃ – BCG ¹⁶⁷ | - | - | |
| | Nanopartículas de Cu ¹⁶⁴ | NH ₃ | 20-300 ppm | |
| | Nanopartículas de Au ¹⁶⁵ | His | 1-100 ppm | |
| | Complejo de Zn ¹⁶⁶ | Sper | 1-10 µM | |
| <p>Polímeros</p> | o-PDA y anilina ¹⁷⁶ | NH ₃ , DMA y DEA | - |  |
| | PCL- Ácido de Meldrum ¹⁶⁸ | DMA y DEA | 0.2-1 ppm | |
| | PDMS – CPR ¹⁶⁹ | NH ₃ | - | |
| | PAN ¹⁷⁰ o PET – BCG | NH ₃ | 1-25 ppm | |
| | PLA – Óxido de grafeno ¹⁷² | Cad y Put | 0.1-8 mg·mL ⁻¹ | |
| | PA ¹⁷³ | Put | 0-15 ppm | |
| | PANI ¹⁷⁴ | NH ₃ | 0-0.16M | |
| | PVA-Antiocianina ¹⁷¹ | - | - | |
| | Copolímero – TNB ¹⁷⁵ | TMA | 0.1-100 µM | |

| | | | |
|--|---|--|--|
| <p>Sílica</p> <p>Etiqueta de colorantes¹⁷⁸</p> <p>Colorantes naturales¹⁷⁹</p> | <p>BPB¹⁷⁷</p> <p>DMA, TMA, Cad y Put</p> <p>Cad, Put, Sper y Sped</p> | <p>TMA</p> <p>-</p> <p>-</p> <p>-</p> |  |
| <p>Papel, plástico, otro material</p> | <p>BCG¹⁸⁰</p> <p>MR y BCP¹⁸¹</p> <p>MR, BCP y BTB¹⁸²</p> | <p>TMA</p> <p>100-400 ppm</p> <p>-</p> <p>-</p> |  |
| <p>Celulosa, chitosan o gelatina</p> | <p>Antocianina¹⁸⁶</p> <p>Curcumina¹⁸⁵</p> <p>RBBR y GJM-492¹⁸⁴</p> <p>MR¹⁸³</p> <p>BCG¹⁸⁸</p> <p>Polidiacetileno (PDA)¹⁸⁷</p> <p>MO, NR y BCG</p> | <p>-</p> <p>-</p> <p>NH₃ y otras BAs</p> <p>1-30 ppm</p> <p>-</p> <p>-</p> <p>100-1000 ppm</p> <p>-</p> |  |

▪ Indicadores de temperatura

De acuerdo con el reglamento EC/450/2009, estos dispositivos están destinados a brindar información sobre si se ha excedido una temperatura umbral con el tiempo o para estimar la cantidad mínima de tiempo que un producto ha estado por encima de la temperatura umbral.¹⁹⁴ Los indicadores de tiempo y temperatura (TTIs) se definen como dispositivos simples, rentables y fáciles de usar para monitorizar, registrar e indicar de forma acumulativa la influencia general de temperatura en la calidad del alimento. Se basan en una respuesta visible mediante un cambio de color y, generalmente, no se ven afectados por condiciones ambientales distintas de la temperatura. De esta manera, pueden indicar y alertar a los consumidores sobre el potencial crecimiento microbiano y la seguridad del producto.^{195,196} Se pueden distinguir tres categorías:

- Indicadores de temperatura crítica (CTI): muestran si los productos se han calentado por encima o enfriado por debajo de una temperatura permitida (como los basados en mecanismos de difusión).
- Integradores críticos de temperatura/tiempo (CTTI): indican si un producto ha sido sometido a temperaturas que provocan un cambio en la calidad del producto. Ejemplos de tales reacciones son el crecimiento microbiano o actividad enzimática.
- Integradores de temperatura de tiempo (TTI): registran el perfil de temperatura completo a lo largo de la cadena de suministro de alimentos.

En la literatura, se sugiere que los sistemas TTI que presentan $\Delta E_a < 20$ kJ/mol entre el TTI y el agente alimentario que causa el deterioro de la calidad del alimento, representan predicciones fiables de la vida útil. Por otro lado, se pueden dividir de acuerdo con los principios de funcionamiento en químicos, físicos, enzimáticos y sistemas biológicos. En la Figura 1.16 se reflejan algunos ejemplos.

¹⁹⁴ Taoukis, P. S.; Koutsoumanis, K.; Nychas, G. J. E. Use of time-temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. *International Journal of Food Microbiology* **1999**, *53* (1), 21-31.

¹⁹⁵ Ahmed, I.; Lin, H.; Zou, L.; Li, Z.; Brody, A. L.; Qazi, I. M.; Lv, L.; Pavase, T. R.; Khan, M. U.; Khan, S.; et al. An overview of smart packaging technologies for monitoring safety and quality of meat and meat products. *Packaging Technology and Science* **2018**, *31* (7), 449-471.

¹⁹⁶ Wang, S.; Liu, X.; Yang, M.; Zhang, Y.; Xiang, K.; Tang, R. Review of Time Temperature Indicators as Quality Monitors in Food Packaging. *Packaging Technology and Science* **2015**, *28* (10), 839-867.

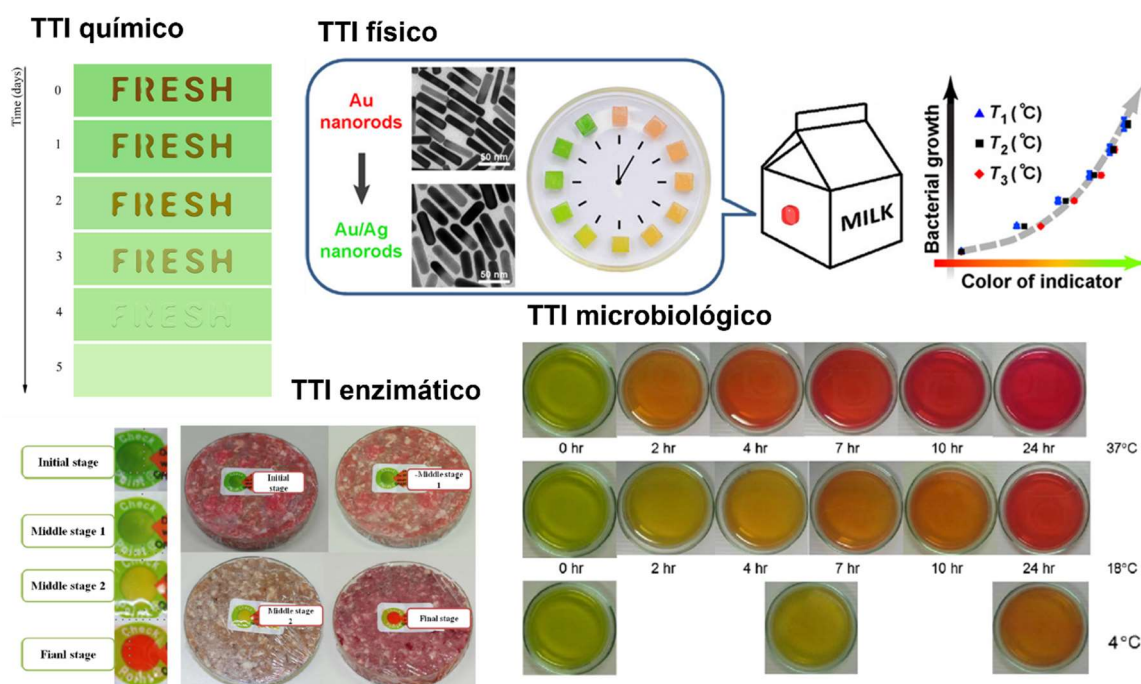


Figura 1.16. Tipos de TTI según el principio de funcionamiento: químico, físico, enzimático y microbiológico (tomado de ref. 200, 202, 203 y 207).

El TTI químico consiste principalmente en TTI basado en polímeros, TTI basado en fotocromos y TTI basado en reacciones de oxidación. En el primer caso, se trata del termocromismo de polidiacetenos (aunque son tóxicos) derivado de la liberación de tensión mecánica por estimulación térmica que conlleva cambios en la conjugación π de orbitales.^{197,198} Los compuestos fotocromáticos consisten principalmente en espiropirano y espirooxazina,¹⁹⁹ los cuales se activan mediante luz UV a una forma metaestable y la reversión colorimétrica es dependiente de la temperatura. Por otro lado, se encuentran ejemplos basados en reacciones redox como derivados de antraquinona en combinación con poliácrlato con diferente cinética de permeación al agente oxidante (O_2).²⁰⁰

El TTI físico se puede dividir en TTI basado en difusión y TTI basado en nanopartículas. Los TTI basados en difusión se basan en el principio de material coloreado que se difunde a

¹⁹⁷ Gou, M.; Guo, G.; Zhang, J.; Men, K.; Song, J.; Luo, F.; Zhao, X.; Qian, Z.; Wei, Y. Time-temperature chromatic sensor based on polydiacetylene (PDA) vesicle and amphiphilic copolymer. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, *150* (1), 406-411.

¹⁹⁸ Phollookin, C.; Wacharasindhu, S.; Ajavakom, A.; Tumcharern, G.; Ampornpun, S.; Eaidkong, T.; Sukwattanasinitt, M. Tuning Down of Color Transition Temperature of Thermochromically Reversible Bisdiynamide Polydiacetylenes. *Macromolecules* **2010**, *43* (18), 7540-7548.

¹⁹⁹ Kreyenschmidt, J.; Christiansen, H.; Albrecht, A.; Raab, V.; Petersen, B. A novel photochromic time-temperature indicator to support cold chain management. *International Journal of Food Science & Technology* **2010**, *45*, 208-215.

²⁰⁰ Galagan, Y.; Su, W. Fadable ink for time-temperature control of food freshness: Novel new time-temperature indicator. *Food Research International* **2008**, *41*, 653-657.

través de una sustancia porosa con el aumento de la temperatura ambiente, mientras que nanomateriales con la propiedad termocrómica se basan en nanopartículas de Au²⁰¹ y Ag.²⁰²

Los TTI enzimáticos se basan en la reacción de hidrólisis de la enzima con el sustrato, lo que provoca el cambio de color por reacción ácido-base con lipasa²⁰³ o ureasa,²⁰⁴ y redox con lacasa²⁰⁵ y tirosinasa.²⁰⁶ Finalmente, Los TTI microbianos hacen uso del ácido láctico generado por las bacterias del ácido láctico (LAB) para cambiar el pH bajo ciertas condiciones, lo que conduce al cambio de color para indicar el efecto de acumulación del tiempo y la temperatura. Estos indicadores pueden estar basados en colorantes sintéticos,²⁰⁷ naturales²⁰⁸ o metabolitos bacterianos cromogénicos.²⁰⁹ De manera excepcional, se encuentra un TTI irreversible basado en polímero/tinte termocrómico.²¹⁰

Se han desarrollado y patentado un gran número de tipos de TTIs. En la Tabla 1.6 se resumen TTI comercialmente disponibles que incluyen una serie de sistemas de difusión, enzimáticos y basados en polímeros.

²⁰¹ Lim, S.; Gunasekaran, S.; Imm, J.-Y. Gelatin-Templated Gold Nanoparticles as Novel Time-Temperature Indicator. *Journal of Food Science* **2012**, *77* (9), N45-N49.

²⁰² Zhang, C.; Yin, A.-X.; Jiang, R.; Rong, J.; Dong, L.; Zhao, T.; Sun, L.-D.; Wang, J.; Chen, X.; Yan, C.-H. Time-Temperature Indicator for Perishable Products Based on Kinetically Programmable Ag Overgrowth on Au Nanorods. *ACS Nano* **2013**, *7* (5), 4561-4568.

²⁰³ Chun, J.-Y.; Choi, M.-J.; Lee, S. J.; Hong, G.-P. Applications of Time-Temperature Integrator (TTI) as a Quality Indicator of Grounded Pork Patty. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* **2013**, *33*.

²⁰⁴ Kim, K.; Kim, E.; Lee, S. J. New enzymatic time-temperature integrator (TTI) that uses laccase. *Journal of Food Engineering* **2012**, *113* (1), 118-123.

²⁰⁵ Xu, F.; Ge, L.; Li, Z.; Lin, H.; Mao, X. Development and application of a tyrosinase-based time-temperature indicator (TTI) for determining the quality of turbot sashimi. *Journal of Ocean University of China* **2017**, *16*, 847-854.

²⁰⁶ Wu, D.; Wang, Y.; Chen, J.; Ye, X.; Wu, Q.; Liu, D.; Ding, T. Preliminary study on time-temperature indicator (TTI) system based on urease. *Food Control* **2013**, *34* (1), 230-234.









²⁰⁷ Wanihsuksombat, C.; Hongtrakul, V.; Suppakul, P. Development and characterization of a prototype of a lactic acid-based time-temperature indicator for monitoring food product quality. *Journal of Food Engineering* **2010**, *100* (3), 427-434.

²⁰⁸ Pereira, V. A.; de Arruda, I. N. Q.; Stefani, R. Active chitosan/PVA films with anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. *Food Hydrocolloids* **2015**, *43*, 180-188.

²⁰⁹ Mataragas, M.; Bikouli, V. C.; Korre, M.; Steriotti, A.; Skandamis, P. N. Development of a microbial Time Temperature Indicator for monitoring the shelf life of meat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2019**, *52*, 89-99.

²¹⁰ Crenshaw, B. R.; Kunzelman, J.; Sing, C. E.; Ander, C.; Weder, C. Threshold Temperature Sensors with Tunable Properties. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2007**, *208* (6), 572-580.

Tabla 1.6. Sensores de temperatura disponibles comercialmente.

| Nombre comercial | Mecanismo | Indicador colorimétrico |
|------------------------------------|---|---|
| Fresh Check®(USA) | Polimérico |  |
| eO® (Francia) | Microbiológico-pH (Bacterias de ácido láctico) |  |
| Topcryo™ (Francia) | Microbiológico-pH (Fucsina ácida) (Bacterias de ácido láctico) |  |
| VITSAB®, CheckPoint® I (Suecia) | Enzimático (Hidrólisis de lípido a ácido) |  |
| OnVu™(Suiza) | Fotoquímico-DNBP |  |
| 3M Monitor Mark® (USA) | Difusión molecular (FAE- colorante azul) |  |
| Checkpoint® III/TT Sensor™ | Difusión (sustancia sensible-pH) |  |
| Keep-it®(Noruega) | Reacción por difusión (Fe ³⁺ -Fe(CN) ₆ ⁴⁻) | Movimiento de una barra azul de izquierda a derecha |
| Tempix AB (Suecia) | Difusión |  |
| TimeStrip Plus (UK) | Difusión | Registro de cambio de color con el tiempo |

1.2.2.2 Sensores

Los sensores se consideran la tecnología más prometedora e innovadora para los futuros sistemas de envasado inteligente.¹²⁰ Un sensor se define como un dispositivo utilizado para detectar, localizar o cuantificar energía o materia dando una señal para la detección o medición de una propiedad física o química a la que responde el dispositivo.²¹¹

La mayoría de los sensores constan de dos componentes: el receptor, que puede detectar la presencia, actividad, composición o concentración de ciertos analitos químicos o físicos y transforma la señal fisicoquímica en una forma de energía, y el transductor que transforma la señal medida en una señal analítica (ver Figura 1.17). Por lo tanto, el sensor ideal debe tener alta sensibilidad y selectividad, total reversibilidad, tiempo de respuesta rápido, amplio rango dinámico y estabilidad a largo plazo. En este contexto, los sensores se pueden clasificar según el tipo de receptor en sensores químicos y biosensores.

²¹¹ Kerry, J. P.; O'Grady, M. N.; Hogan, S. A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science* **2006**, *74* (1), 113-130.

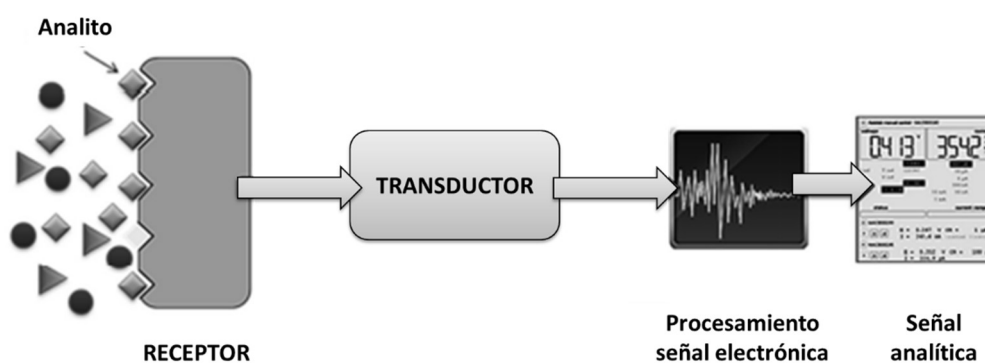


Figura 1.17. Representación general de un sensor (modificado de ref. 120).

▪ Sensores químicos

Los sensores químicos se pueden definir como un dispositivo o herramienta analítica que utiliza un receptor para responder cuantitativamente y reversiblemente al analito de interés. El receptor da como resultado un cambio en las propiedades físicoquímicas del sensor. Generalmente, se emplean sensores químicos para detectar compuestos orgánicos como azúcares, ácidos orgánicos o aminas biogénicas, y gases (O_2 , CO_2 , NH_3 , C_2H_4 , H_2S , etc.). Según el transductor, se pueden clasificar en sensores ópticos y electroquímicos.

Los sensores ópticos se basan principalmente en sensores fluorescentes de CO_2 y BAs. En el caso del CO_2 , se encuentran receptores fluorescentes sensibles al pH como HPTS,²¹² Nile Red,²¹³ o ftalocianina.²¹⁴ Entre los fluoróforos empleados para la detección de aminas, se

²¹² Bultzingslöwen, C.; McEvoy, A.; McDonagh, C.; Maccraith, B.; Klimant, I.; Krause, C. Sol-gel based optical carbon dioxide sensor employing dual luminophore referencing for application in food packaging technology. *The Analyst* **2002**, *127*, 1478-1483.

²¹³ Ali, R.; Lang, T.; Saleh, S. M.; Meier, R. J.; Wolfbeis, O. S. Optical Sensing Scheme for Carbon Dioxide Using a Solvatochromic Probe. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (8), 2846-2851.

²¹⁴ Lochman, L.; Zimcik, P.; Klimant, I.; Novakova, V.; Borisov, S. M. Red-emitting CO_2 sensors with tunable dynamic range based on pH-sensitive azaphthalocyanine indicators. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *246*, 1100-1107.

incluyen complejos de porfirinas²¹⁵ o BODIPYs,²¹⁶ fluoresceínas,^{217,218} cumarinas,²¹⁹ diariletenos,²²⁰ perilenos,^{221,222} tetrafeniletenos²²³(O₂ también)²²⁴ o derivados de quinazolininas²²⁵ y quinaxolininas²²⁶ entre otros. En la Figura 1.18 se muestran algunos ejemplos. De forma excepcional, se referencian sensores fosforescentes de CO₂^{227,228} y O₂²²⁹ basados en complejos de Pt con ligandos porfirínicos o, incluso, fotoluminiscentes de aminas basados en nanoclusters de Cu.²³⁰

²¹⁵ Yuan, D.; Liu, J. J.; Zhang, H. Z.; Wang, N.; Zou, H. Y.; Huang, C. Z.; Wang, J. Highly selective detection of spermine in human urine via a nanometal surface energy transfer platform. *Talanta* **2018**, *188*, 218-224.

²¹⁶ Jeon, S.; Kim, T.-I.; Jin, H.; Lee, U.; Bae, J.; Bouffard, J.; Kim, Y. Amine-Reactive Activated Esters of meso-CarboxyBODIPY: Fluorogenic Assays and Labeling of Amines, Amino Acids, and Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **2020**, *142* (20), 9231-9239.

²¹⁷ Quan, Z.; He, H.; Zhou, H.; Liang, Y.; Wang, L.; Tian, S.; Zhu, H.; Wang, S. Designing an intelligent nanofiber ratiometric fluorescent sensor sensitive to biogenic amines for detecting the freshness of shrimp and pork. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2021**, *333*, 129535.

²¹⁸ Jia, R.; Tian, W.; Bai, H.; Zhang, J.; Wang, S.; Zhang, J. Amine-responsive cellulose-based ratiometric fluorescent materials for real-time and visual detection of shrimp and crab freshness. *Nature Communications* **2019**, *10* (1), 795.

²¹⁹ Zhu, B.; Jiang, L.; Chen, T.; Bao, G.-M.; Zeng, L.; Hu, X.; Yuan, H.-Q. A colorimetric and fluorescence lighting-up probe for the determination of biogenic primary diamine during the spoilage of fish. *Dyes and Pigments* **2021**, *186*, 108963.

²²⁰ Fletcher, J. T.; Bruck, B. S. Spermine detection via metal-mediated ethynylarene 'turn-on' fluorescence signaling. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *207*, 843-848.

²²¹ Bettini, S.; Syrgiannis, Z.; Pagano, R.; Đorđević, L.; Salvatore, L.; Prato, M.; Giancane, G.; Valli, L. Perylene Bisimide Aggregates as Probes for Subnanomolar Discrimination of Aromatic Biogenic Amines. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2019**, *11* (18), 17079-17089.

²²² Roy, R.; Sajeev, N. R.; Sharma, V.; Koner, A. L. Aggregation Induced Emission Switching Based Ultrasensitive Ratiometric Detection of Biogenic Diamines Using a Perylenediimide-Based Smart Fluoroprobe. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2019**, *11* (50), 47207-47217.

²²³ Nakamura, M.; Sanji, T.; Tanaka, M. Fluorometric Sensing of Biogenic Amines with Aggregation-Induced Emission-Active Tetraphenylethenes. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17* (19), 5344-5349.

²²⁴ Rahaman, S. A.; Mondal, D. K.; Bandyopadhyay, S. Formation of disulphide linkages restricts intramolecular motions of a fluorophore: detection of molecular oxygen in food packaging. *Chemical Communications* **2019**, *55* (21), 3132-3135.

²²⁵ Gao, M.; Li, S.; Lin, Y.; Geng, Y.; Ling, X.; Wang, L.; Qin, A.; Tang, B. Z. Fluorescent Light-Up Detection of Amine Vapors Based on Aggregation-Induced Emission. *ACS Sensors* **2016**, *1* (2), 179-184.

²²⁶ Alam, P.; Leung, N. L. C.; Su, H.; Qiu, Z.; Kwok, R. T. K.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z. A Highly Sensitive Bimodal Detection of Amine Vapours Based on Aggregation Induced Emission of 1,2-Dihydroquinoxaline Derivatives. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (59), 14911-14917.

²²⁷ Pérez de Vargas-Sansalvador, I. M.; Carvajal, M. A.; Roldán-Muñoz, O. M.; Banqueri, J.; Fernández-Ramos, M. D.; Capitán-Vallvey, L. F. Phosphorescent sensing of carbon dioxide based on secondary inner-filter quenching. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *655* (1), 66-74.

²²⁸ Borchert, N. B.; Kerry, J. P.; Papkovsky, D. B. A CO₂ sensor based on Pt-porphyrin dye and FRET scheme for food packaging applications. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *176*, 157-165.

²²⁹ Fitzgerald, M.; Papkovsky, D. B.; Smiddy, M.; Kerry, J. P.; O'Sullivan, C. K.; Buckley, D. J.; Guilbault, G. G. Nondestructive Monitoring of Oxygen Profiles in Packaged Foods Using Phase-Fluorimetric Oxygen Sensor. *Journal of Food Science* **2001**, *66* (1), 105-110.

²³⁰ Han, A.; Xiong, L.; Hao, S.; Yang, Y.; Li, X.; Fang, G.; Liu, J.; Pei, Y.; Wang, S. Highly Bright Self-Assembled Copper Nanoclusters: A Novel Photoluminescent Probe for Sensitive Detection of Histamine. *Analytical Chemistry* **2018**, *90* (15), 9060-9067.

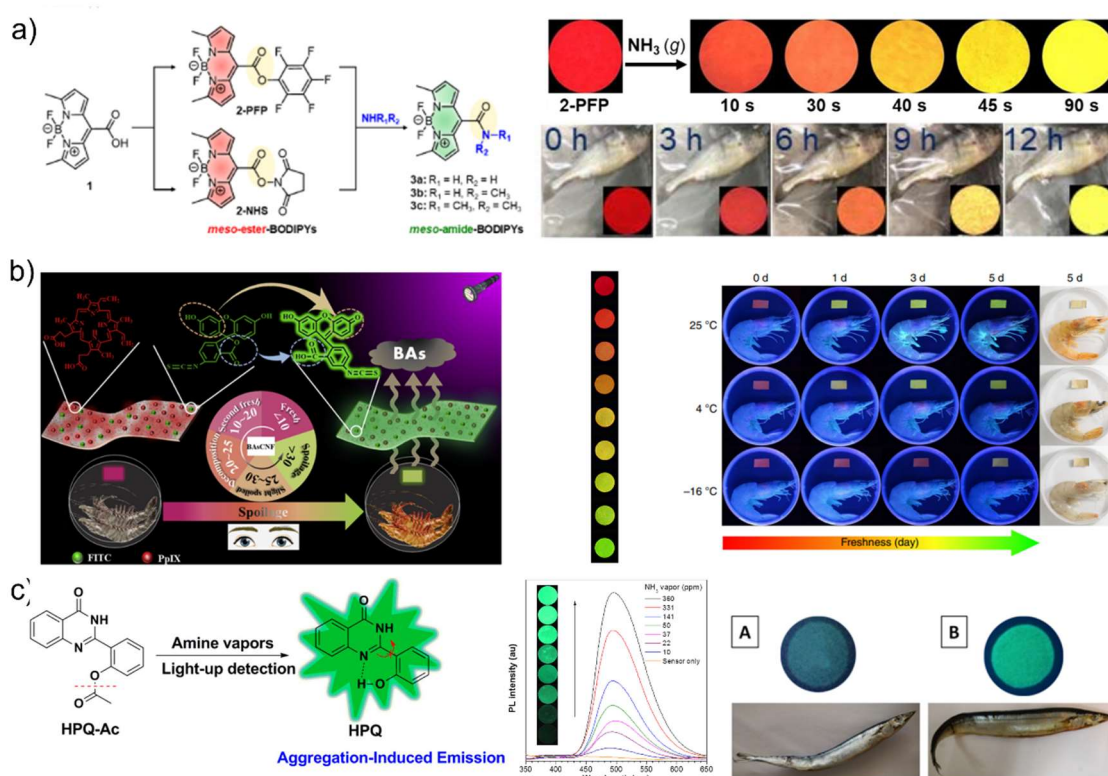


Figura 1.18. Ejemplos de indicadores fluorescentes de BAs. (a) Sensor basado en complejos BODIPYs, (b) sensor basado en fluoresceína y (c) sensor basado en derivado de quinazolinonas (tomados de ref. 216, 217, 218, y 225).

Por otro lado, los sensores electroquímicos, en particular, se caracterizan por utilizar un electrodo metálico como elemento transductor en presencia de un analito. Solo se pueden encontrar algunos ejemplos para sensores de O_2 ^{231,232} y CO_2 ^{233,234} debido a la difícil implementación en el envasado. En el caso de las aminas biogénicas, se encuentran mayoritariamente sensores eléctricos basados en materiales orgánicos semiconductores

²³¹ Won, S.; Won, K. Self-powered flexible oxygen sensors for intelligent food packaging. *Food Packaging and Shelf Life* **2021**, *29*, 100713.

²³² Zhu, R.; Desroches, M.; Yoon, B.; Swager, T. M. Wireless Oxygen Sensors Enabled by Fe(II)-Polymer Wrapped Carbon Nanotubes. *ACS Sensors* **2017**, *2* (7), 1044-1050.

²³³ Neethirajan, S.; Freund, M.; Jayas, D. S.; Shafai, C.; Thomson, D.; White, N. D. G. Development of carbon dioxide (CO_2) sensor for grain quality monitoring. *Biosystems Engineering* **2010**, *106*, 395-404.

²³⁴ Bibi, F.; Guillaume, C.; Gontard, N.; Sorli, B. Wheat gluten, a bio-polymer to monitor carbon dioxide in food packaging: Electric and dielectric characterization. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *250*, 76-84.

como polímeros,^{235,236} óxidos metálicos como WO₃²³⁷ o semiconductores como TiO₂,²³⁸ aunque se puede referenciar algún sensor electroquímico como el trifluoroazobenceno.²³⁹

▪ Biosensores

Los biosensores se pueden definir como un dispositivo o herramienta analítica que detecta, registra y transmite información sobre reacciones bioquímicas. El bioreceptor está constituido por componentes biológicos tales como enzimas, antígenos, hormonas o ácidos nucleicos.⁴⁶ Su función es reconocer el analito objetivo y el transductor convierte las señales bioquímicas en una respuesta electrónica cuantificable. El ácido láctico,^{240,241,242} las aminas biogénicas^{243,244,245} y la glucosa son los analitos más característicos en el desarrollo de biosensores ópticos y electroquímicos. En el caso de la glucosa se han desarrollado

²³⁵ Matindoust, S.; Farzi, G.; Baghaei Nejad, M.; Shahrokh Abadi, M. H.; Zou, Z.; Zheng, L.-R. Ammonia gas sensor based on flexible polyaniline films for rapid detection of spoilage in protein-rich foods. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* **2017**, *28*, 7760-7768.

²³⁶ Chang, L.-Y.; Chuang, M.-Y.; Zan, H.-W.; Meng, H.-F.; Lu, C.-J.; Yeh, P.-H.; Chen, J.-N. One-Minute Fish Freshness Evaluation by Testing the Volatile Amine Gas with an Ultrasensitive Porous-Electrode-Capped Organic Gas Sensor System. *ACS Sensors* **2017**, *2* (4), 531-539.

²³⁷ Park, Y.-H.; Choi, K.-J.; Bae, J.-Y.; Yoon, S.-K.; Jang, H.-I.; Lee, C.-S. Development of a detection sensor for mixed trimethylamine and ammonia gas. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2013**, *19* (5), 1703-1707.

²³⁸ Yanxiao, L.; Xiao-bo, Z.; Xiao-wei, H.; Ji-yong, S.; Jie-wen, Z.; Holmes, M.; Hao, L. A new room temperature gas sensor based on pigment-sensitized TiO₂ thin film for amines determination. *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, *67*, 35-41.

²³⁹ Lin, J.-F.; Kukkola, J.; Sipola, T.; Raut, D.; Samikannu, A.; Mikkola, J.-P.; Mohl, M.; Toth, G.; Su, W.-F.; Laurila, T.; et al. Trifluoroacetylazobenzene for optical and electrochemical detection of amines. *Journal of Materials Chemistry A* **2015**, *3* (8), 4687-4694.

²⁴⁰ Shen, X.; Zhang, G.; Zhang, D. A New Fluorometric Turn-On Detection of l-Lactic Acid Based on the Cascade Enzymatic and Chemical Reactions and the Abnormal Fluorescent Behavior of Silole. *Organic Letters* **2012**, *14* (7), 1744-1747.

²⁴¹ Serra, B.; Reviejo, A. J.; Parrado, C.; Pingarrón, J. M. Graphite-Teflon composite bienzyme electrodes for the determination of l-lactate: Application to food samples. *Biosensors and Bioelectronics* **1999**, *14* (5), 505-513.

²⁴² Zhou, D.; Zeng, K.; Yang, M. Gold nanoparticle-loaded hollow Prussian Blue nanoparticles with peroxidase-like activity for colorimetric determination of L-lactic acid. *Microchimica Acta* **2019**, *186* (2), 121.

²⁴³ Okuma, H.; Okazaki, W.; Usami, R.; Horikoshi, K. Development of the enzyme reactor system with an amperometric detection and application to estimation of the incipient stage of spoilage of chicken. *Analytica Chimica Acta* **2000**, *411* (1), 37-43.

²⁴⁴ Punakivi, K.; Smolander, M.; Niku-Paavola, M. L.; Mattinen, J.; Buchert, J. Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase. *Talanta* **2006**, *68* (3), 1040-1045.

²⁴⁵ Pospiskova, K.; Safarik, I.; Sebelá, M.; Kuncová, G. Magnetic particles-based biosensor for biogenic amines using an optical oxygen sensor as a transducer. *Microchimica Acta* **2013**, *180*, 311-318.

biosensores colorimétricos,²⁴⁶ fluorescentes,²⁴⁷ amperométricos,²⁴⁸ potenciométricos²⁴⁹ y conductimétricos.²⁵⁰ En la Figura 1.19 se referencian algunos ejemplos de biosensores.

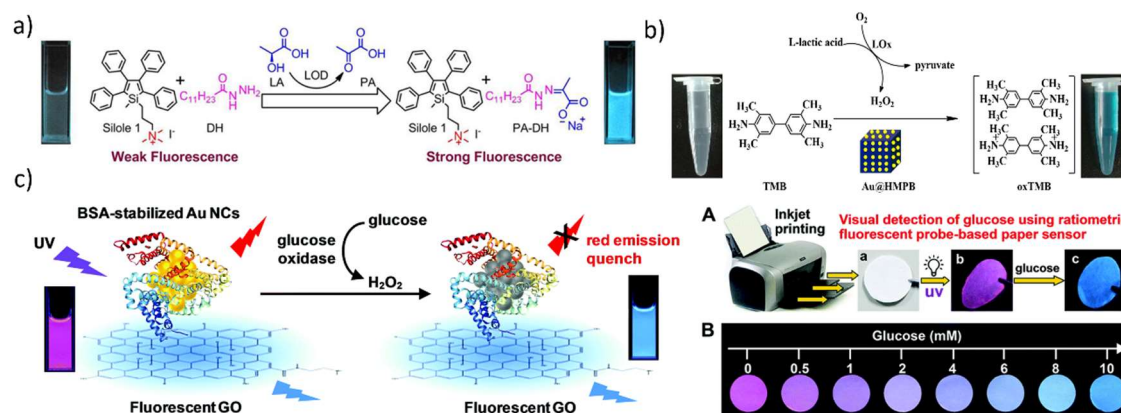


Figura 1.19. Biosensores basados en (a) fluorescencia o (b) detección colorimétrica para ácido láctico y (c) biosensor fluorescente para glucosa (tomados de ref. 240, 242 y 247, respectivamente).

El óxido de trimetilamina (TMAO) y la hipoxantina (Hx) son otros indicadores del deterioro en el desarrollo de biosensores. La hipoxantina es uno de los productos de la degradación metabólica del ATP durante el deterioro de alimentos. Para detectar la cantidad de Hx, se detallan varios biosensores enzimáticos basados en una reacción colorimétrica²⁵¹ o electroquímica.²⁵² La bibliografía es escasa para TMAO, pero se puede encontrar algún ejemplo de biosensor amperométrico.²⁵³

²⁴⁶ Zhang, J.; Dai, X.; Song, Z.-L.; Han, R.; Ma, L.; Fan, G.-C.; Luo, X. One-pot enzyme- and indicator-free colorimetric sensing of glucose based on MnO₂ nano-oxidizer. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2020**, *304*, 127304.

²⁴⁷ Su, L.; Yang, L.; Sun, Q.; Zhao, T.; Liu, B.; Jiang, C.; Zhang, Z. A ratiometric fluorescent paper sensor for consecutive color change-based visual determination of blood glucose in serum. *New Journal of Chemistry* **2018**, *42* (9), 6867-6872.

²⁴⁸ Rubio Retama, J.; Mecerreyes, D.; López-Ruiz, B.; López-Cabarcos, E. Synthesis and characterization of semiconducting polypyrrole/polyacrylamide microparticles with GOx for biosensor applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2005**, *270*, 239-244.

²⁴⁹ Jawaheer, S.; White, S. F.; Rughooputh, S. D. D. V.; Cullen, D. C. Development of a common biosensor format for an enzyme based biosensor array to monitor fruit quality. *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, *18* (12), 1429-1437.

²⁵⁰ Marrakchi, M.; Dzyadevych, S. V.; Lagarde, F.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N. Conductometric biosensor based on glucose oxidase and beta-galactosidase for specific lactose determination in milk. *Materials Science and Engineering: C* **2008**, *28* (5), 872-875.

²⁵¹ Chen, Z.; Lin, Y.; Ma, X.; Guo, L.; Qiu, B.; Chen, G.; Lin, Z. Multicolor biosensor for fish freshness assessment with the naked eye. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *252*, 201-208.

²⁵² Lawal, A. T.; Adeloju, S. B. Mediated xanthine oxidase potentiometric biosensors for hypoxanthine based on ferrocene carboxylic acid modified electrode. *Food Chemistry* **2012**, *135* (4), 2982-2987.

²⁵³ Waffo, A. F. T.; Mitrova, B.; Tiedemann, K.; Iobbi-Nivol, C.; Leimkühler, S.; Wollenberger, U. Electrochemical Trimethylamine N-Oxide Biosensor with Enzyme-Based Oxygen-Scavenging Membrane for Long-Term Operation under Ambient Air. *Biosensors* **2021**, *11* (4), 98.

Por lo que respecta al contexto de la alimentación, los biosensores se aplican también en la detección de alérgenos.²⁵⁴ Por ejemplo, el gluten y la leche presentan proteínas alergénicas detectables como la gliadina²⁵⁵ y la lactoglobulina^{256,257} o caseína,^{258,259} respectivamente. En la Figura 1.20 se referencian algunos ejemplos de biosensores electroquímicos para la detección de gliadina o lactoglobulina.

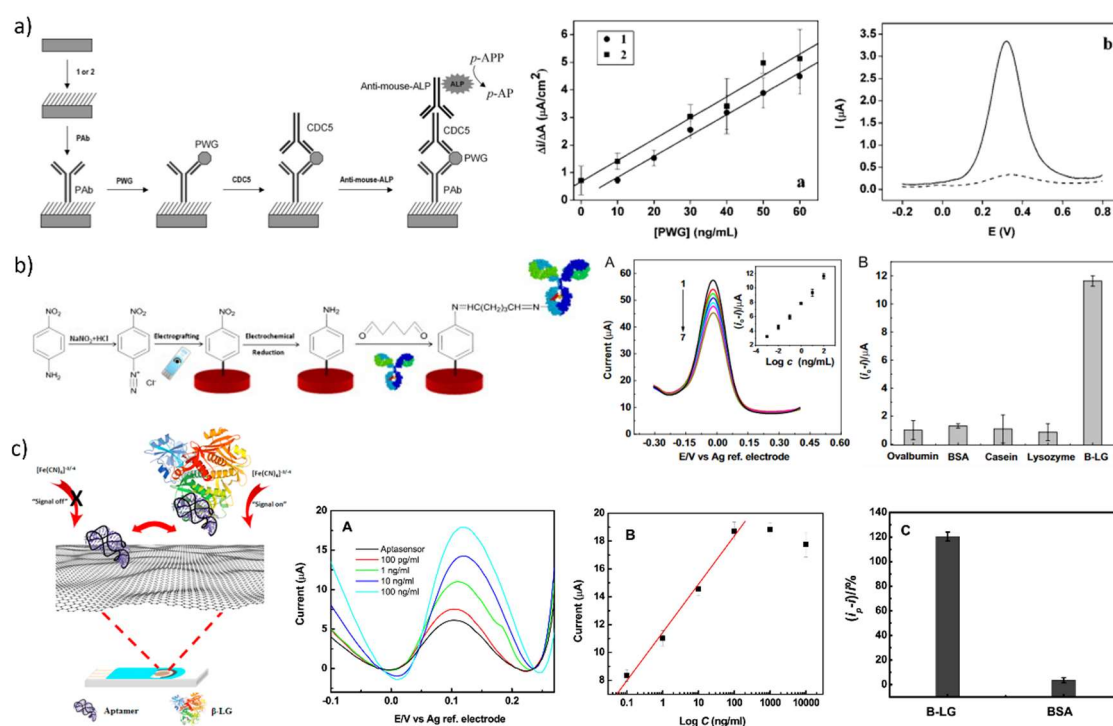


Figura 1.20. Biosensores electroquímicos para la detección de (a) gliadina y (b, c) lactoglobulina (tomados de ref. 255, 256 y 257, respectivamente).

²⁵⁴ Wang, W.; Han, J.; Wu, Y.; Yuan, F.; Chen, Y.; Ge, Y. Simultaneous Detection of Eight Food Allergens Using Optical Thin-Film Biosensor Chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59* (13), 6889-6894.

²⁵⁵ Nassef, H. M.; Bermudo Redondo, M. C.; Ciclitira, P. J.; Ellis, H. J.; Frago, A.; O'Sullivan, C. K. Electrochemical Immunosensor for Detection of Celiac Disease Toxic Gliadin in Foodstuff. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (23), 9265-9271.

²⁵⁶ Eissa, S.; Tlili, C.; L'Hocine, L.; Zourob, M. Electrochemical immunosensor for the milk allergen β -lactoglobulin based on electrografting of organic film on graphene modified screen-printed carbon electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* **2012**, *38* (1), 308-313.

²⁵⁷ Eissa, S.; Zourob, M. In vitro selection of DNA aptamers targeting β -lactoglobulin and their integration in graphene-based biosensor for the detection of milk allergen. *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *91*, 169-174.

²⁵⁸ Sun, Y.; Liang, X.; Zhao, Y.; Fan, J. A water-soluble, 1,8-naphthalimide based aggregation induced synchronous emission system for selective and sensitive recognition of casein. *Analytical Methods* **2012**, *4* (12), 4284-4288

²⁵⁹ Li, Z.; Wang, L.; Guan, W.; Ding, C.; Yuan, Z.; Lu, C. A novel homolateral and dicationic AIEgen for the sensitive detection of casein. *Analyst* **2019**, *144* (11), 3635-3642.

1.3 Líquidos iónicos en la industria alimentaria

La industria alimentaria se ha enfrentado a una tremenda revolución en la última década y descubrir nuevas estrategias para la cadena productiva de los sistemas alimentarios sigue siendo un desafío desde un punto de vista sostenible. En este contexto, los líquidos iónicos han llamado la atención de la comunidad científica como una tecnología emergente potencialmente adecuada para superar los desafíos que enfrenta la industria alimentaria. Actualmente, la literatura sobre ciencia y tecnología de los alimentos que involucra líquidos iónicos todavía es escasa. (Del número total de artículos que citan líquidos iónicos en las últimas dos décadas, el 0.23 % está relacionado con los términos de búsqueda “líquidos iónicos” y “comida” en Scopus y Web of Science).²⁶⁰

La viabilidad de usar líquidos iónicos en aplicaciones alimentarias es una alternativa prometedora debido a la capacidad de modular y ajustar sus propiedades físicas, químicas, toxicológicas y bioactivas mediante la elección adecuada de los precursores, ya que los convierte en materiales interesantes para una amplia variedad de aplicaciones.²⁶¹ Hasta hoy, la utilización se ha centrado principalmente en procesos de extracción²⁶² y análisis de alimentos,²⁶³ aunque debido al estudio de sus propiedades se han establecido otras aplicaciones alternativas como surfactantes²⁶⁴ o agentes antimicrobianos.²⁶⁵ La futura aplicación de los líquidos iónicos en la industria alimentaria parece ser bastante prometedora. A pesar de ello, existe una relevante demanda por clasificar dichos compuestos como aditivos no tóxicos. Para hacer frente a esto, los líquidos iónicos basados en iones obtenidos a partir de fuentes, tales como colina, aminoácidos, derivados de ácidos orgánicos y otros biocompuestos surgen como alternativa.²⁶⁶

²⁶⁰ Toledo Hijo, A. A. C.; Maximo, G. J.; Costa, M. C.; Batista, E. A. C.; Meirelles, A. J. A. Applications of Ionic Liquids in the Food and Bioproducts Industries. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2016**, *4* (10), 5347-5369.

²⁶¹ Martins, P. L. G.; Braga, A. R.; de Rosso, V. V. Can ionic liquid solvents be applied in the food industry? *Trends in Food Science & Technology* **2017**, *66*, 117-124.

²⁶² Passos, H.; Freire, M. G.; Coutinho, J. A. P. Ionic liquid solutions as extractive solvents for value-added compounds from biomass. *Green Chem.* **2014**, *16* (12), 4786-4815.

²⁶³ Sun, B.; Qi, L.; Wang, M. Determination of preservatives in soft drinks by capillary electrophoresis with ionic liquids as the electrolyte additives. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37* (16), 2248-2252.

²⁶⁴ Baltazar, Q. Q.; Chandawalla, J.; Sawyer, K.; Anderson, J. L. Interfacial and micellar properties of imidazolium-based monocationic and dicationic ionic liquids. *Colloids Surf., A* **2007**, *302* (1-3), 150-156.

²⁶⁵ Cornellas, A.; Perez, L.; Comelles, F.; Ribosa, I.; Manresa, A.; Garcia, M. T. Self-aggregation and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids in aqueous solution. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *355* (1), 164-171.

²⁶⁶ Gomes, J. M.; Silva, S. S.; Reis, R. L. Biocompatible ionic liquids: fundamental behaviours and applications. *Chemical Society Reviews* **2019**, *48* (15), 4317-4335.

1.3.1 Líquidos iónicos

Los líquidos iónicos (ILs, por sus siglas en inglés) son considerados una clase de electrolitos líquidos que consisten completamente en iones, pero que, a diferencia de las sales clásicas, existen como líquidos por debajo de 100°C o incluso a temperatura ambiente (RTILs). En la Figura 1.21 se puede observar la estructura de los cationes y aniones más empleados para la preparación de ILs. Estas sales iónicas fluidas están formadas por cationes orgánicos y aniones que pueden ser orgánicos o inorgánicos. Tanto los cationes como los aniones en los ILs se caracterizan generalmente por una densidad de carga más baja y un carácter deslocalizado más alto y, por lo tanto, su punto de fusión se reduce pudiendo ser líquidos a temperatura ambiente. Generalmente, propiedades como el punto de fusión, la viscosidad o la reactividad se pueden modular con la elección del catión y anión.²⁶⁷ Representan una clase de materiales líquidos con perfiles únicos de propiedades que se originan a partir de una interacción compleja de interacciones coulómbicas y enlaces de hidrógeno²⁶⁸ de sus iones, así como fuerzas de Van der Waals o interacciones $\pi - \pi$ que involucran cadenas de alquilo soportadas por los cationes o aniones y iones aromáticos, respectivamente.²⁶⁹

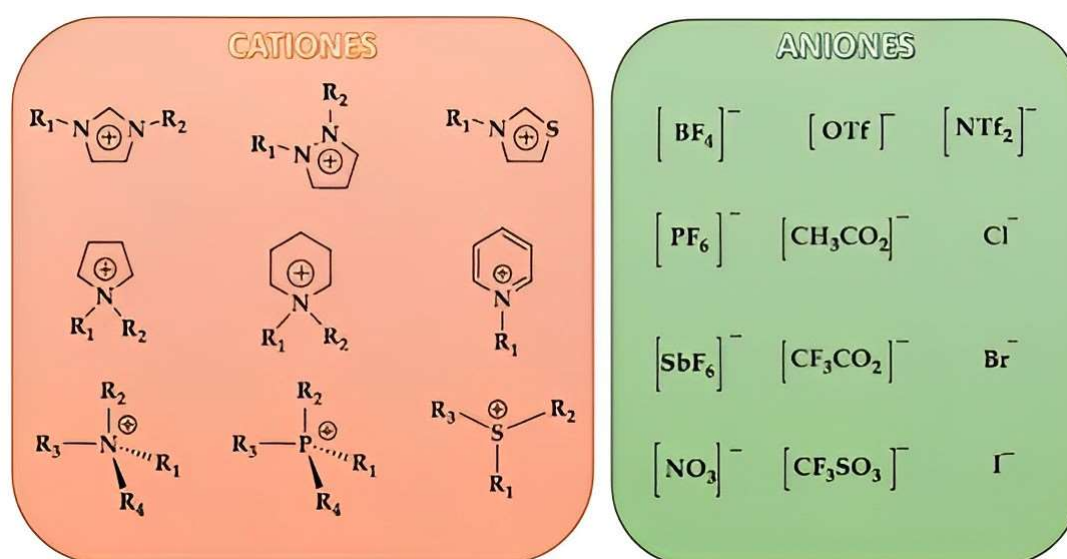


Figura 1.21. Cationes y aniones comúnmente usados para la preparación de líquidos iónicos.

²⁶⁷ Peris Salom, E. Continuous Flow Systems for Multicatalytic Processes Based on Supported Ionic Liquids. Ph.D. Thesis, Universitat Jaume I, Castellón de la Plana, España, 2019.

²⁶⁸ Fumino, K.; Wulf, A.; Ludwig, R. Strong, Localized, and Directional Hydrogen Bonds Fluidize Ionic Liquids. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47 (45), 8731-8734.

²⁶⁹ Hunt, P. A. Quantum Chemical Modeling of Hydrogen Bonding in Ionic Liquids. *Topics in Current Chemistry* **2017**, 375 (3), 59.

En las dos últimas décadas y debido a las propiedades únicas y su condición de “disolventes neotéricos” se han descrito una amplia gama de ILs.^{270,271} El primer líquido iónico se remonta a 1914 cuando Paul Walden reportó la síntesis de nitrato de etilamonio ([EtNH₃]⁺[NO₃]⁻) (ver Figura 1.22), mediante la neutralización de la etilamina con ácido nítrico concentrado.²⁷² En la Figura 1.23 se refleja de manera esquemática la evolución de las generaciones de ILs desde este descubrimiento hasta la fecha.²⁷³ La primera generación, desarrollada por Wilkes y colaboradores, describe sales de 1-alkil-3-metilimidazolio como tetracloroaluminatos.²⁷⁴ La segunda generación de líquidos iónicos relativamente estables al aire y al agua no fue descrita hasta 1992²⁷⁵ y, finalmente, la tercera generación contempla el concepto de ILs para tareas específicas (TSILs) introducido por Davis.²⁷⁶ Estos compuestos se definen como ILs en los que el anión, catión o ambos incorporan covalentemente un grupo funcional (diseñado para dotarlos de propiedades particulares, ya sean físicas o químicas o en términos de reactividad) como parte de la estructura iónica.

²⁷⁰ Marullo, S.; D'Anna, F.; Rizzo, C.; Billeci, F. Ionic liquids: “normal” solvents or nanostructured fluids? *Organic & Biomolecular Chemistry* **2021**, *19* (10), 2076-2095.

²⁷¹ Hallett, J. P.; Welton, T. Room-Temperature Ionic Liquids: Solvents for Synthesis and Catalysis. 2. *Chemical Reviews* **2011**, *111* (5), 3508-3576.

²⁷² Walden, P. Ueber Die Molekulargrösse Und Elektrische Leitfähigkeit Einiger Geschmolzenen Salze. *Bull. Acad. Imp. Sci. St. Pétersbourg*. **1914**, *8* (6), 405-422.

²⁷³ Welton, T. Ionic liquids: a brief history. *Biophysical Reviews* **2018**, *10* (3), 691-706.

²⁷⁴ Wilkes, J. S.; Levisky, J. A.; Wilson, R. A.; Hussey, C. L. Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: a new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy and synthesis. *Inorganic Chemistry* **1982**, *21* (3), 1263-1264.

²⁷⁵ Wilkes, J. S.; Zaworotko, M. J. Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1992**, (13), 965-967.

²⁷⁶ H. Davis, J. J. Task-Specific Ionic Liquids. *Chemistry Letters* **2004**, *33* (9), 1072-1077.

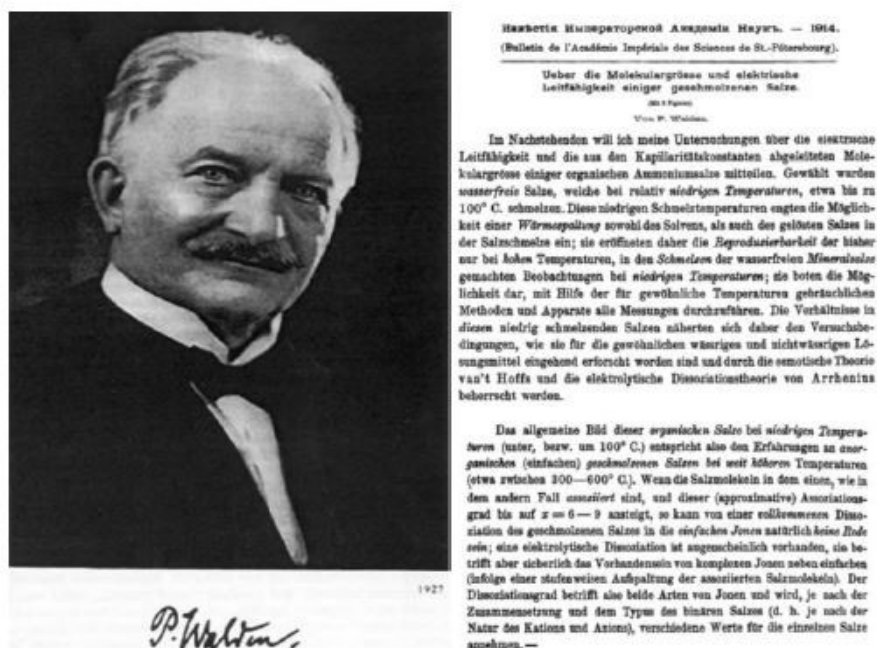


Figura 1.22. Fotografía de Paul Walden, investigador y descubridor de los líquidos iónicos y extracto del primer artículo que describe el $[\text{EtNH}_3]^+[\text{NO}_3]^-$ como líquido iónico (tomado de ref. 272).

Los ILs son disolventes de baja o nula presión de vapor y, por lo tanto, no producen sustancias orgánicas volátiles. Por este motivo, algunos autores defendieron la naturaleza verde de los ILs.²⁷⁷ Aunque en los últimos años, determinados trabajos revelan y ponen en entredicho su carácter verde.²⁷⁸ En cualquier caso, los ILs pueden verse como sistemas moleculares “de diseño”, cuyas propiedades se pueden ajustar según las necesidades de una aplicación específica.

Por otro lado, los ILs han surgido como una alternativa más respetuosa con el medio ambiente siendo más deseables que los disolventes orgánicos volátiles convencionales y se consideran como “verdes” y “de diseño” debido a que poseen capacidad para variar los iones, modificando y optimizando la naturaleza híbrida orgánico-iónica para ajustar las

²⁷⁷ Earle, M. J.; Seddon, K. R. Ionic liquids. Green solvents for the future. **2000**, 72 (7), 1391-1398.

²⁷⁸ Chen, Y.; Mu, T. Revisiting greenness of ionic liquids and deep eutectic solvents. *Green Chemical Engineering* **2021**, 2 (2), 174-186.

propiedades de los ILs según la necesidad de una aplicación específica.²⁷⁹ En este sentido, algunas propiedades fundamentales de los ILs²⁸⁰ incluyen:

- Los ILs permanecen líquidos en un amplio rango de temperaturas. Además, presentan una elevada estabilidad térmica²⁸¹ y química.²⁸²
- Tienen una presión de vapor muy baja en condiciones ambientales y, por lo tanto, se consideran benignos.
- Entre otras propiedades presentan escasa inflamabilidad, relativamente alta viscosidad y conductividad iónica.
- Presentan excelentes propiedades lubricantes e hidráulicas, así como tendencias ajustables de acidez y basicidad.
- Los ILs pueden absorber y liberar gases
- Exhiben un amplio rango de solubilidad de biopolímeros debido a su combinación sintonizable de aniones y cationes.

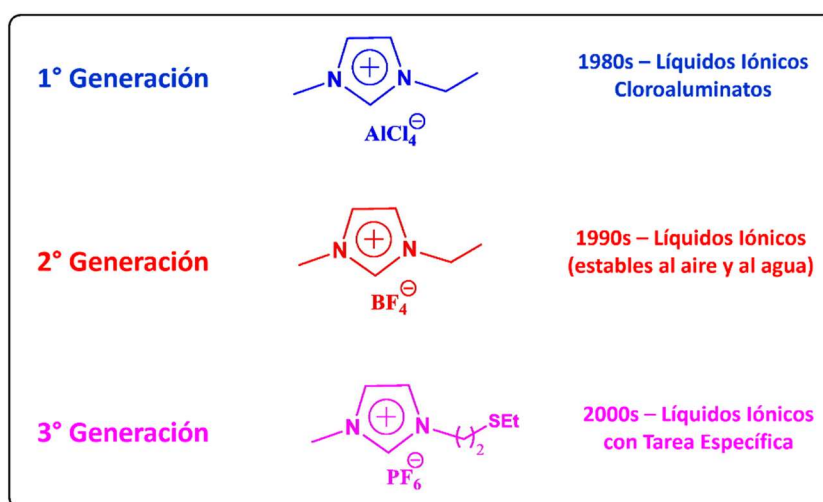


Figura 1.23. Tres generaciones de ILs (modificado de ref. 288).

²⁷⁹ Kim, K.-S.; Shin, B.-K.; Lee, H. Physical and electrochemical properties of 1-butyl-3-methylimidazolium bromide, 1-butyl-3-methylimidazolium iodide, and 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. *Korean Journal of Chemical Engineering* **2004**, *21* (5), 1010-1014.

²⁸⁰ Singh, S. K.; Savoy, A. W. Ionic liquids synthesis and applications: An overview. *Journal of Molecular Liquids* **2020**, *297*, 112038.

²⁸¹ Maton, C.; De Vos, N.; Stevens, C. V. Ionic liquid thermal stabilities: decomposition mechanisms and analysis tools. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (13), 5963-5977.

²⁸² Wang, B.; Qin, L.; Mu, T.; Xue, Z.; Gao, G. Are Ionic Liquids Chemically Stable? *Chemical Reviews* **2017**, *117* (10), 7113-7131.

1.3.2 Hacia la química verde y sostenible

Actualmente, debido al aumento de la población mundial y la globalización, la demanda y consumo de productos asociados con alimentos, servicios médicos y otros materiales se ha incrementado.²⁸³ Por lo tanto, la producción y el desarrollo es una parte fundamental de la vida diaria en el mundo actual. No obstante, el mayor desafío se centra en la gestión racional de los productos químicos a lo largo de su ciclo de vida siendo esencial para evitar riesgos significativos y complejos para la salud humana y los ecosistemas.

Por lo tanto, la necesidad de minimizar la contaminación mediante el desarrollo y la utilización de protocolos ecológicos forman una química completamente nueva llamada "Química Verde". El término Química Verde fue acuñado en 1991 partir de la elaboración realizada por Anastas y Warner.²⁸⁴ La Química Verde es un campo emergente, que surgió a principios de la década de 1990, con el propósito de diseñar productos y procesos químicos más eficientes y de menor impacto ambiental en comparación con las reacciones químicas "tradicionales". El campo ha recibido un gran interés en la última década debido a su capacidad para aprovechar la innovación química para alcanzar objetivos ambientales, educativos, industriales y económicos simultáneamente.^{285,286} El aspecto más importante de la química verde es el concepto de diseño. Los doce principios de la química verde²⁸⁷ son "reglas de diseño" que ayudan a los químicos a lograr el objetivo intencional de la sostenibilidad. Hay varios aspectos importantes en los que la química verde es sostenible:

- ✓ Residuos: Al reducir en la medida de lo posible o incluso eliminar totalmente su producción, la química verde es sostenible con respecto a los residuos.
- ✓ Materiales: Mediante el uso eficiente de materiales, el máximo reciclaje y el uso mínimo de materias, la química verde es sostenible con respecto a los materiales.
- ✓ Económico: con un alto nivel de sofisticación, la química verde normalmente cuesta menos en términos estrictamente económicos (por no hablar de los costes ambientales) que la química como se practica normalmente.

²⁸³ Horváth, I. T. Introduction: Sustainable Chemistry. *Chemical Reviews* **2018**, *118* (2), 369-371.

²⁸⁴ P.T. Anastas, J.C. Warner, Green Chem.: Theory and Practice, Oxford University Press, Oxford, 1998.

²⁸⁵ Horváth, I. T.; Anastas, P. T. Innovations and Green Chemistry. *Chemical Reviews* **2007**, *107* (6), 2169-2173.

²⁸⁶ Sheldon, R. A.; Arends, I.; Hanefeld, U. *Green Chemistry and Catalysis*, 1st ed.; John Wiley & Sons: Weinheim, 2007.

²⁸⁷ Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39* (1), 301-312.

La correlación entre los ILs y la química verde está claramente relacionada con las propiedades de los ILs. Por ello, son candidatos potenciales para resolver algunos de los principales problemas a los que se enfrenta actualmente la sociedad al emerger como un recurso alternativo limpio, eficiente y ecológico.²⁸⁸ Los ILs se consideran disolventes verdes por las siguientes razones:

- Son buenos disolventes para una amplia gama de materiales inorgánicos y orgánicos, y pueden llevarse a la misma fase combinaciones inusuales de reactivos de diferente naturaleza o polaridad.
- A menudo se componen de iones que coordinan deficientemente, por lo que tienen el potencial de ser disolventes altamente polares, pero no coordinables.
- Son inmiscibles con varios disolventes orgánicos y proporcionan una alternativa polar no acuosa para los sistemas de dos fases. Los ILs hidrófobos también se pueden usar como fases polares inmiscibles con agua.
- Los ILs no son volátiles, por lo que pueden usarse en sistemas de alto vacío y eliminan muchos problemas de contención.

Para un uso seguro es necesario conocer la toxicidad y la biodegradabilidad. La mayoría de ILs son irritantes y de toxicidad comparable a los disolventes orgánicos convencionales.²⁸⁹ No obstante, la adecuada selección del catión y el anión ha mostrado el posible diseño de ILs no tóxicos. Por las pruebas biológicas, se ha observado que la toxicidad viene marcada por el catión según la cadena alquílica. En este mismo contexto, la presencia de grupo éster en dicha cadena aumenta la biodegradabilidad.²⁹⁰ Así, aunque no se puede afirmar con rotundidad que sean totalmente “verdes”, los ILs presentan notables beneficios medioambientales.

²⁸⁸ Vekariya, R. L. A review of ionic liquids: Applications towards catalytic organic transformations. *Journal of Molecular Liquids* **2017**, *227*, 44-60.

²⁸⁹ Docherty, K. M.; Kulpa, J. C. F. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. *Green Chemistry* **2005**, *7* (4), 185-189.

²⁹⁰ (a) Gathergood, N.; Garcia, M. T.; Scammells, P. J. Biodegradable ionic liquids: Part I. Concept, preliminary targets and evaluation. *Green Chemistry* **2004**, *6* (3), 166-175, (b) Garcia, M. T.; Gathergood, N.; Scammells, P. J. Biodegradable ionic liquids Part II. Effect of the anion and toxicology. *Green Chemistry* **2005**, *7* (1), 9-14, (c) Gathergood, N.; Scammells, P. J.; Garcia, M. T. Biodegradable ionic liquids Part III. The first readily biodegradable ionic liquids. *Green Chemistry* **2006**, *8* (2), 156-160.

1.3.3 Métricas de Química Verde y Sostenibilidad

Las primeras métricas de Química Verde introducidas en la década de 1990 para cuantificar la eficiencia de una síntesis química fueron la economía atómica (AE, por sus siglas en inglés) y el “*E factor*”. En las últimas dos décadas, ambas han sido adoptadas tanto por el mundo académico como por la industria. Sin embargo, este tipo de métricas deben de ser complementadas por estudios que midan el impacto ambiental de los desechos tales como el análisis del ciclo de vida (LCA, por sus siglas en inglés) para caracterizar el impacto ambiental potencial a lo largo del ciclo de vida y metodologías estratégicas para determinar la viabilidad económica de los procesos y productos.^{291,292}

La economía atómica es un número teórico que determina la incorporación de materias de partida al producto final suponiendo un rendimiento químico del 100 %, sin tener en cuenta otros factores como los disolventes. La AE es muy útil en la evaluación rápida de proceso y puede utilizarse para comparar rutas sintéticas alternativas prediciendo los residuos que se pueden generar, sin llevar a cabo procesos experimentales.

El “*E(nvironmental) factor*” desarrollado por R. Sheldon, se definió como la relación de masa de los desechos totales generados respecto a la masa de los productos obtenidos (*E factor* = Kg de desechos / kg de productos).²⁹³ El *E factor* ideal es igual a cero, esto indica que no hay producción de residuos, por lo que un elevado valor de *E factor* señala una alta generación de desechos en el proceso. Estos dos parámetros son utilizados para evaluar los líquidos iónicos con el fin de llevar a cabo procesos más eficaces, novedosos y sostenibles.²⁹⁴

Así, su empleo como medios de reacción y separación podría ofrecer una solución a los problemas de emisión de disolventes y de generación de residuos. En muchos procesos de reacción química, los ILs se sugieren como disolventes, catalizadores, reactivos o combinaciones de estos. Por ejemplo, los ILs actúan sobre la conversión catalítica de celulosa y biomasa en productos químicos de valor añadido.²⁹⁵ En los procesos de separación, el uso de ILs como disolventes en la extracción y / o purificación de compuestos

²⁹¹ Sheldon, R. A. Metrics of Green Chemistry and Sustainability: Past, Present, and Future. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**, *6* (1), 32–48.

²⁹² Zhang, Y.; Bakshi, B. R.; Demessie, E. S. Life Cycle Assessment of an Ionic Liquid versus Molecular Solvents and Their Applications. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 1724–1730.

²⁹³ Sheldon, R. A. The E Factor 25 Years on: The Rise of Green Chemistry and Sustainability. *Green Chem.* **2017**, *19* (1), 18–43.

²⁹⁴ Constable, D. J. C.; Curzons, A. D.; Cunningham, V. L. Metrics to ‘Green’ Chemistry—Which Are the Best? *Green Chem.* **2002**, *4* (6), 521–527.

²⁹⁵ Zhang, Z.; Song, J.; Han, B. Catalytic Transformation of Lignocellulose into Chemicals and Fuel Products in Ionic Liquids. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 10, 6834–6880.

bioactivos puede traer mayores rendimientos de extracción y factores de purificación en comparación con los disolventes y materiales convencionales.²⁹⁶

1.3.4 Líquidos iónicos próticos (PILs)

La clasificación de ILs puede refinarse considerando su naturaleza iónica. La gran mayoría de los líquidos iónicos se crean a partir de un sustrato neutro mediante la adición neta de H^+ o R^+ a un par solitario de un heteroátomo, donde el heteroátomo es parte íntegra de la estructura molecular del catión.²⁹⁷ Generalmente, los ILs se clasifican en tres categorías como se muestra en la Figura 1.24.²⁹⁸ Principalmente, se distingue entre líquidos iónicos apróticos (AILs) y próticos (PILs). Los AILs contienen sustituyentes distintos de un protón (típicamente un grupo alquilo) y la carga positiva es generalmente permanente, ya que el catión no está en equilibrio con especies neutras. En la actualidad, el campo de los líquidos iónicos está dominado por los AILs, pero el interés por los PILs está creciendo rápidamente.²⁹⁹

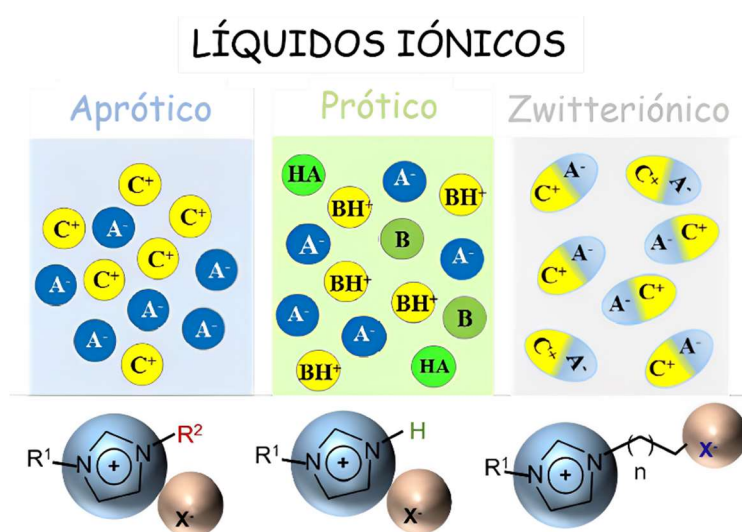


Figura 1.24. Clasificación de los líquidos iónicos en tres categorías (apróticos, próticos y zwitteriónicos), (modificado de ref. 298).

²⁹⁶ Ventura, S. P. M.; e Silva, F. A.; Quental, M. V.; Mondal, D.; Freire, M. G.; Coutinho, J. A. P. Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 10, 6984–7052.

²⁹⁷ Mirjafari, A.; Pham, L. N.; McCabe, J. R.; Mobarrez, N.; Salter, E. A.; Wierzbicki, A.; West, K. N.; Sykora, R. E.; Davis, J. H. Building a bridge between aprotic and protic ionic liquids. *RSC Advances* **2013**, *3* (2), 337-340.

²⁹⁸ Wojnarowska, Z.; Paluch, M. Recent progress on dielectric properties of protic ionic liquids. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2015**, *27* (7), 073202.

²⁹⁹ Greaves, T. L.; Weerawardena, A.; Fong, C.; Krodkiewska, I.; Drummond, C. J. Protic Ionic Liquids: Solvents with Tunable Phase Behavior and Physicochemical Properties. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (45), 22479-22487.

Por otro lado, los líquidos iónicos próticos son un subgrupo de líquidos iónicos que se obtiene mediante una neutralización o reacción ácido-base entre un ácido y una base de Brønsted.³⁰⁰ Esto significa que los PILs son generalmente más simples y más baratos de preparar que otras clases de ILs, ya que no hay subproductos.³⁰¹ La propiedad característica que distingue a los PILs de otros ILs es la naturaleza dinámica asociada a la transferencia de protones del ácido a la base, lo que conduce a la presencia de sitios donantes y receptores de protones, que pueden usarse para construir una red de enlaces o puentes de hidrógeno.³⁰² En dicha situación, la transferencia de protón puede ser parcial o incompleta dependiendo del ácido específico y la base utilizada. De este modo, existe la posibilidad de que los cationes y aniones puedan existir en equilibrio con especies moleculares.³⁰³ Por lo que respecta a los líquidos iónicos zwitteriónicos (ZILs), se caracterizan por presentar tanto la carga positiva como la carga negativa en su estructura.³⁰⁴

1.3.5 Ionicidad o transferencia de protón

Para determinar la transferencia de protón en los PILs, se han utilizado diferentes técnicas para proporcionar información cualitativa sobre la naturaleza iónica. Entre ellas podemos destacar la espectroscopia de IR,³⁰³ espectroscopia de RMN³⁰⁵ y la conductividad iónica a través del diagrama de Walden. Sin embargo, no existe método estándar para distinguir claramente entre los estados iónicos de un PIL. La cuestión de evaluar la ionicidad de los líquidos iónicos ha sido discutida según la relación clásica de Walden de la Figura 1.25, que consiste en el registro (conductividad equivalente) contra la fluidez. En esta gráfica, la mayoría de los PILs muestran un buen comportamiento iónico en comparación con las soluciones acuosas ideales de KCl.³⁰⁶ No obstante, otros se encuentran en la región de baja

³⁰⁰ Greaves, T. L.; Drummond, C. J. Protic Ionic Liquids: Properties and Applications. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (1), 206-237.

³⁰¹ Hayes, R.; Warr, G. G.; Atkin, R. Structure and Nanostructure in Ionic Liquids. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (13), 6357-6426.

³⁰² Fumino, K.; Reimann, S.; Ludwig, R. Probing molecular interaction in ionic liquids by low frequency spectroscopy: Coulomb energy, hydrogen bonding and dispersion forces. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16* (40), 21903-21929.

³⁰³ Nuthakki, B.; Greaves, T. L.; Krodziewska, I.; Weerawardena, A.; Burgar, M. I.; Mulder, R. J.; Drummond, C. J. Protic Ionic Liquids and Ionicity. *Australian Journal of Chemistry* **2007**, *60* (1), 21-28.

³⁰⁴ Wu, B.; Kuroda, K.; Takahashi, K.; Castner, E. W. Structural analysis of zwitterionic liquids vs. homologous ionic liquids. *The Journal of Chemical Physics* **2018**, *148* (19), 193807.

³⁰⁵ Noda, A.; Hayamizu, K.; Watanabe, M. Pulsed-Gradient Spin-Echo ¹H and ¹⁹F NMR Ionic Diffusion Coefficient, Viscosity, and Ionic Conductivity of Non-Chloroaluminate Room-Temperature Ionic Liquids. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (20), 4603-4610.

³⁰⁶ Xu, W.; Angell, C. A. Solvent-Free Electrolytes with Aqueous Solution-Like Conductivities. *Science* **2003**, *302* (5644), 422-425.

ionidad y, por lo tanto, se propuso que los sistemas con iones asociados o transferencia débil de protones se pueden clasificar como "líquidos iónicos pobres".^{307,308} Las bajas conductividades iónicas de dichos PILs referenciados en la bibliografía han sugerido que la transferencia de protones crea un equilibrio, el cual conduce a especies neutras y agregados de pares de iones, lo que dificulta la cuantificación y definición de la ionidad de un PIL.^{309,310}

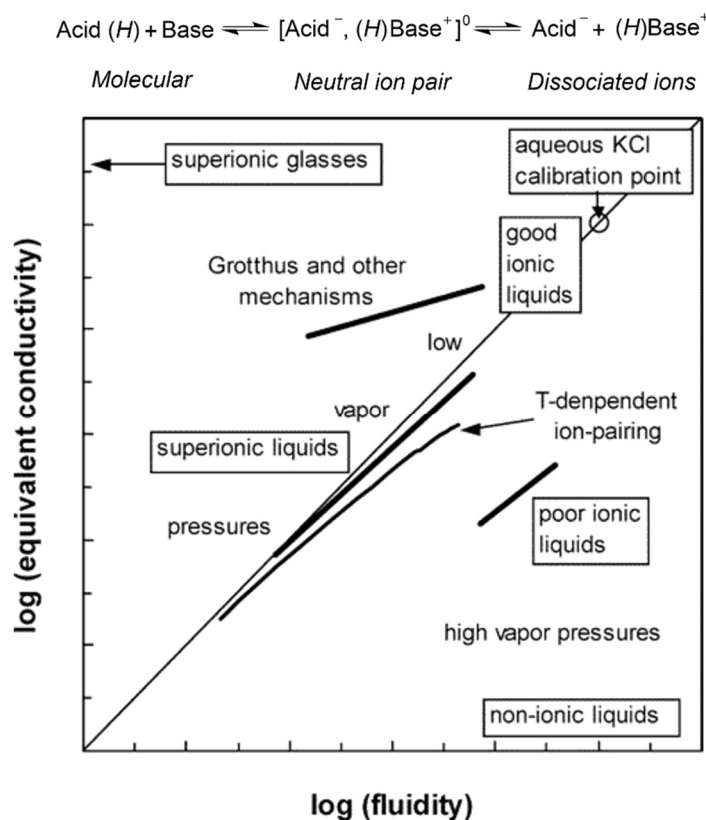


Figura 1.25. Equilibrio químico de PILs y clasificación de ILs según el diagrama de Walden (modificado de ref. 308).

Parte de la literatura sugiere que el grado de transferencia de protones debe ser de al menos el 99 % para que el PIL se considere una sal "pura".^{303,311} Sin embargo, ha quedado claro

³⁰⁷ Angell, C. A.; Xu, W.; Yoshizawa, M.; Hayashi, A.; Belieres, J.-P. In *Ionic Liquids: The Front and Future of Material Development*; Ohno, H., Ed.; High Technol. Info.: Tokyo, 2003, pp 43–55.

³⁰⁸ Yoshizawa, M.; Xu, W.; Angell, C. A. Ionic Liquids by Proton Transfer: Vapor Pressure, Conductivity, and the Relevance of ΔpK_a from Aqueous Solutions. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (50), 15411-15419.

³⁰⁹ MacFarlane, D. R.; Forsyth, M.; Izgorodina, E. I.; Abbott, A. P.; Annat, G.; Fraser, K. On the concept of ionicity in ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2009**, *11* (25), 4962-4967.

³¹⁰ Burrell, G. L.; Burgar, I. M.; Separovic, F.; Dunlop, N. F. Preparation of protic ionic liquids with minimal water content and 15N NMR study of proton transfer. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12* (7), 1571-1577.

³¹¹ MacFarlane, D. R.; Seddon, K. R. Ionic Liquids Progress on the Fundamental Issues. *Australian Journal of Chemistry* **2007**, *60* (1), 3-5.

que la gráfica de Walden es incapaz de distinguir entre baja ionicidad en un IL, que puede surgir, por ejemplo, del emparejamiento de iones o de un bajo grado de transferencia de protones.³¹²

El grado de transferencia de protones se ha estimado utilizando valores de pK_a acuosos de ácidos y bases que proporcionan una predicción adecuada en sistemas con gran ΔpK_a . Existe una fuerte correlación entre la transferencia de protones desde el ácido a la base y la diferencia de pK_a entre los precursores ácidos y básicos. Específicamente, cálculos simples de equilibrio indican que, en solución acuosa, un $\Delta pK_a = 4$ es suficiente para producir una transferencia de protones del 99 %. No obstante, ciertos estudios demuestran que se requiere $\Delta pK_a = 10$ para asegurar una transferencia de protones suficiente para producir PILs altamente ionizados.³¹³ Otro factor a tener en cuenta, es el medio o disolvente en que se encuentra el PIL, ya que este puede desempeñar un papel importante en el intercambio de protones. Así se han demostrado grandes diferencias en los valores de pK_a de los ácidos en función del medio, lo que genera dudas sobre la validez del uso de valores de pK_a acuosos para PILs puros. Davidowski y colaboradores plantearon el concepto de usar afinidades de protones en lugar de pK_a para estimar el comportamiento de transferencia. Así, la ionicidad de una serie de PILs basados en dietilmetilamina (DEMA) fue caracterizada mediante la espectroscopia de RMN como se refleja en la Figura 1.26. Observaron una correlación entre el desplazamiento químico 1H del protón intercambiable y la acidez del ácido utilizado para la síntesis del PIL. Esto permite predecir de una manera más ajustada el comportamiento iónico de estos compuestos en comparación al empleo del ΔpK_a .³¹⁴ En general, se ha demostrado que los métodos espectroscópicos de IR y RMN son adecuados para estudiar la ionicidad, incluso en aquellos casos que el valor de ΔpK_a es relativamente pequeño.³¹⁵

³¹² Stoimenovski, J.; Izgorodina, E. I.; MacFarlane, D. R. Ionicity and proton transfer in protic ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12* (35), 10341-10347.

³¹³ Miran, M. S.; Kinoshita, H.; Yasuda, T.; Susan, M. A. B. H.; Watanabe, M. Physicochemical properties determined by ΔpK_a for protic ionic liquids based on an organic super-strong base with various Brønsted acids. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14* (15), 5178-5186.

³¹⁴ Davidowski, S. K.; Thompson, F.; Huang, W.; Hasani, M.; Amin, S. A.; Angell, C. A.; Yarger, J. L. NMR Characterization of Ionicity and Transport Properties for a Series of Diethylmethylamine Based Protic Ionic Liquids. *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, *120* (18), 4279-4285.

³¹⁵ Shen, M.; Zhang, Y.; Chen, K.; Che, S.; Yao, J.; Li, H. Ionicity of Protic Ionic Liquid: Quantitative Measurement by Spectroscopic Methods. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121* (6), 1372-1376.

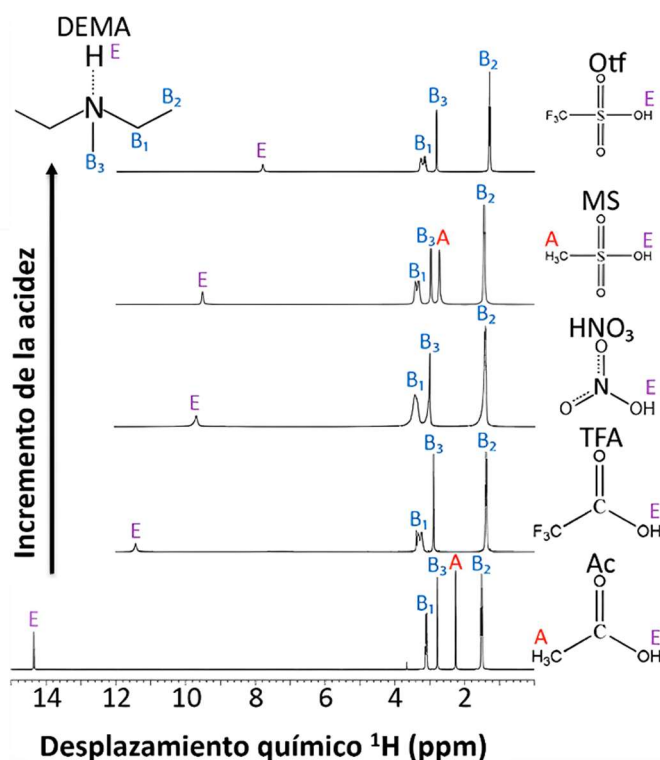


Figura 1.26. Espectros de RMN ^1H para líquidos iónicos basados en DEMA generados con varios ácidos. Los símbolos A, B y E corresponden a protones asociados con el ácido, la base y protones intercambiables, respectivamente (modificado de ref. 314).

1.4 Polímeros basados en Líquidos Iónicos

Los líquidos iónicos al ser “disolventes de diseño” permiten una amplia gama de aplicaciones,^{316,317} pero, sin embargo, son productos relativamente caros³¹⁸ y en algunos casos pueden ser tóxicos o poco biodegradables,^{319,320} provocando que puedan no ser atractivos desde el punto de vista económico y ambiental. Una solución a este problema consiste en inmovilizar los ILs en matrices sólidas, de tal forma que se combinen las ventajas de los líquidos iónicos con las del soporte.

³¹⁶ Lovelock, K. R. J. Influence of the Ionic Liquid/Gas Surface on Ionic Liquid Chemistry. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14* (15), 5071–5089.

³¹⁷ Montolio, S.; González, L.; Altava, B.; Tenhu, H.; Burguete, M. I.; García-Verdugo, E.; Luis, S.V. LCST-Type Polymers Based on Chiral-Polymeric Ionic Liquids. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (73), 10683–10686.

³¹⁸ Wilkes, J. S.; Wasserscheid, P.; Welton, T. Introduction. In *Ionic Liquids in Synthesis*; Wasserscheid, P., Welton, T., Eds.; WILEY-VCH Verlag & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2008; Vol. 1, pp 1–6.

³¹⁹ Stepnowski, P. Potential Environmental Impact of Imidazolium Ionic Liquids. In *Ionic Liquids Not Just Solvents Anymore.*; Brennecke, J. F., Rogers, R. D., Seddon, K. R., Eds.; ACS Symposium Series 975; American Chemical Society: Washington, DC., 2007; pp 10–20.

³²⁰ Jing, B.; Lan, N.; Qiu, J.; Zhu, Y. Interaction of Ionic Liquids with a Lipid Bilayer: A Biophysical Study of Ionic Liquid Cytotoxicity. *J. Phys. Chem. B.* **2016**, *120* (10), 2781–2789.

En las últimas décadas, el interés por este tipo de compuestos macromoleculares ha crecido significativamente debido a sus propiedades innovadoras. Las estructuras químicas, las estrategias sintéticas y las aplicaciones versátiles han atraído un interés creciente en una multitud de campos de la ciencia de materiales y polímeros. Existen varias metodologías alternativas para la incorporación de líquidos iónicos en estructuras poliméricas.³²¹ La preparación de polímeros basados en líquidos iónicos se logra principalmente mediante polimerización de crecimiento de cadena directa de monómeros de IL (que aquí llamaremos Pol-ILs), o mediante modificación química de polímeros preformados o precursores (que aquí, serán referenciados como SILs) como se muestra en la Figura 1.27. La ventaja de la polimerización (o policondensación) de monómeros de líquidos iónicos (ILM) consiste en la posibilidad de obtener polímeros puros libres de unidades no modificadas del precursor y copolímeros de monómeros iónicos con otros monómeros iónicos o no iónicos que pueden favorecer la conductividad global.³²²

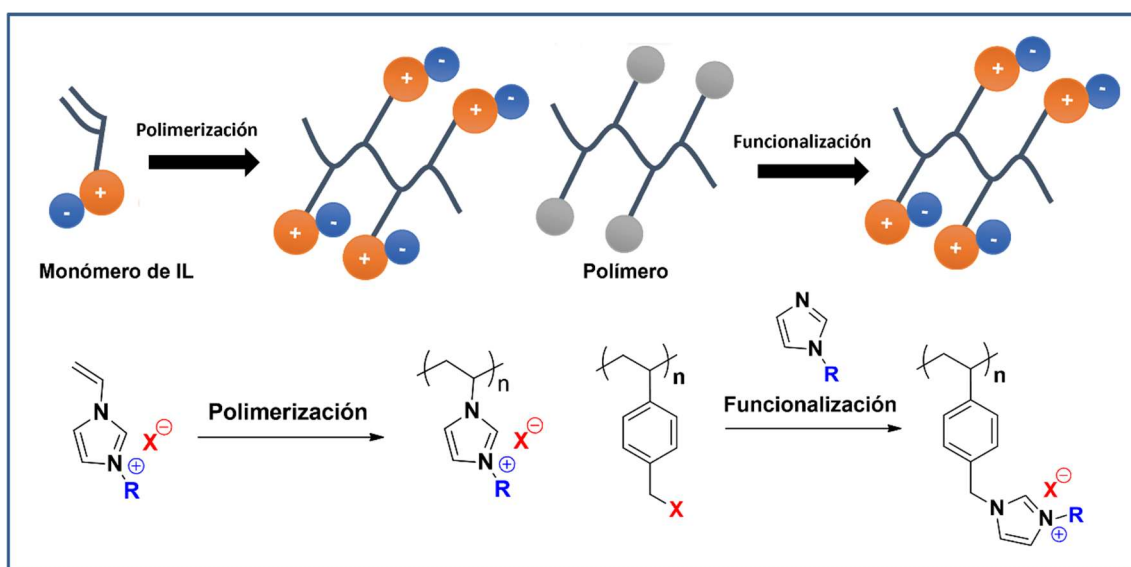


Figura 1.27. Estrategias sintéticas para la preparación de polímeros basados en ILs.

Estas dos estrategias sintéticas pueden implementarse mediante diferentes técnicas de polimerización, como la polimerización convencional libre y "controlada". Existen métodos de polimerización radicalaria controlada (CRP) que proporcionan nuevas formas de síntesis que permiten controlar eficientemente los procesos radicalarios y aumentar su

³²¹ Ohno, H. Design of Ion Conductive Polymers Based on Ionic Liquids. *Macromolecular Symposia* **2007**, 249-250 (1), 551-556.

³²² Shaplov, A. S.; Ponkratov, D. O.; Vygodskii, Y. S. Poly(ionic liquid)s: Synthesis, properties, and application. *Polymer Science Series B* **2016**, 58 (2), 73-142.

versatilidad.³²³ Los tres tipos más comunes de CRP son: polimerización mediada por nitróxido (NMP),³²⁴ polimerización por transferencia de átomos (ATRP)³²⁵ y la polimerización por fragmentación y transferencia de cadena por adición reversible (RAFT).³²⁶

El mecanismo general de polimerización vinílica implica tres etapas (ver Figura 1.28). La primera etapa, llamada iniciación, en donde se generan los radicales libres a partir del iniciador, mediante el uso de una fuente de energía (luz o calor), y seguidamente se forma el radical libre en el monómero. El segundo paso es la propagación, en donde se añaden nuevas unidades monoméricas creciendo la cadena polimérica. En esta etapa pueden participar agentes de transferencia de cadena para agregar monómeros distintos a los iniciales. El último proceso es la terminación, donde ocurren todas las reacciones de finalización de radicales posibles.³²⁷

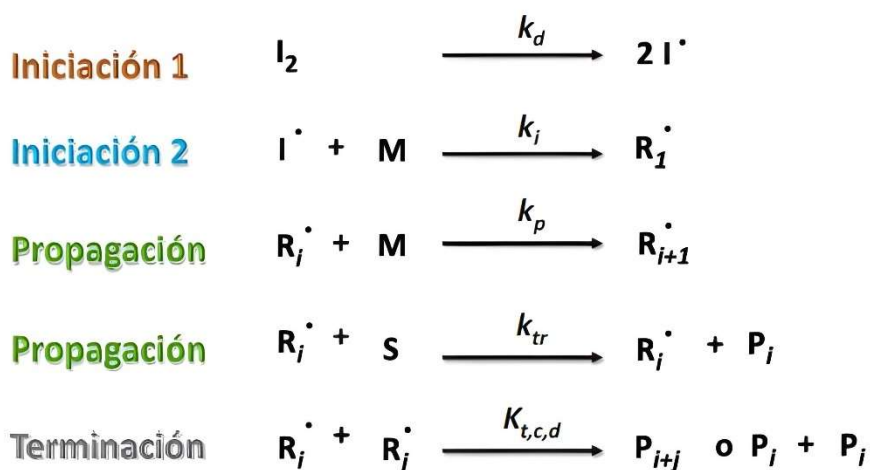


Figura 1.28. Representación general del mecanismo de polimerización por radicales libres. R_i: Radical de cadena larga, I₂: Iniciador, M: monómero, S: agente de transferencia, P: polímero (modificado de ref. 327).

³²³ Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living Radical Polymerization by the RAFT Process. *Aust. J. Chem.* **2005**, *58* (6), 379-410.

³²⁴ Rizzardo, E.; Solomon, D. H. On the Origins of Nitroxide Mediated Polymerization (NMP) and Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT)*. *Aust. J. Chem.* **2012**, *65* (8), 945-969.

³²⁵ Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules*. **2012**, *45* (10), 4015-4039.

³²⁶ Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Radical Addition-Fragmentation Chemistry in Polymer Synthesis. *Polymer*. **2008**, *49* (5), 1079-1131.

³²⁷ Odian, G. *Principles of Polymerization*, 4th ed.; John Wiley & Sons: New Jersey, 2004.

Por otro lado, la modificación posterior a la polimerización generalmente se lleva a cabo mediante reacciones de cuaternización.^{328,329,330} Además, es posible la modificación química de la superficie de un material polimérico mediante protonación³³¹ e intercambio iónico^{332,333} como otros mecanismos alternativos.

1.4.1 Líquidos Iónicos Poliméricos (Pol-ILs)

Los líquidos iónicos poliméricos (Pol-ILs) han surgido en la última década como una clase emergente de materiales en múltiples campos interdisciplinarios de investigación. Su interés se debe a la amplia gama de propiedades fisicoquímicas y la variabilidad de diseños de estructuras químicas accesibles, modificando los monómeros y la naturaleza de la cadena polimérica. Entre las propiedades cabe destacar la conductividad iónica (hasta 10^{-3} S·cm⁻¹), la estabilidad electroquímica (hasta 5V vs. Li⁺/Li⁰), la estabilidad térmica (300°C o incluso superior) y no inflamabilidad, dependiendo del tipo de par catión-anión con un comportamiento similar al de los ILs.³³⁴

Los Pol-ILs, también denominados en la literatura científica como poli (líquidos iónicos), pueden describirse como "polímeros que contienen al menos un centro iónico, similar en composición a la estructura de los ILs comúnmente utilizados, como una parte unida covalentemente de su unidad (monómero) de repetición constitucional".³³⁵ Este tipo de macromoléculas son un tipo especial de polielectrolitos, ya que al combinar las propiedades

³²⁸ Briones O, X.; Tapia, R. A.; Campodónico, P. R.; Urzúa, M.; Leiva, Á.; Contreras, R.; González-Navarrete, J. Synthesis and characterization of poly (ionic liquid) derivatives of N-alkyl quaternized poly(4-vinylpyridine). *Reactive and Functional Polymers* **2018**, *124*, 64-71.

³²⁹ Kim, D. W.; Chi, D. Y. Polymer-Supported Ionic Liquids: Imidazolium Salts as Catalysts for Nucleophilic Substitution Reactions Including Fluorinations. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43* (4), 483-485.

³³⁰ Wieszczycka, K.; Filipowiak, K.; Wojciechowska, I.; Aksamitowski, P. Novel ionic liquid-modified polymers for highly effective adsorption of heavy metals ions. *Separation and Purification Technology* **2020**, *236*, 116313.

³³¹ Karjalainen, E.; Wales, D. J.; Gunasekera, D. H. A. T.; Dupont, J.; Licence, P.; Wildman, R. D.; Sans, V. Tunable Ionic Control of Polymeric Films for Inkjet Based 3D Printing. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2018**, *6* (3), 3984-3991.

³³² Szelwicka, A.; Wolny, A.; Grymel, M.; Jurczyk, S.; Boncel, S.; Chrobok, A. Chemo-Enzymatic Baeyer-Villiger Oxidation Facilitated with Lipases Immobilized in the Supported Ionic Liquid Phase. *Materials* **2021**, *14* (13), 3443.

³³³ Marcilla, R.; Alberto Blazquez, J.; Rodriguez, J.; Pomposo, J. A.; Mecerreyes, D. Tuning the solubility of polymerized ionic liquids by simple anion-exchange reactions. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004**, *42* (1), 208-212.

³³⁴ Zhang, S.-Y.; Zhuang, Q.; Zhang, M.; Wang, H.; Gao, Z.; Sun, J.-K.; Yuan, J. Poly(ionic liquid) composites. *Chemical Society Reviews* **2020**, *49* (6), 1726-1755.

³³⁵ Shaplov, A. S.; Vlasov, P. S.; Lozinskaya, E. I.; Ponkratov, D. O.; Malyshkina, I. A.; Vidal, F.; Okatova, O. V.; Pavlov, G. M.; Wandrey, C.; Bhide, A.; et al. Polymeric Ionic Liquids: Comparison of Polycations and Polyanions. *Macromolecules* **2011**, *44* (24), 9792-9803.

novedadosas de los ILs y las características mecánicas asociadas a los polímeros,³³⁶ se logra una mayor resistencia mecánica, flexibilidad y durabilidad, así como un mejor control dimensional sobre la estructura.

Los Pol-ILs se pueden preparar utilizando un catión o anión polimerizable, lo que da como resultado un polielectrolito que posee unidades cargadas repetidas. En este sentido, pueden clasificarse como policationes que llevan un catión en la parte del esqueleto de la unidad monomérica, polianiones que llevan un anión o especies zwitteriónicas que tienen tanto anión como catión. En la Figura 1.29 se pueden observar las posibles combinaciones de aniones, polianiones, cationes, policationes y especies zwitteriónicas que se pueden realizar.

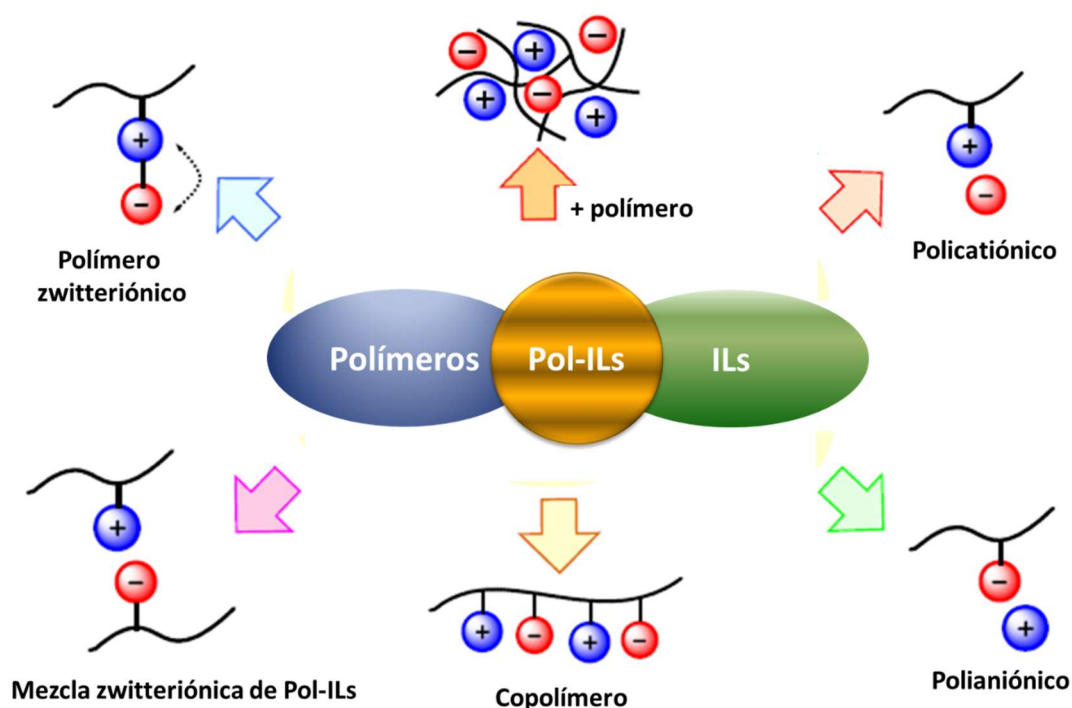


Figura 1.29. Representación de algunas disposiciones estructurales de los Pol-ILs (modificado de ref. 336).

La investigación inicial de los Pol-ILs se remonta a la década de 1970. Entre los primeros intentos, los líquidos iónicos se prepararon mediante la polimerización de radicales libres

³³⁶ Nishimura, N.; Ohno, H. 15th anniversary of polymerised ionic liquids. *Polymer* **2014**, *55* (16), 3289-3297.

de monómeros vinílicos catiónicos.^{337,338} Investigaciones posteriores han desarrollado líquidos iónicos polimerizados a base de sales de vinilimidazolio^{339,340} y vinilpiridinio.³⁴¹

Inicialmente, los Pol-ILs parecían desempeñar un papel puramente complementario hacia la amplificación de las funciones de los ILs. No obstante, su investigación ha entrado en una fase de crecimiento prolongada en la que se han descubierto recientemente muchas propiedades y aplicaciones novedosas. Una de las principales fuerzas impulsoras de su uso en lugar de utilizar un IL líquido, es porque se cree que ofrecen un medio para eliminar las desventajas conocidas de los electrolitos líquidos que incluyen fugas, inflamabilidad, toxicidad e inestabilidad.³⁴²

Vale la pena señalar que, aunque los ILs existen principalmente en un estado líquido cercano a la temperatura ambiente, los Pol-ILs suelen ser sólidos en la mayoría de los casos, salvo un par de excepciones.³⁴³ Aunque no existe una definición clara, se considera Pol-ILs a aquellos polímeros sintetizados a partir de monómeros de líquidos iónicos en oposición a los polielectrolitos sólidos. Esta nueva familia tiene propiedades físicas ajustables (como la temperatura de transición vítrea (T_g) y la solubilidad) debido a la combinación de la estructura polimérica y el contraión.³⁴⁴

A diferencia de los polielectrolitos clásicos que son solubles en agua y se disocian en soluciones acuosas, se sabe que la mayoría de los Pol-ILs son solubles en muchos tipos de disolventes orgánicos, desde polares hasta menos polares. Esto se debe principalmente al

³³⁷ Hoover, M. F. Cationic Quaternary Polyelectrolytes—A Literature Review. *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry* **1970**, *4* (6), 1327-1418.

³³⁸ Hamid, S. M.; Sherrington, D. C. Novel quaternary ammonium amphiphilic (meth)acrylates: 1. Synthesis, melting and interfacial behaviour. *Polymer* **1987**, *28* (2), 325-331.

³³⁹ Tomono, T.; Schiavone, R. J.; Overberger, C. G. Synthesis and esterolytic reactions of linear and cross-linked asymmetric imidazole-containing polymers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1987**, *25* (11), 2963-2985.

³⁴⁰ Leddet, C.; Fischer, A.; Brembilla, A.; Lochon, P. Influence of the alkyl-chain size on the amphiphilic behaviour of poly(3-alkyl-1-vinylimidazolium) bromide in aqueous medium. *Polymer Bulletin* **2001**, *46* (1), 75-82.

³⁴¹ Benjelloun, A.; Damas, C.; Brembilla, A.; Lochon, P. N-alkyl-3-vinylpyridinium salts: homopolymerization of the hexadecyl derivative and behaviour study of the polymer in aqueous media. *Polymer Bulletin* **1994**, *33* (5), 513-520.

³⁴² Green, O.; Grubjesic, S.; Lee, S.; Firestone, M. A. The Design of Polymeric Ionic Liquids for the Preparation of Functional Materials. *Polymer Reviews* **2009**, *49* (4), 339-360.

³⁴³ Ricks-Laskoski, H. L.; Snow, A. W. Synthesis and Electric Field Actuation of an Ionic Liquid Polymer. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (38), 12402-12403.

³⁴⁴ Yuan, J.; Antonietti, M. Poly(ionic liquid)s: Polymers expanding classical property profiles. *Polymer* **2011**, *52* (7), 1469-1482.

carácter hidrófobo del contraión y las interacciones coulombicas reducidas.^{345,346} Reemplazar iones inorgánicos por iones orgánicos grandes reduce las interacciones iónicas y, por lo tanto, algunos muestran un punto de fusión bajo o una temperatura de transición vítrea (T_g) lo suficientemente baja como para hacerlos visiblemente fluidos a temperatura ambiente. En otras palabras, a diferencia de los polielectrolitos sólidos, los Pol-ILs tienen propiedades líquidas/fluídicas a temperatura ambiente.³⁴⁷

Los Pol-ILs tienen una estructura diferente a la del polielectrolito común³⁴⁸ como se muestra en la Figura 1.30.²⁶⁷ En polielectrolitos comunes, los aniones opuestos son Cl^- , Br^- o I^- , mientras que los contraiones son cationes metálicos como Li^+ , Na^+ o K^+ . Los contraaniones característicos de los Pol-ILs son aniones más hidrófobos como hexafluorofosfato (PF_6^-), tetrafluoroborato (BF_4^-) y bistriflimida ($(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$). Los contraiones comunes de los Pol-ILs son cationes orgánicos tales como alquilpirrolidonio, dialquilimidazolio, alquilpiridinio y tetraalquilamonio.³⁴⁹

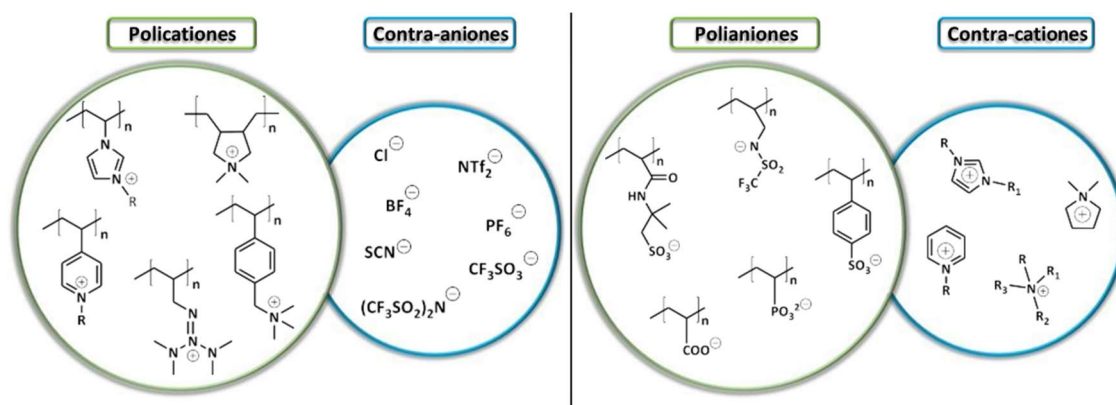


Figura 1.30. Estructuras químicas para la preparación de materiales basados en Pol-ILs (tomado de ref. 345).

De hecho, la terminología de "líquido iónico", compuestos iónicos con un punto de fusión por debajo de 100°C , no es precisa debido al umbral arbitrario y genera controversia en la definición. Esto se debe a que se pueden sintetizar polímeros similares a partir de sales orgánicas iónicas sólidas y la liquidez del monómero no tiene una influencia característica sobre los Pol-ILs resultantes. Esto limitaría los Pol-ILs a los ILs comunes de bajo punto de

³⁴⁵ Mecerreyes, D. Polymeric ionic liquids: Broadening the properties and applications of polyelectrolytes. *Progress in Polymer Science* **2011**, 36 (12), 1629-1648.

³⁴⁶ Qian, W.; Texter, J.; Yan, F. Frontiers in poly(ionic liquid)s: syntheses and applications. *Chemical Society Reviews* **2017**, 46 (4), 1124-1159.

³⁴⁷ Yuan, J.; Mecerreyes, D.; Antonietti, M. Poly(ionic liquid)s: An update. *Progress in Polymer Science* **2013**, 38 (7), 1009-1036.

³⁴⁸ Domínguez, L.; Meyer, W. H. Solid polyelectrolytes. *Solid State Ionics* **1988**, 28-30, 941-949.

³⁴⁹ Kausar, A. Research Progress in Frontiers of Poly(Ionic Liquid)s: A Review. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* **2017**, 56 (17), 1823-1838.

fusión y no es un requisito para la síntesis de ellos en absoluto. De hecho, esta clase de polímeros entra dentro de la definición de "polímero iónico" porque su rasgo característico es la ionicidad.³⁵⁰

De hecho, se trata de una gran familia de polímeros que tienen unidades iónicas en su estructura, que de alguna manera se pueden clasificar por el nivel de ionicidad. La categoría principal son los ionómeros con menos del 15 % de unidades iónicas, ya que los restos de los grupos laterales se unen covalentemente a la cadena principal del polímero.³⁵¹ Los polielectrolitos son polímeros compuestos por polianiones y policationes, que normalmente tienen más del 80 % de grupos iónicos. Los Pol-ILs son técnicamente la definición definitiva de esta clase de polielectrolitos, ya que están compuestos al 100% por iones, pero de alguna manera se revisan debido al diseño estructural para centrarse totalmente en la ionicidad.

1.4.2 Líquidos Iónicos Soportados (SILs)

Los materiales en fase líquida soportados mediante el recubrimiento de un material de soporte sólido con una fina película líquida se han investigado durante mucho tiempo. Sin embargo, un problema común en estos sistemas surge de la evaporación del líquido cargado. Una alternativa para superar esta deficiencia es mediante el uso de líquidos que no se evaporan en condiciones atmosféricas, como es el caso de líquidos iónicos soportados (SILs).³⁵² Los SILs se pueden definir como materiales obtenidos a partir de la inmovilización por anclaje covalente o adsorción física o química de ILs sobre un material de soporte como un polímero.^{353,354}

La inmovilización de los ILs en un material se lleva a cabo mediante diferentes estrategias (Figura 1.31), tales como: la encapsulación, la adsorción, la formación del par iónico y la

³⁵⁰ Eftekhari, A.; Saito, T. Synthesis and properties of polymerized ionic liquids. *European Polymer Journal* **2017**, *90*, 245-272.

³⁵¹ Gebel, G. Structural evolution of water swollen perfluorosulfonated ionomers from dry membrane to solution. *Polymer* **2000**, *41*, 5829-5838.

³⁵² Pedro, A.; Coutinho, J.; Freire, M. Immobilization of Ionic Liquids, Types of Materials, and Applications. 2019.

³⁵³ Mehnert, C. P.; Cook, R. A.; Dispenziere, N. C.; Afeworki, M. Supported Ionic Liquid Catalysis – A New Concept for Homogeneous Hydroformylation Catalysis. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (44), 12932-12933.

³⁵⁴ Riisager, A.; Eriksen, K.; Wasserscheid, P.; Fehrmann, R. Propene and 1-Octene Hydroformylation with Silica-Supported, Ionic Liquid-Phase (SILP) Rh-Phosphine Catalysts in Continuous Fixed-Bed Mode. *Catalysis Letters* **2003**, *90*, 149-153.

unión covalente. Con frecuencia esta última reduce las pérdidas por lixiviación del IL a lo largo de la reacción, además de obtener un material de fácil recuperación y reutilización.³⁵⁵

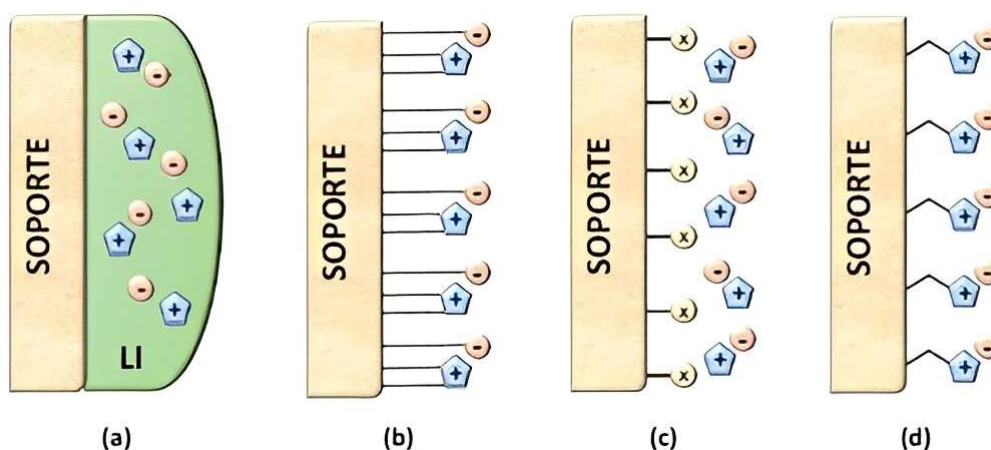


Figura 1.31. Representación esquemática de los diferentes enfoques para la inmovilización de los ILs en un soporte sólido; (a) encapsulación, (b) adsorción mediante enlaces electrostáticos, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, entre otras, (c) formación del par iónico usando un soporte funcional con carga positiva o negativa y (d) anclaje mediante enlace covalente a través del catión.

Al soportar un IL sobre una matriz sólida, las propiedades fisicoquímicas únicas de los ILs se pueden transferir al material resultante. No solo conservan las ventajas de los ILs y los soportes, sino que también obtienen una serie de nuevas propiedades novedosas debido al efecto sinérgico, mientras que también superan muchos de los aspectos negativos de los ILs convencionales (como por ejemplo, lixiviación o pobre recuperación).³⁵⁶ En general, estos sistemas permiten la reducción de la cantidad de IL utilizado en comparación a los procesos homogéneos. Desde el punto de vista de la ingeniería, estos materiales ofrecen algunas ventajas en comparación con los sistemas clásicos gas-líquido o líquido-líquido, especialmente:

- Una gran superficie suministrada por la estructura de soporte
- Propiedades solventes ajustables, por ejemplo, solubilidad
- Estabilidad térmica de la mayoría de los ILs hasta 200°C
- Inmovilización eficiente de catalizador en entornos definidos
- Aplicación de tecnología de reactores de lecho fluido o de lecho fijo

³⁵⁵ Barbaro, P.; Liguori, F. Ion Exchange Resins: Catalyst Recovery and Recycle. *Chemical Reviews* **2009**, *109* (2), 515-529.

³⁵⁶ Xin, B.; Hao, J. Imidazolium-based ionic liquids grafted on solid surfaces. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43* (20), 7171-7187.

Se han utilizado distintas aproximaciones para la preparación de SILs, dando lugar a familias muy diversas. En la aproximación inicial más sencilla, los SILs se prepararon recubriendo con una capa delgada de IL la superficie interior y/o exterior del soporte sólido, dando lugar a los denominados SILF (“Supported Ionic Liquids Film”).³⁵⁷

Posteriormente se han desarrollado otros materiales relacionados que incluyen: catalizadores basados en líquidos iónicos soportados (SILC/SILCAs),³⁵⁸ catalizadores sólidos con ILs (SCILs),³⁵⁹ catalizadores sólidos con capas de IL (SCILL),³⁶⁰ líquidos iónicos soportados con nanopartículas (SILnPs),³⁶¹ SILP-líquidos iónicos cristalinos (ILC-SILP),³⁶² SILP estructurados (SSILPs),³⁶³ líquidos iónicos poliméricos soportados (PSILs)³⁶⁴ y membranas de líquidos iónicos soportados (SILMs).³⁶⁵

El uso de diferentes nombres para establecer diferencias entre estas familias de SILs puede ser confuso. En la Figura 1.32 se representan las dos categorías simplificadas consideradas en este trabajo y que se basan en la de interacción que existe entre el IL y el soporte. Estas categorías son:

³⁵⁷ Selvam, T.; Machoke, A.; Schwieger, W. Supported ionic liquids on non-porous and porous inorganic materials—A topical review. *Applied Catalysis A: General* **2012**, *445-446*, 92-101.

³⁵⁸ Virtanen, P.; Salmi, T.; Mikkola, J.-P. Kinetics of Cinnamaldehyde Hydrogenation by Supported Ionic Liquid Catalysts (SILCA). *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2009**, *48* (23), 10335-10342.

³⁵⁹ Gu, Y.; Ogawa, C.; Kobayashi, S. Silica-Supported Sodium Sulfonate with Ionic Liquid: A Neutral Catalyst System for Michael Reactions of Indoles in Water. *Organic Letters* **2007**, *9* (2), 175-178.

³⁶⁰ Lijewski, M.; Hogg, J. M.; Swadźba-Kwaśny, M.; Wasserscheid, P.; Haumann, M. Coating of Pd/C catalysts with Lewis-acidic ionic liquids and liquid coordination complexes – SCILL induced activity enhancement in arene hydrogenation. *RSC Advances* **2017**, *7* (44), 27558-27563.

³⁶¹ Sidhpuria, K. B.; Daniel-da-Silva, A. L.; Trindade, T.; Coutinho, J. A. P. Supported ionic liquid silica nanoparticles (SILnPs) as an efficient and recyclable heterogeneous catalyst for the dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural. *Green Chemistry* **2011**, *13* (2), 340-349.

³⁶² Sobota, M.; Wang, X.; Fekete, M.; Happel, M.; Meyer, K.; Wasserscheid, P.; Laurin, M.; Libuda, J. Ordering and Phase Transitions in Ionic Liquid-Crystalline Films. *ChemPhysChem* **2010**, *11* (8), 1632-1636.

³⁶³ Ruta, M.; Yuranov, I.; Dyson, P. J.; Laurenczy, G.; Kiwi-Minsker, L. Structured fiber supports for ionic liquid-phase catalysis used in gas-phase continuous hydrogenation. *Journal of Catalysis* **2007**, *247* (2), 269-276.

³⁶⁴ Lin, Y.; Wang, F.; Zhang, Z.; Yang, J.; Wei, Y. Polymer-supported ionic liquids: Synthesis, characterization and application in fuel desulfurization. *Fuel* **2014**, *116*, 273-280.

³⁶⁵ Tomé, L. C.; Patinha, D. J. S.; Freire, C. S. R.; Rebelo, L. P. N.; Marrucho, I. M. CO₂ separation applying ionic liquid mixtures: the effect of mixing different anions on gas permeation through supported ionic liquid membranes. *RSC Advances* **2013**, *3* (30), 12220-12229.

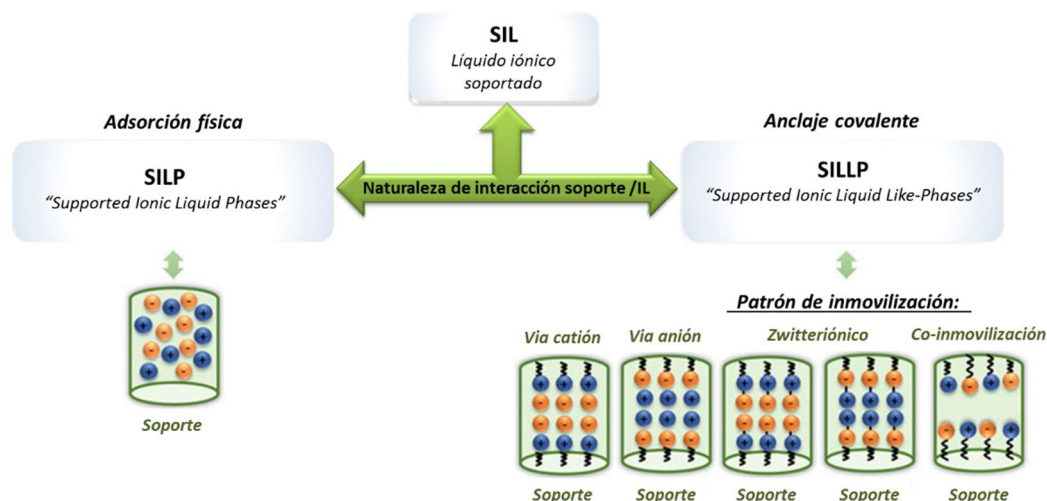


Figura 1.32. Esquema general para la preparación de materiales basados en **SILs**. Representación esquemática entre el **SILP** (derecha) que consiste en la adsorción física del IL, mientras que el **SILLP** (izquierda) se forma a través de la unión química entre el IL y el soporte sólido (modificado de ref. 352).

SILPs (“*Supported Ionic Liquid Phases*”): consisten en fases líquidas de IL adsorbidas en un soporte sólido, obteniendo una capa sencilla o múltiple de IL físicamente adsorbida en la superficie.^{366,367}

SILLPs (“*Supported Ionic Liquid Like-Phases*”): son matrices sólidas modificadas covalentemente con unidades estructurales relacionadas con los ILs. Pueden conocerse como “disolventes iónicos sólidos” o como materiales nanoestructurados con microambientes de polaridad modulable similar a los proporcionados por los ILs.³⁶⁸ En estos materiales, el líquido iónico está unido covalentemente a la matriz sólida, lo que resulta en una monocapa de IL unido covalentemente a la superficie.^{369,370}

³⁶⁶ Riisager, A.; Jørgensen, B.; Wasserscheid, P.; Fehrmann, R. First application of supported ionic liquid phase (SILP) catalysis for continuous methanol carbonylation. *Chemical Communications* **2006**, (9), 994-996.

³⁶⁷ Kukawka, R.; Pawlowska-Zygarowicz, A.; Dzialkowska, J.; Pietrowski, M.; Maciejewski, H.; Bica, K.; Smiglak, M. Highly Effective Supported Ionic Liquid-Phase (SILP) Catalysts: Characterization and Application to the Hydrosilylation Reaction. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2019**, 7 (5), 4699-4706.

³⁶⁸ Sans, V.; Karbass, N.; Burguete, M. I.; Compañ, V.; García-Verdugo, E.; Luis, S. V.; Pawlak, M. Polymer-Supported Ionic-Liquid-Like Phases (SILLPs): Transferring Ionic Liquid Properties to Polymeric Matrices. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17 (6), 1894-1906.

³⁶⁹ Sans, V.; Gelat, F.; Karbass, N.; Burguete, M. I.; García-Verdugo, E.; Luis, S. V. Polymer Cocktail: A Multitask Supported Ionic Liquid-Like Species to Facilitate Multiple and Consecutive C-C Coupling Reactions. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2010**, 352 (17), 3013-3021.

³⁷⁰ Peris, E.; Porcar, R.; Macia, M.; Alcázar, J.; García-Verdugo, E.; Luis, S. V. *Beilstein J. Org. Chem.* **2020**, 16, 1924-1935.

Tabla 1.7. Resumen de características, ventajas y desventajas de los SILs, según el tipo de interacción IL-soporte.

| Naturaleza de la interacción IL-soporte | | |
|--|--|---|
| | <i>Quimisorción o adsorción por reacción química</i> | <i>Fisorción o adsorción física</i> |
| Ensamblaje | Normalmente monocapa | Multicapa |
| Propiedades de ILs | Se pierden | Se mantienen |
| Carga de IL | Baja | Elevada |
| Métodos de preparación | Reacción (condensación, alquilación, polimerización, sustitución nucleofílica, química click “tiol-eno”) Síntesis tradicional sol-gel | Impregnación |
| Ventajas | Lixiviación de IL minimizada | Se puede eliminar el IL Reciclado del material Modulación de las propiedades del IL confinado |
| Desventajas | Pretratamiento de material inerte Largo y costoso proceso de preparación | Elevada lixiviación de IL |

La modificación “personalizada” de los SILPs permite obtener materiales altamente uniformes con propiedades bien definidas. Sin embargo, una de las desventajas es la tasa de lixiviación del IL por la unión no covalente, por lo que los SILPs se usan preferente en combinación con fases gaseosas en lugar con fases líquidas.^{371,372} Esta desventaja está ausente cuando la fase de líquido iónico se encuentra anclada covalentemente al soporte, tal como ocurre en los SILLPs. Sin embargo, el proceso de preparación de los materiales puede ser más largo y costoso. Las principales características, ventajas y desventajas de los sistemas SILP y SILLP³⁷³ se resumen en la Tabla 1.7. En esta memoria se describe mayoritariamente el trabajo con SILLPs, los cuales serán referenciados como SILs.

³⁷¹ Kolding, H.; Fehrmann, R.; Riisager, A. CO₂ Capture technologies: Current status and new directions using supported ionic liquid phase (SILP) absorbers. *Science China Chemistry* **2012**, *55* (8), 1648-1656.

³⁷² Khokarale, S. G.; García-Suárez, E. J.; Fehrmann, R.; Riisager, A. Highly Selective Continuous Gas-Phase Methoxycarbonylation of Ethylene with Supported Ionic Liquid Phase (SILP) Catalysts. *ChemCatChem* **2017**, *9* (10), 1824-1829.

³⁷³ Zhang, S.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Deng, Y. Nanoconfined Ionic Liquids. *Chemical Reviews* **2017**, *117* (10), 6755-6833.

1.5 Aplicaciones de ILs en indicadores, sensores de gases y biosensores

La utilización de ILs en relación con indicadores colorimétricos no es muy extensa en la bibliografía. Sin embargo, se pueden encontrar líquido iónicos combinados con indicadores de pH como morado de m-cresol,³⁷⁴ azul de timol³⁷⁵ o azul de bromotimol³⁷⁶ para la detección de CO₂. Para el desarrollo de indicadores de CO₂, se ha utilizado también la impresión inkjet.³⁷⁷ En cuanto a la detección de amoníaco, hay algunos ejemplos basados en polímeros en combinación con NQS³⁷⁸ y antocianina³⁷⁹ como colorante natural. Finalmente, se puede encontrar el uso de poliacetileno de carácter iónico para detección de CO₂³⁸⁰ o humedad,³⁸¹ así como combinación de otros polímeros iónicos para humedad.³⁸² Algunos de estos ejemplos se ilustran en la Figura 1.33.

³⁷⁴ Perez de Vargas-Sansalvador, I. M.; Erenas, M. M.; Diamond, D.; Quilty, B.; Capitan-Vallvey, L. F. Water based-ionic liquid carbon dioxide sensor for applications in the food industry. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *253*, 302-309.

³⁷⁵ Borisov, S. M.; Waldhier, M. C.; Klimant, I.; Wolfbeis, O. S. Optical Carbon Dioxide Sensors Based on Silicone-Encapsulated Room-Temperature Ionic Liquids. *Chemistry of Materials* **2007**, *19* (25), 6187-6194.

³⁷⁶ Oter, O.; Ertekin, K.; Topkaya, D.; Alp, S. Room temperature ionic liquids as optical sensor matrix materials for gaseous and dissolved CO₂. *Sensors and Actuators B-chemical - SENSOR ACTUATOR B-CHEM* **2006**, *117*, 295-301.

³⁷⁷ Zhang, Y.; Lim, L.-T. Inkjet-printed CO₂ colorimetric indicators. *Talanta* **2016**, *161*, 105-113.

³⁷⁸ Ballester-Caudet, A.; Hakobyan, L.; Moliner-Martinez, Y.; Molins-Legua, C.; Campíns-Falcó, P. Ionic-liquid doped polymeric composite as passive colorimetric sensor for meat freshness as a use case. *Talanta*, **2021**, *223*, 121778.

³⁷⁹ Meng, Y.; Luo, H.; Dong, C.; Zhang, C.; He, Z.; Long, Z.; Cha, R. Hydroxypropyl Guar/Cellulose Nanocrystal Film with Ionic Liquid and Anthocyanin for Real-Time and Visual Detection of NH₃. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2020**, *8* (26), 9731-9741.

³⁸⁰ Xu, Q.; Lee, S.; Cho, Y.; Kim, M. H.; Bouffard, J.; Yoon, J. Polydiacetylene-Based Colorimetric and Fluorescent Chemosensor for the Detection of Carbon Dioxide. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (47), 17751-17754.

³⁸¹ Mergu, N.; Kim, H.; Ryu, J.; Son, Y.-A. A simple and fast responsive colorimetric moisture sensor based on symmetrical conjugated polymer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2020**, *311*, 127906.

³⁸² Yu, L.; Xu, H.; Monro, T. M.; Lancaster, D. G.; Xie, Y.; Zeng, H.; Chen, G. Y.; Liu, X. Ultrafast colorimetric humidity-sensitive polyelectrolyte coating for touchless control. *Materials Horizons* **2017**, *4* (1), 72-82.

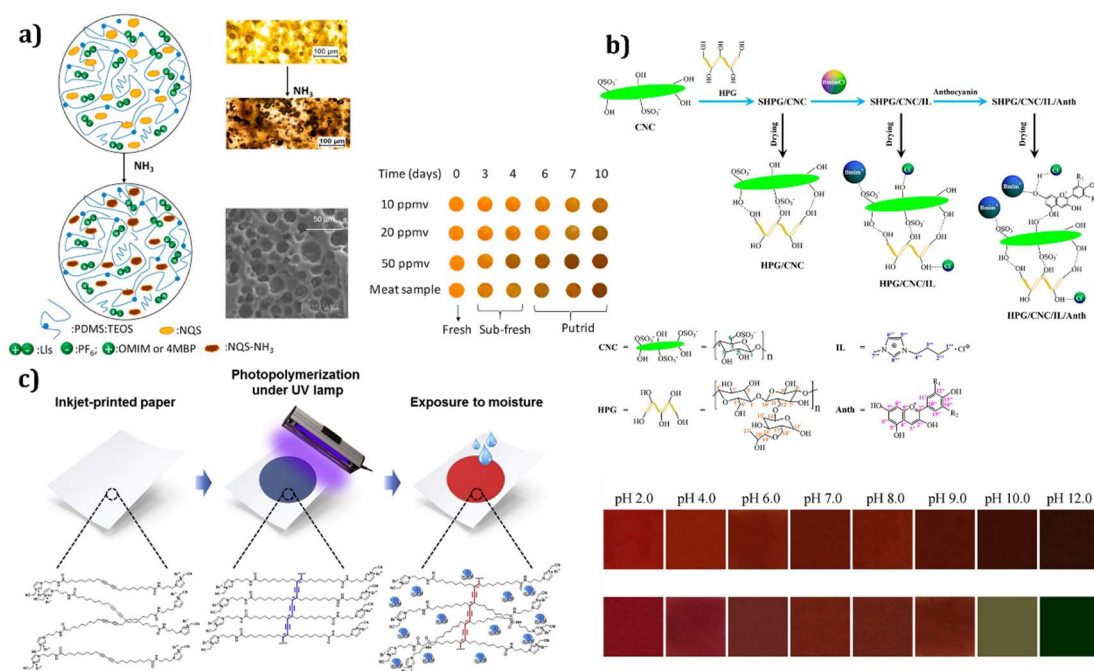


Figura 1.33. Indicadores colorimétricos en presencia de ILs (tomados de ref. 378, 379 y 381).

Debido a las propiedades electroquímicas únicas de los ILs y la posibilidad de modificar ciertos parámetros fisicoquímicos y biológicos, existe un interés creciente en la aplicación de sensores y biosensores.³⁸³ La selección de un transductor adecuado está directamente relacionada con las características de un IL, ya que influye tanto en la estabilidad como la eficacia.

En la literatura, se pueden encontrar numerosos trabajos que describen sensores de gases electroquímicos basados en ILs. Para la detección de O₂, hay sensores amperométricos desarrollados con electrodos de Pt y Au basados en líquidos iónicos como BMiMNTf₂ en presencia de un IL de la antraquinona³⁸⁴, polímero dopado con EMiMNTf₂³⁸⁵ o EMiMBF₄,³⁸⁶ así como estudios con familias de ILs derivados del anión NTf₂⁻.^{387,388} De manera excepcional,

³⁸³ Stevenson, K. J. *Electrochemical Aspects of Ionic Liquids* Edited by Hiroyuki Ohno (Tokyo University of Agriculture and Technology). John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ. 2005.

³⁸⁴ Toniolo, R.; Dossi, N.; Pizzariello, A.; Doherty, A.; Susmel, S.; Bontempelli, G. An oxygen amperometric gas sensor based on its electrocatalytic reduction in room temperature ionic liquids. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2012**, *670*, 23–29.

³⁸⁵ Lee, J.; Silvester, D. S. Low-cost microarray thin-film electrodes with ionic liquid gel-polymer electrolytes for miniaturised oxygen sensing. *Analyst* **2016**, *141* (12), 3705–3713.

³⁸⁶ Wang, R.; Okajima, T.; Kitamura, F.; Ohsaka, T. A Novel Amperometric O₂ Gas Sensor Based on Supported Room-Temperature Ionic Liquid Porous Polyethylene Membrane-Coated Electrodes. *Electroanalysis* **2004**, *16* (1-2), 66–72.

³⁸⁷ Wang, Z.; Lin, P.; Baker, G. A.; Stetter, J.; Zeng, X. Ionic Liquids as Electrolytes for the Development of a Robust Amperometric Oxygen Sensor. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (18), 7066–7073.

³⁸⁸ Shen, X.; Chen, X.; Liu, J.-H.; Huang, X.-J. Free standing Pt–Au bimetallic membranes with a leaf-like nanostructure from agarose-mediated electrodeposition and oxygen gas sensing in room temperature ionic liquids. *Journal of Materials Chemistry* **2009**, *19* (41), 7687–7693.

se encuentra un sensor dual de CH₄-O₂ basado en BmpyNTf₂.³⁸⁹ En la Figura 1.34 se muestran ejemplos de aplicaciones de ILs para detección de O₂.

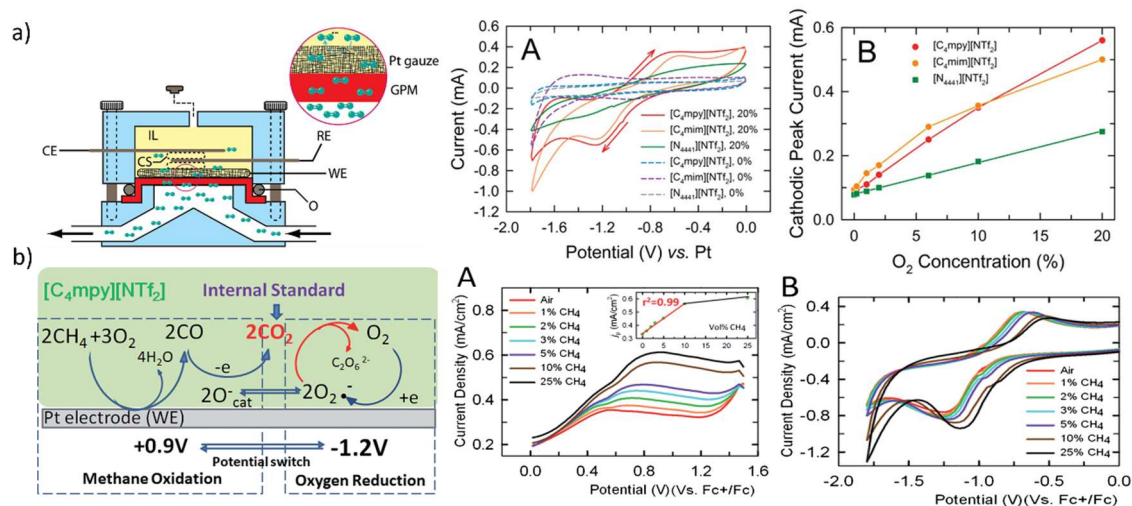


Figura 1.34. Detección de O₂ basada en (a) IL derivado del anión NTf₂⁻ y (b) detección dual con CH₄ empleando BmpyNTf₂ (tomados de ref. 387 y 389).

En la mayoría de los casos, los sensores basados en IL para la detección de CO₂ son sensores ópticos fluorescentes. Así por ejemplo, algunos ILs derivados de grupos funcionales como carbamatos,^{390,391} o amidinas³⁹² se han referenciado como sensores de CO₂. Del mismo modo, hay líquidos iónicos derivados del anión de la piranina fluorescente (HPTS) en forma de par iónico.^{393,394,395} De manera escasa, se encuentran sensores electroquímicos basados

³⁸⁹ Wang, Z.; Guo, M.; Baker, G. A.; Stetter, J. R.; Lin, L.; Mason, A. J.; Zeng, X. Methane-oxygen electrochemical coupling in an ionic liquid: a robust sensor for simultaneous quantification. *Analyt* **2014**, *139* (20), 5140-5147.

³⁹⁰ Pandey, S.; Baker, S. N.; Pandey, S.; Baker, G. A. Optically responsive switchable ionic liquid for internally-referenced fluorescence monitoring and visual determination of carbon dioxide. *Chemical Communications* **2012**, *48* (56), 7043-7045.

³⁹¹ Liu, Y.; Tang, Y.; Barashkov, N. N.; Irgibaeva, I. S.; Lam, J. W. Y.; Hu, R.; Birimzhanova, D.; Yu, Y.; Tang, B. Z. Fluorescent Chemosensor for Detection and Quantitation of Carbon Dioxide Gas. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (40), 13951-13953.

³⁹² Tian, T.; Chen, X.; Li, H.; Wang, Y.; Guo, L.; Jiang, L. Amidine-based fluorescent chemosensor with high applicability for detection of CO₂: A facile way to "see" CO₂. *Analyt* **2013**, *138* (4), 991-994.

³⁹³ Oter, O.; Ertekin, K.; Derinkuyu, S. Ratiometric sensing of CO₂ in ionic liquid modified ethyl cellulose matrix. *Talanta* **2008**, *76* (3), 557-563.

³⁹⁴ Oter, O.; Ertekin, K.; Topkaya, D.; Alp, S. Emission-based optical carbon dioxide sensing with HPTS in green chemistry reagents: room-temperature ionic liquids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *386* (5), 1225-1234.

³⁹⁵ Aydogdu, S.; Ertekin, K.; Suslu, A.; Ozdemir, M.; Celik, E.; Cocen, U. Optical CO₂ Sensing with Ionic Liquid Doped Electrospun Nanofibers. *Journal of Fluorescence* **2011**, *21* (2), 607-613.

en ILs como BMiMOAc,³⁹⁶ EMiMDCA³⁹⁷ o derivados fluorados,³⁹⁸ y Pol-ILs o líquidos iónicos poliméricos derivados de imidazolio^{399,400} o amonio.⁴⁰¹ En la Figura 1.35 se muestran ejemplos de aplicaciones de ILs para detección de CO₂.

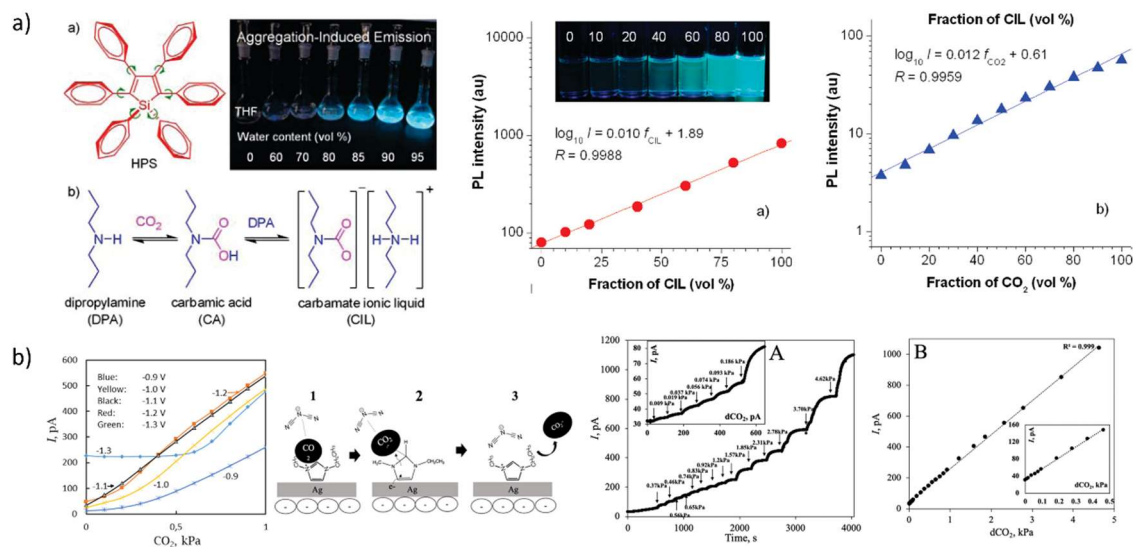


Figura 1.35. (a) Detección fluorescente de CO₂ con IL derivado de carbamato y (b) detección amperométrica basada en EMiMDCA (tomados de ref. 391 y 397).

La literatura es escasa para el desarrollo de sensores en la detección de otros gases. En el caso de NH₃, hay sensores amperométricos basados en ILs (como BMiMNTf₂⁴⁰² o EMiMNTf₂⁴⁰³)

³⁹⁶ Barrosse-Antle, L. E.; Compton, R. G. Reduction of carbon dioxide in 1-butyl-3-methylimidazolium acetate. *Chemical Communications* **2009**, (25), 3744-3746.

³⁹⁷ Fapyane, D.; Revsbech, N. P. Fast Responding Amperometric CO₂ Microsensor with Ionic Liquid-Aprotic Solvent Electrolytes. *ACS Sensors* **2020**, 5 (8), 2604-2610.

³⁹⁸ Graef, E.; Jagannath, B.; Munje, R.; Prasad, S. Fluorinated Anionic Room Temperature Ionic Liquid-Based CO₂ Electrochemical Sensing. *IEEE Sensors Journal* **2018**, PP, 1-1.

³⁹⁹ Li, Y.; Li, G.; Wang, X.; Zhu, Z.; Ma, H.; Zhang, T.; Jin, J. Poly(ionic liquid)-wrapped single-walled carbon nanotubes for sub-ppb detection of CO₂. *Chemical Communications* **2012**, 48 (66), 8222-8224.

⁴⁰⁰ Wu, J.; Yin, M.-j.; Seefeldt, K.; Dani, A.; Guterman, R.; Yuan, J.; Zhang, A. P.; Tam, H.-Y. In situ μ -printed optical fiber-tip CO₂ sensor using a photocrosslinkable poly(ionic liquid). *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, 259, 833-839.

⁴⁰¹ Willa, C.; Yuan, J.; Niederberger, M.; Koziej, D. When Nanoparticles Meet Poly(Ionic Liquid)s: Chemosensitive CO₂ Sensing at Room Temperature. *Advanced Functional Materials* **2015**, 25 (17), 2537-2542.

⁴⁰² Toniolo, R.; Dossi, N.; Svegli, R.; Susmel, S.; Casella, I.; Bontempelli, G. Amperometric Sniffer for Volatile Amines Based on Paper-Supported Room Temperature Ionic Liquids Enabling Rapid Assessment of Fish Spoilage. *Electroanalysis* **2014**, 26, 1966-1974.

⁴⁰³ Murugappan, K.; Lee, J.; Silvester, D. S. Comparative study of screen printed electrodes for ammonia gas sensing in ionic liquids. *Electrochemistry Communications* **2011**, 13 (12), 1435-1438.

o Pol-ILs,⁴⁰⁴ así como sensores ópticos basados en electroluminiscencia⁴⁰⁵ o fluorescencia.⁴⁰⁶ Por otro lado, se reportan sensores electroquímicos para C₂H₄⁴⁰⁷ y H₂S.⁴⁰⁸

La combinación de ILs y nanomateriales de carbono (CNM) da como resultado materiales híbridos con propiedades químicas y electroquímicas de superficie considerablemente mejoradas. De este modo, la funcionalización o modificación con nanopartículas metálicas o enzimas ofrece una gran plataforma para la construcción de dispositivos como sensores.⁴⁰⁹ En este sentido, se han reportado varios biosensores y sensores no enzimáticos para la detección de glucosa como se muestra en la Figura 1.36. Los biosensores están basados en la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa (GOx). Por ejemplo, hay biosensores electroquímicos de ILs basados en aniones fluorados con grafeno,⁴¹⁰ nanotubos SWCNT⁴¹¹ o polímero,⁴¹² así como Pol-ILs con Pt⁴¹³ o grafeno.⁴¹⁴ Por otro lado, los sensores no enzimáticos o químicos se basan en materiales híbridos dopados con metales como

⁴⁰⁴ Lee, J.; Hussain, G.; López-Salas, N.; MacFarlane, D. R.; Silvester, D. S. Thin films of poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene)-ionic liquid mixtures as amperometric gas sensing materials for oxygen and ammonia. *Analyst* **2020**, *145* (5), 1915-1924.

⁴⁰⁵ Chen, L.; Huang, D.; Zhang, Y.; Dong, T.; Zhou, C.; Ren, S.; Chi, Y.; Chen, G. Ultrasensitive gaseous NH₃ sensor based on ionic liquid-mediated signal-on electrochemiluminescence. *Analyst* **2012**, *137* (15), 3514-3519.

⁴⁰⁶ Yung, K. Y.; Schadock-Hewitt, A.; Hunter, N.; Bright, F.; Baker, G. 'Liquid litmus': Chemosensory pH-responsive photonic ionic liquids. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2011**, *47*, 4775-4777.

⁴⁰⁷ Zevenbergen, M. A. G.; Wouters, D.; Dam, V.-A. T.; Brongersma, S. H.; Crego-Calama, M. Electrochemical Sensing of Ethylene Employing a Thin Ionic-Liquid Layer. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (16), 6300-6307.

⁴⁰⁸ O'Mahony, A.; Compton, R. The Mediated Detection of Hydrogen Sulfide in Room Temperature Ionic Liquids. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 2313-2322.

⁴⁰⁹ Ranjan, P.; Yadav, S.; Sadique, M. A.; Khan, R.; Chaurasia, J. P.; Srivastava, A. K. Functional Ionic Liquids Decorated Carbon Hybrid Nanomaterials for the Electrochemical Biosensors. *Biosensors* **2021**, *11* (11), 414.

⁴¹⁰ Manoj, D.; Theyagarajan, K.; Saravanakumar, D.; Senthilkumar, S.; Thenmozhi, K. Aldehyde functionalized ionic liquid on electrochemically reduced graphene oxide as a versatile platform for covalent immobilization of biomolecules and biosensing. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *103*, 104-112.

⁴¹¹ Zhang, Y.; Shen, Y.; Li, J.; Niu, L.; Dong, S.; Ivaska, A. Electrochemical Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes in Large Quantities at a Room-Temperature Ionic Liquid Supported Three-Dimensional Network Electrode. *Langmuir* **2005**, *21* (11), 4797-4800.

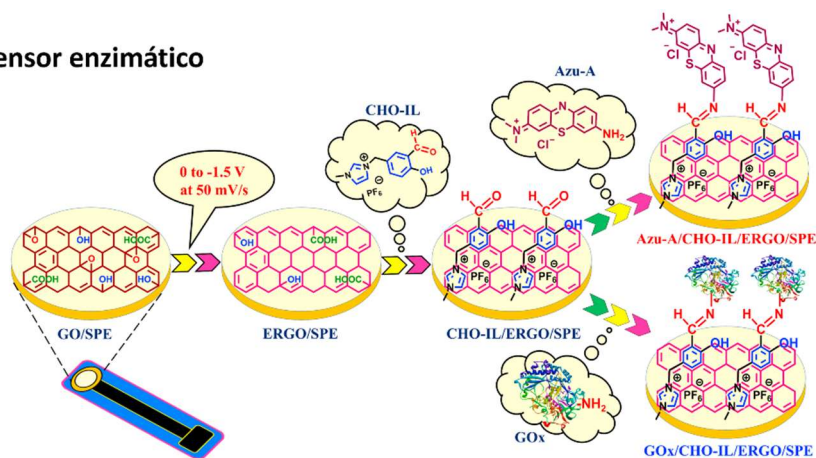
⁴¹² Chen, X.; Zhu, J.; Tian, R.; Yao, C. Bionzymatic glucose biosensor based on three dimensional macroporous ionic liquid doped sol-gel organic-inorganic composite. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, *163* (1), 272-280.

⁴¹³ López, M. S.-P.; Mecerreyes, D.; López-Cabarcos, E.; López-Ruiz, B. Amperometric glucose biosensor based on polymerized ionic liquid microparticles. *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, *21* (12), 2320-2328.

⁴¹⁴ Shan, C.; Yang, H.; Song, J.; Han, D.; Ivaska, A.; Niu, L. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on Graphene. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (6), 2378-2382.

Co,^{415,416} Cu,⁴¹⁷ Ni^{418,419} o Pt⁴²⁰ que generan una respuesta electroquímica a partir de una reacción de oxidación-reducción con la glucosa.

Biosensor o sensor enzimático



Sensor químico o no enzimático

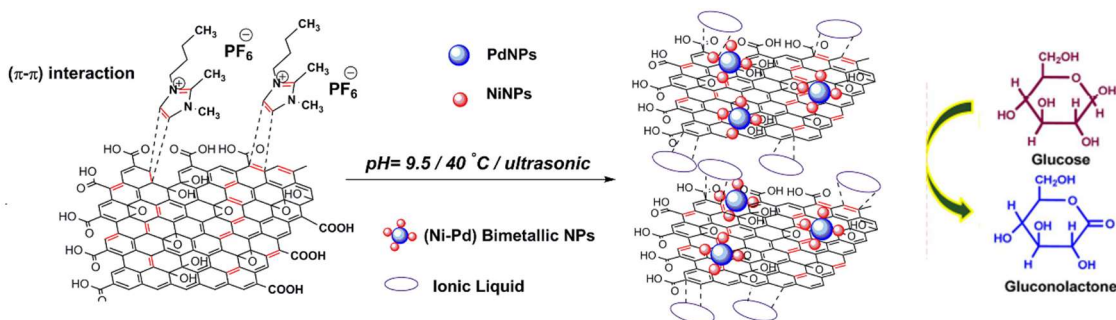


Figura 1.36. Tipos de sensores basados en líquidos iónicos para la detección de glucosa (tomado de referencia 410 y 419).

⁴¹⁵ Benjamin, M.; Manoj, D.; Thenmozhi, K.; Bhagat, P. R.; Saravanakumar, D.; Senthilkumar, S. A bioinspired ionic liquid tagged cobalt-salophen complex for nonenzymatic detection of glucose. *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *91*, 380-387.

⁴¹⁶ Chaiyo, S.; Mehmeti, E.; Siangproh, W.; Hoang, T. L.; Nguyen, H. P.; Chailapakul, O.; Kalcher, K. Non-enzymatic electrochemical detection of glucose with a disposable paper-based sensor using a cobalt phthalocyanine-ionic liquid-graphene composite. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *102*, 113-120.

⁴¹⁷ Janmee, N.; Preechasedkit, P.; Rodthongkum, N.; Chailapakul, O.; Potiyaraj, P.; Ruecha, N. A non-enzymatic disposable electrochemical sensor based on surface-modified screen-printed electrode CuO-IL/rGO nanocomposite for a single-step determination of glucose in human urine and electrolyte drinks. *Analytical Methods* **2021**, *13* (25), 2796-2803.

⁴¹⁸ Safavi, A.; Maleki, N.; Farjami, E. Fabrication of a glucose sensor based on a novel nanocomposite electrode. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24* (6), 1655-1660.

⁴¹⁹ Naeim, H.; Kheiri, F.; Sirosazar, M.; Afghan, A. Ionic liquid/reduced graphene oxide/nickel-palladium nanoparticle hybrid synthesized for non-enzymatic electrochemical glucose sensing. *Electrochimica Acta* **2018**, *282*, 137-146.

⁴²⁰ Xiao, F.; Zhao, F.; Mei, D.; Mo, Z.; Zeng, B. Nonenzymatic glucose sensor based on ultrasonic-electrodeposition of bimetallic PtM (M=Ru, Pd and Au) nanoparticles on carbon nanotubes-ionic liquid composite film. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24* (12), 3481-3486.

CAPÍTULO II

Objetivos

2 Capítulo II. Objetivos

De acuerdo con el contexto descrito en el capítulo de introducción, el objetivo general de trabajo de la presente Tesis Doctoral se sitúa en el desarrollo de nuevos materiales inteligentes basados en líquidos iónicos y su aplicación como sistemas de detección dentro del contexto de seguridad en la industria alimentaria.

En este contexto, los objetivos específicos propuestos pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Diseñar y desarrollar nuevos sistemas inteligentes mediante la combinación de materiales avanzados basados en la naturaleza de los líquidos iónicos y componentes adicionales tales como sondas colorimétricas sensibles al pH que les proporcionen las características necesarias para la detección de los analitos seleccionados.
- Desarrollar metodologías que permitan la preparación y desarrollo de nuevos materiales avanzados mediante técnicas como la polimerización en casting y la impresión en 3D.
- Evaluación de la sensibilidad y respuesta de los sistemas inteligentes desarrollados mediante pruebas analíticas en el entorno de laboratorio y en muestras reales para la monitorización *in situ*.

CAPÍTULO III

Detección de proteínas

3 Capítulo III. Detección de proteínas

Cabe destacar que por motivos de confidencialidad y para salvaguardar los intereses de la empresa, dado que este documento va a estar en posesión de personal ajeno a Proyecto Kryptonita S.L, en este apartado no se incluirá toda la información del trabajo realizado, como por ejemplo no se revelarán cuáles son las sondas colorimétricas o no se detallará por completo el procedimiento para la puesta a punto de los sistemas de detección.

3.1 Prueba de concepto para detección de proteínas

Gran parte de los alérgenos más comunes consisten en una proteína o un conjunto de ellas, como, por ejemplo, el gluten de los cereales, el ovomucoide o la albúmina del huevo, las caseínas de la leche, las proteínas de la soja, la parvalbúmina del pescado, etc. Por tanto, el objetivo establecido fue desarrollar un sistema inteligente capaz de detectar la presencia o ausencia de proteínas en superficie. El objetivo era el desarrollo de un sistema sencillo y económicamente viable para su empleo como sistema de detección colorimétrica para la validación mediante una respuesta positiva/negativa de los protocolos de limpieza establecidos en la industria alimentaria.

A partir del estado del arte en empleo de sensores colorimétricos y en estudios preliminares en solución, se seleccionó una sonda colorimétrica en combinación con una serie de aditivos y excipientes para el desarrollo de una formulación que fuera capaz de realizar la detección de proteínas. Una vez lograda la optimización de una formulación sensible a la presencia de proteínas, se procedió al diseño y desarrollo del tejido inteligente basado en este sistema. Los tejidos fueron obtenidos mediante un proceso de tinción controlada. En este proceso, la selección de un material adecuado fue clave para la preparación del sistema. Una vez teñido y tras un proceso de secado, los nuevos tejidos inteligentes fueron evaluados para estudiar si mostraban el mismo comportamiento y la misma respuesta que los observados para el sistema en disolución. La proteína de albúmina o suero bovino (BSA) fue utilizada en los estudios como proteína de referencia para evaluar la respuesta del sistema desarrollado. Como se observa en la Figura 3.1, el sistema no cambia de color y la respuesta es negativa en ausencia de proteína, mientras que el sistema cambia de color (de amarillo a azul) dando una respuesta positiva en presencia de esta. Del mismo modo, se estudió la respuesta en muestras reales como leche de vaca obteniéndose una respuesta positiva como cabría esperar.

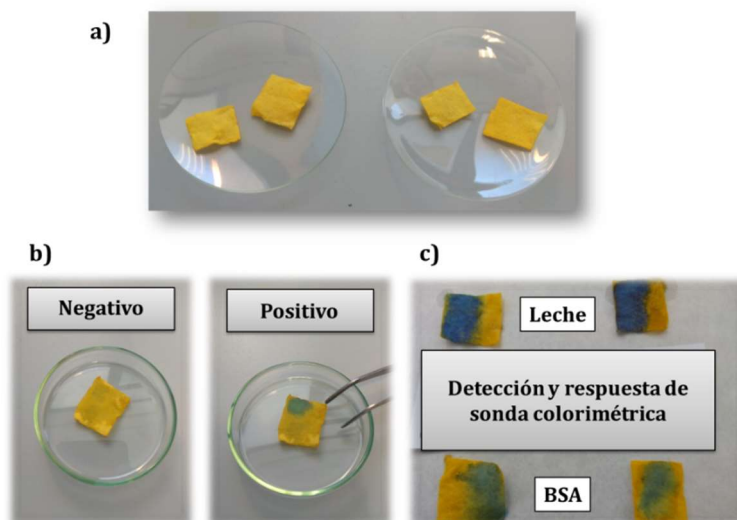


Figura 3.1. (a) Tejido inteligente con la sonda colorimétrica, (b) Respuesta del tejido inteligente en ausencia (negativo) y presencia (positivo) de proteína y (c) Respuesta en presencia de leche y BSA.

3.2 Evaluación del análisis en sistemas reales

Con el fin de evaluar la detección en superficie teniendo en cuenta las necesidades del mercado y de la industria alimentaria, las pruebas iniciales en el laboratorio consistieron en estudiar el comportamiento de los tejidos al ponerlos en contacto sobre una superficie contaminada con proteína BSA o leche (cuya etiqueta indicaba que contenía proteínas). Dicha superficie podría considerarse como un modelo de las mesas de trabajo y cintas en donde se manipulan los alimentos. En la Figura 3.2, se observa que el tejido inteligente, el cual inicialmente presenta un color amarillo, cambia su color después de ser expuesto al contacto con la superficie, contaminada previamente, indicando así una respuesta positiva que indica la contaminación de la superficie. Tras realizar estas pruebas iniciales de detección en superficie, se concluyó que el sistema inteligente presentaba respuesta rápida y que el cambio de coloración era apreciable para la detección visual.

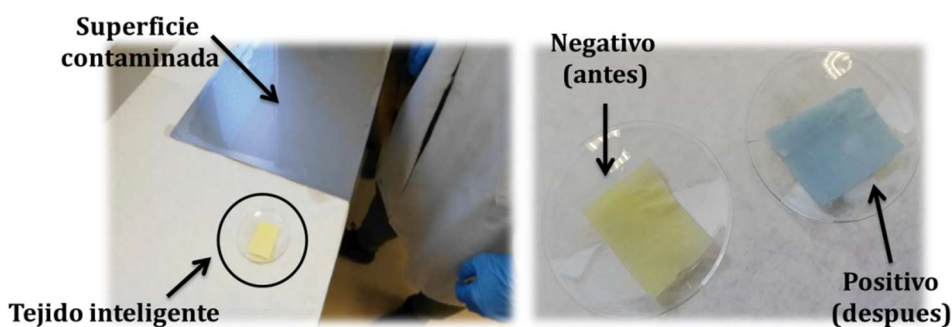


Figura 3.2. Evaluación de la respuesta del tejido inteligente en superficie contaminada de proteínas.

3.3 Pruebas de campo en la industria

El siguiente paso fue la realización de diversas pruebas de campo en instalaciones industriales, para evaluar la efectividad de los tejidos inteligentes en un entorno real. Dichas pruebas se llevaron a cabo en la empresa “Comercial Logística Calamocha”, especializada en el deshuesado de paletas y jamones, y en el loncheado de jamones, paletas y lomos.

En primer lugar, se visitó la sala de deshuesado y empaquetado donde se había finalizado el proceso de producción, pero aún no se había realizado la limpieza de las instalaciones. De este modo, la zona de trabajo en estas condiciones estaba contaminada. Las instalaciones consistían en un gran almacén con diferentes secciones de procesado para el deshuesado y envasado de los embutidos donde las superficies de estudio fueron las cintas de transporte y las planchas metálicas donde los operarios realizan sus tareas.

Durante las pruebas de campo, se evaluaron dos metodologías alternativas para el empleo del sistema de detección: tejido inteligente teñido y la aplicación directa de la solución por “spray”. El objetivo inicial de este estudio era evaluar ambos sistemas de aplicación para comparar su eficiencia en condiciones de trabajo en un entorno real y, a posteriori, hacer un balance en términos de eficiencia y costes. Como se observa en la Figura 3.3, los primeros análisis se realizaron usando el tejido inteligente que se aplicó sobre la cinta transportadora. En este ensayo, se analizaron diversos puntos de esta parte de las instalaciones mientras la cinta transportadora se encontraba en funcionamiento. En general, se observó un cambio de color con mayor contraste en los puntos donde se ejercía un mayor contacto con la mano (sobre todo, la punta de los dedos), por lo que el tejido inteligente respondió al contacto directo con el alérgeno. Del mismo modo, se analizaron las planchas metálicas humedeciendo el tejido inteligente con agua y pasando el mismo a modo de bayeta sobre la superficie de análisis dando positivo en la presencia del alérgeno por la

aparición del color azul en el tejido inteligente. En resumen, los resultados obtenidos demostraron que el tejido inteligente en un entorno real muestra el mismo comportamiento que en las pruebas previas realizadas en entorno controlado como es el laboratorio validando la potencial utilidad de este sistema.

• **Detección mediante tejido inteligente teñido**

Cinta transportadora

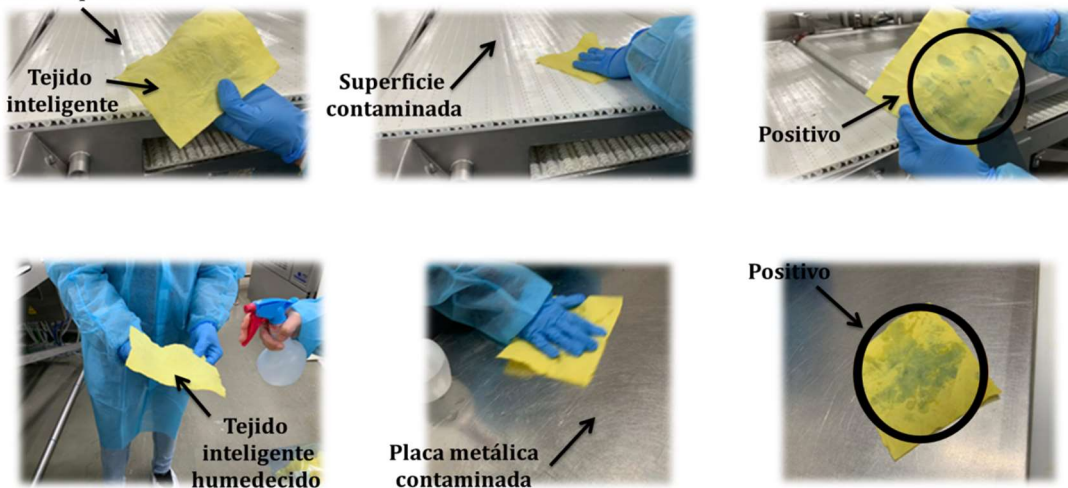


Figura 3.3. Pruebas de campo con el tejido teñido sobre cinta transportadora y superficie metálica.

De forma paralela, se analizaron las mismas superficies de trabajo mediante la metodología alternativa de “spray”. Este método del “spray” consiste en pulverizar la disolución de la sonda sobre la superficie de análisis, para que así entre en contacto con las posibles sustancias contaminantes de la superficie, y después extender un tejido (a modo de “bayeta”) alrededor de la misma superficie para retirar la sonda y observar visualmente sobre el tejido si se produce un cambio de coloración por interacción con el alérgeno (Figura 3.4). Como en el caso del tejido teñido, se observó el cambio de color con mayor contraste en los puntos donde se ejercía un mayor contacto con la mano. Cabe recordar que dicho positivo en alérgeno se esperaba, ya que el análisis se estaba realizando previamente a la limpieza de la superficie.

• **Detección mediante método “spray”**

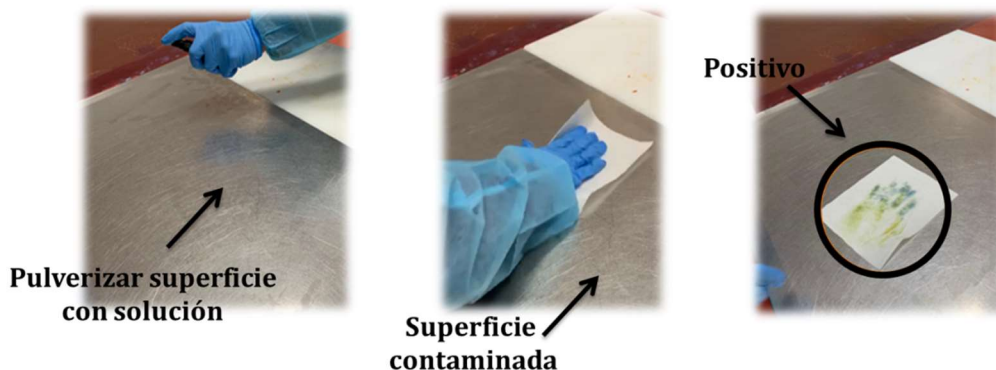


Figura 3.4. Pruebas de campo con el método “spray” sobre superficie metálica.

Por último, se llevó a cabo la fase de limpieza de la plancha metálica, la cual consistió en limpiar toda la superficie con un detergente de uso industrial y, seguidamente, con agua repetidas veces para eliminar los posibles restos de detergente. Una vez finalizada esta fase del lavado, se volvió a realizar el análisis de detección de proteínas. Tal y como se muestra en la Figura 3.5, tanto para el tejido inteligente (A) como para la aplicación directa de la sonda en solución por el método “spray” (B), no se apreció ningún cambio en la coloración. Por tanto, esta prueba reveló que el alérgeno se eliminaba en la limpieza o que su concentración se reducía en gran medida, validando de esta forma el procedimiento de limpieza.

• **Detección después de etapa de limpieza de superficie**

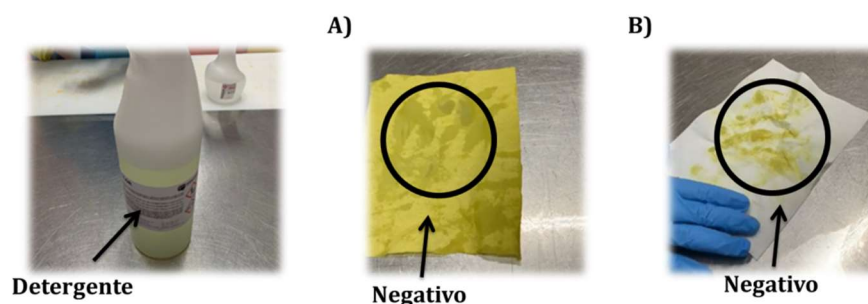


Figura 3.5. Evaluación de la respuesta después de la etapa de limpieza en superficie.

Se puede concluir que los resultados obtenidos demostraron que este sistema de detección cumple con los objetivos establecidos de utilidad (da respuesta), fácil aplicación e interpretación. Por otro lado, se realizaron pruebas de campo adicionales en otras empresas del sector de la industria alimentaria que, aunque no se incluyen en este apartado, confirmaron nuestros resultados iniciales.

En vista del potencial del producto desarrollado, se procedió, en colaboración con Proyecto Kryptonita a los trámites pertinentes para la comercialización del producto en el formato de kit de análisis: botella de “*spray*” que contiene la disolución capaz de detectar el alérgeno, acompañada de un paquete de tejidos. Este modelo se seleccionó basándose en que la fabricación industrial sería más fácil y que existían más opciones de empresas que puedan fabricar este tipo de productos. El producto comercial se registró con el nombre “ProSensing – Cleaning Validation Test”. La Figura 3.6 muestra el logo del producto, el formato y la etiqueta que incluye el protocolo de modo de empleo.



Figura 3.6. Formato y etiqueta del producto comercial para la detección de proteínas.

En resumen, en el marco del proyecto I+D con la empresa Kryptonita y durante la realización de mi tesis doctoral se han conseguido los siguientes hitos:

- Se ha identificado una sonda que permite la detección del alérgeno mediante un cambio de color visible al ojo humano.
- Se ha optimizado la formulación del sistema de medida.

- Se ha optimizado la obtención de una metodología reproducible y económicamente viable para la preparación de los tejidos inteligentes.
- Se ha estudiado la estabilidad de los sistemas durante su almacenamiento
- Se han llevado a cabo pruebas de campo para validar el empleo del producto en dos formatos diferentes.
- Se ha legalizado, producido y comercializado el producto.

CAPÍTULO IV

PILs derivados de α,β -aminoamidas

4 Capítulo IV. PILs derivados de α,β -aminoamidas

En este capítulo se resumen los estudios realizados en la síntesis de una serie de líquidos iónicos próticos basados en el empleo de α,β -aminoamidas derivadas de aminoácidos naturales y diferentes ácidos. De igual modo, se recogen los resultados obtenidos en su caracterización fisicoquímica, así como un análisis preliminar de su toxicidad y la evaluación de su posible aplicación como medio de inmovilización para el desarrollo de materiales inteligentes basados en cambios colorimétricos sensibles a la presencia de aminas volátiles.

4.1 Metodología y síntesis de PILs basados en aminoácidos

En general, los líquidos iónicos próticos (PILs) pueden verse como una alternativa sintética simple y de menor coste a los líquidos iónicos apróticos tradicionales. Además, la elección adecuada de sus constituyentes ácido y base puede reducir de manera considerable su perfil toxicológico y aumentar su biodegradabilidad.^{1,2} Atendiendo a esto, el objetivo inicial de este trabajo es diseñar líquidos iónicos próticos derivados de L-valina y L-prolina como aminoácidos naturales accesibles, económicos y de fácil derivatización. Atendiendo a la experiencia previa del grupo de trabajo, los PILs se basan en una familia de α,β -aminoamidas derivada de dichos aminoácidos y desarrollada en nuestro grupo de trabajo para diferentes aplicaciones.^{3,4,5}

¹ Peric, B.; Sierra, J.; Martí, E.; Cruañas, R.; Garau, M. A.; Arning, J.; Bottin-Weber, U.; Stolte, S. (Eco)toxicity and biodegradability of selected protic and aprotic ionic liquids. *Journal of Hazardous Materials* **2013**, *261*, 99-105.

² Skarpalezos, D.; Tzani, A.; Avraam, E.; Politidis, C.; Kyritsis, A.; Detsi, A. Synthesis, structure-properties relationship and biodegradability assessment of novel protic ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids* **2021**, *344*, 117754.

³ Burguete, M. I.; Collado, M.; Escorihuela, J.; Luis, S. V. Efficient Chirality Switching in the Addition of Diethylzinc to Aldehydes in the Presence of Simple Chiral α -Amino Amides. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (47), 9002-9005.

⁴ Escorihuela, J.; Altava, B.; Burguete, M. I.; Luis, S. V. C2 symmetrical nickel complexes derived from α -amino amides as efficient catalysts for the enantioselective addition of dialkylzinc reagents to aldehydes. *Tetrahedron* **2013**, *69* (2), 551-558.

⁵ Altava, B.; Isabel Burguete, M.; Carbó, N.; Luis, S. V.; Martí-Centelles, V.; Vicent, C. Bis(amino amides) derived from natural amino acids as chiral receptors for N-protected dicarboxylic amino acids. *Tetrahedron Letters* **2013**, *54* (1), 72-79.

4.1.1 Evaluación de ruta sintética alternativa mediante “factor E” para la preparación de α,β -aminoamidas

En primer lugar, se reevaluó la síntesis de las α,β -aminoamidas estudiando diferentes alternativas orientadas a incrementar la eficiencia del proceso a la vez que reducir su impacto medioambiental. En general, la formación de las α,β -aminoamidas derivadas de aminoácidos implica el acoplamiento de una amina con el correspondiente aminoácido protegido activado y, posteriormente, la desprotección de la amina del aminoácido.^{6,7}

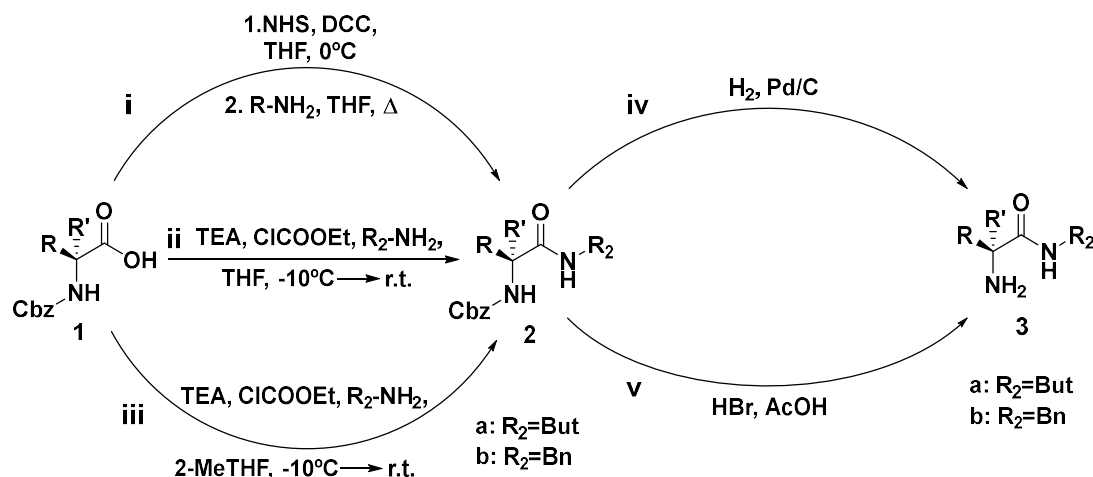
La forma activada del ácido puede ser tanto un reactivo estable que se puede aislar (p. ej. como éster de la *N*-hidroxisuccinimida), como un compuesto de estabilidad intermedia, tal como un haluro de acilo, azida o un anhídrido mixto o simétrico, que puede o no ser aislado, o un intermedio transitorio que no es ni aislable ni detectable. El ácido activado, de una naturaleza u otra, se somete a una aminólisis para dar lugar a la formación de la amida correspondiente. Aunque estas estrategias pueden ser muy eficientes en cuanto al rendimiento alcanzado, están lejos de ser consideradas como procesos sostenibles, ya que implica el empleo de grandes cantidades de disolventes y la generación de cantidades estequiométricas de residuos que no se incorporan al producto final, reduciendo la economía atómica del proceso.^{8,9} Así, en primer lugar, se estudió la activación de los ácidos carboxílicos mediante el empleo de diferentes agentes de acoplamiento. El Esquema 4.1 muestra los diferentes protocolos sintéticos evaluados para la síntesis de α,β -aminoamidas. Este estudio se realizó empleando L-Valina *N*-protegida con Cbz (carboxibencilo) como aminoácido de partida.

⁶ El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chemical Reviews* **2011**, *111* (11), 6557-6602.

⁷ Dunetz, J. R.; Magano, J.; Weisenburger, G. A. Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals. *Organic Process Research & Development* **2016**, *20* (2), 140-177.

⁸ Trost, B. M. The Atom Economy—A Search for Synthetic Efficiency. *Science* **1991**, *254* (5037), 1471-1477.

⁹ Eissen, M.; Mazur, R.; Quebbemann, H.-G.; Pennemann, K.-H. Atom Economy and Yield of Synthesis Sequences. *Helvetica Chimica Acta* **2004**, *87* (2), 524-535.



Esquema 4.1. Alternativas para activación y formación del enlace amida, así como desprotección del grupo protector.

La ruta **i** implica la utilización de DCC y NHS para generar el correspondiente éster activado estable. Este se aísla fácilmente por cristalización en isopropanol y proporciona buenos rendimientos con una amplia gama de aminas.^{3,4} Sin embargo, esta ruta sintética presenta problemas significativos en cuanto a generación de residuos y a la económica atómica y, por lo tanto, no es atractiva en términos de Química Verde.¹⁰ Con el fin de paliar estos problemas, se investigaron posibles rutas alternativas que implicasen una eficiencia elevada en términos de rendimiento, que fuesen fácilmente aplicables a gran escala y que implicasen la cogeneración de menos subproductos, o al menos que fuesen más inertes o de una toxicidad reducida. Nuestros estudios iniciales se centraron en la ruta **ii** basada en la utilización del cloroformiato de etilo en presencia de una base (TEA) que permite activar el ácido a bajas temperaturas (típicamente de -10 a -25°C) y no genera subproductos tóxicos y difíciles de eliminar como en el caso de la DCU.^{6,7} Aunque ambas activaciones conducen a buenos rendimientos de los productos aislados (85-95 % rendimiento), si se consideran los residuos y la naturaleza de estos, la diferencia es considerable. Por lo que respecta a la ruta **ii**, los productos secundarios formados son dióxido de carbono, etanol y clorhidrato de Et_3N . Estos residuos son fáciles de eliminar, menos peligrosos y adecuados para la fabricación a gran escala.

La elección del disolvente es un factor adicional que no solo puede afectar la eficiencia química de la formación de la amida, sino también su impacto medioambiental. En este sentido, la industria farmacéutica ha desarrollado diferentes guías para la selección de

¹⁰ Adams, J. P.; Alder, C. M.; Andrews, I.; Bullion, A. M.; Campbell-Crawford, M.; Darcy, M. G.; Hayler, J. D.; Henderson, R. K.; Oare, C. A.; Pendrak, I.; et al. Development of GSK's reagent guides – embedding sustainability into reagent selection. *Green Chemistry* **2013**, *15* (6), 1542-1549.

disolventes de reducido impacto medioambiental que analizan las características de una amplia gama de disolventes de manera objetiva. Estas guías determinan si los disolventes comercializados como alternativas "más verdes" realmente representan una opción más sostenible.^{11,12}

En nuestro caso, se propuso la sustitución del THF por un disolvente clasificado como más sostenible como es el 2-MeTHF (ruta **iii**, Esquema 4.1). El 2-MeTHF se produce a partir de recursos renovables y se puede degradar en presencia de aire y luz solar.¹³ De esta manera, la huella de carbono asociada con la ruta sintética del proceso global sería considerablemente inferior.

Con el fin de evaluar el impacto de estas modificaciones, se empleó una simple métrica como es el factor E (Tabla 4.1). El factor E fue propuesto por R. Sheldon como una métrica sencilla que permite comparar el impacto medioambiental de diferentes procesos alternativos.¹⁴ El factor E se define como la cantidad de residuos producidos en kilos por cada kilo de producto final aislado.

El empleo del cloroformiato de etilo, como se ha mencionado, no solo permite reducir la toxicidad de los compuestos secundarios formados, sino que conlleva una reducción del factor E (entrada 1 vs 2, Tabla 4.1). La reducción más significativa en el factor E, manteniendo rendimientos similares en la formación de las α,β -aminoamidas *N*-protegidas, se observó al sustituir el THF por 2-MeTHF (ver entrada 2 vs 3, Tabla 4.1). La reducción de los residuos se debe a la inmiscibilidad parcial del 2-MeTHF en agua, ya que permite un aislamiento más sencillo del producto sin necesidad de añadir otros disolventes, como CH_2Cl_2 , para eliminar los subproductos generados mediante una extracción en agua ácida. Además, el producto recuperado del 2-MeTHF presenta una pureza elevada, eliminándose la necesidad de la cristalización en isopropanol, que sí que es necesaria cuando se trabaja

¹¹ Henderson, R. K.; Jiménez-González, C.; Constable, D. J. C.; Alston, S. R.; Inglis, G. G. A.; Fisher, G.; Sherwood, J.; Binks, S. P.; Curzons, A. D. Expanding GSK's solvent selection guide – embedding sustainability into solvent selection starting at medicinal chemistry. *Green Chemistry* **2011**, *13* (4), 854-862.

¹² Prat, D.; Wells, A.; Hayler, J.; Sneddon, H.; McElroy, C. R.; Abou-Shehada, S.; Dunn, P. J. CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. *Green Chemistry* **2016**, *18* (1), 288-296.

¹³ Pace, V.; Hoyos, P.; Castoldi, L.; Domínguez de María, P.; Alcántara, A. R. 2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF): A Biomass-Derived Solvent with Broad Application in Organic Chemistry. *ChemSusChem* **2012**, *5* (8), 1369-1379.

¹⁴ Sheldon, R. A. The E Factor 25 Years on: The Rise of Green Chemistry and Sustainability. *Green Chem.* **2017**, *19* (1), 18-43.

en THF. Cabe destacar que la misma tendencia se observa para la síntesis de la amina **2b** (ver entradas 4, 5 y 6, Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Rendimiento y valores de factor E calculados para derivados de L-Valina usando diferentes protocolos sintéticos.

| Entrada | Etapas | α - β -aa | Etapa 1 Rto (%) | Etapa 2 Rto (%) | E-Factor |
|---------|--------|------------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| 1 | i/v | 2a | 80 | 88 | 161 |
| 2 | ii/v | 2a | 81 | 85 | 106 |
| 3 | iii/v | 2a | 82 | 98 | 33 |
| 4 | i/v | 2b | 82 | 87 | 140 |
| 5 | ii/v | 2b | 86 | 89 | 87 |
| 6 | iii/v | 2b | 83 | 97 | 28 |
| 7 | iii/iv | 2a | 84 | 98 | 5.5 ^a |
| 8 | iii/iv | 2b | 82 | 97 | 2 ^a |

^a Ruta sintética a gran escala (40 g de aminoácido) y con reciclado del 2-MeTHF

Adicionalmente, se estudió la influencia del escalado para la síntesis de las α,β -aminoamidas. Para ello, se realizó un incremento de 20 veces con respecto a la masa inicial del aminoácido *N*-protegido empleado. Este escalado no mostró una influencia significativa en términos de los rendimientos obtenidos para las α,β -aminoamidas *N*-protegidas. (ver entradas 7 y 8, Tabla 4.1). Sin embargo, el empleo de una mayor cantidad de disolvente permitió realizar la recuperación del 2-MeTHF después de la reacción. Esto tuvo un efecto positivo, ya que permitió reducir la cantidad de residuo generado y, por tanto, el factor E. Así, considerado el reciclado del disolvente se obtuvieron valores de $E < 6$. Además, se debe mencionar que, para llevar a cabo la desprotección del grupo protector de la amina, en este caso denominado benciloxycarbonilo (Cbz), a gran escala, se evaluó la hidrogenólisis con hidrógeno y un catalizador de Pd como alternativa más sostenible a la hidrólisis con HBr/AcOH. En principio, la hidrogenólisis evita el uso de una sustancia corrosiva como es la mezcla HBr/AcOH y la necesidad de la posterior neutralización de la sal de amina obtenida. Esta misma metodología se aplicó para la síntesis de las α,β -aminoamidas obtenidas a partir de la L-prolina *N*-protegida con Cbz por reacción con la butilamina (Figura 4.1).

Por último, se evaluó el empleo de la L-valina *N*-protegida con tert-butiloxycarbonilo (BOC) como aminoácido de partida, en lugar de con Cbz, para la preparación de la α,β -aminoamida

usando el mismo protocolo sintético (Tabla 4.2). El empleo del BOC muestra rendimientos ligeramente inferiores a los obtenidos cuando se empleó el Cbz, pero se observa una tendencia similar con respecto al factor E.

Tabla 4.2. Valores de rendimiento y factor E calculados para α,β -aminoamidas preparadas a partir de aminoácidos protegidos con BOC.

| Entrada | Etapas | α - β -aa | Etapa 1 Rto (%) | E-Factor |
|---------|--------|------------------------|--------------------|-----------------|
| 9 | ii/v | 2a | 78 | 100 |
| 10 | iii/v | 2a | 72 | 11 ^a |
| 11 | ii/v | 2b | 76 | 92 |
| 12 | iii/v | 2b | 75 | 7 ^a |

^a Ruta sintética y con reciclado de 2-MeTHF

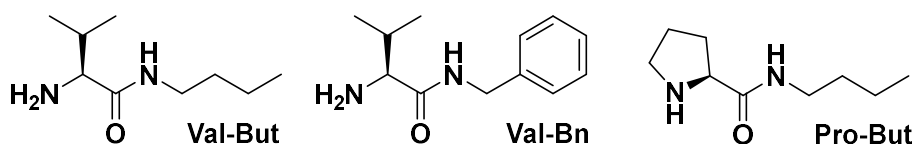


Figura 4.1. Estructura de las α,β -aminoamidas derivadas de aminoácidos.

En resumen, las ligeras modificaciones introducidas en la ruta sintética nos permitieron reducir un orden de magnitud el factor E, tanto empleando la butilamina como la bencilamina, sin que el rendimiento se viese afectado. Además, a partir de los resultados obtenidos, se puede decir que las α,β -aminoamidas pueden ser preparadas a partir de diferentes aminoácidos y de diferentes aminas. En nuestro caso, se prepararon una familia de α,β -aminoamidas derivadas de L-valina y L-prolina (Figura 4.1) mediante el acoplamiento con dos tipos de aminas (butilamina y bencilamina) para ser empleadas como bases en la preparación de PILs.

4.1.2 Diseño y síntesis de PILs derivados de α,β -aminoamidas

Una vez preparadas las α,β -aminoamidas, se procedió a su aplicación en la síntesis de los líquidos iónicos próticos. Estos se pueden obtener de manera sencilla mediante una transferencia de protón desde un ácido (HA) a una base (B) de Brønsted. En nuestro caso, por reacción entre la amina libre de la α,β -aminoamida, que actúa como base, y una cantidad equimolar de un ácido, empleando metanol (MeOH) como disolvente, dando lugar de esta manera sencilla al PIL correspondiente (Figura 4.2).

Con esta sencilla aproximación, variando la naturaleza de la α,β -aminoamida y de los ácidos empleados en su neutralización, se puede preparar una nueva familia de 21 líquidos iónicos próticos para evaluar cómo las diferentes variables estructurales (aplicables tanto al catión como al anión) pueden emplearse para modificar y ajustar sus propiedades. Así, se planteó la preparación de PILs derivados de α,β -aminoamidas obtenidas a partir de L-valina (Val) y L-prolina (Pro) (Figura 4.2a). De este modo, un primer vector de diseño queda definido por la utilización del aminoácido de partida. Por otra parte, la naturaleza de la α,β -aminoamida obtenida a partir de la L-valina (Val) y de la bencilamina o, alternativamente, de la butilamina. Es decir, empleando un residuo aromático frente a uno alifático (Figura 4.2b). Por último, se considera la naturaleza del ácido seleccionado para la preparación de los PILs, eligiéndose ocho ácidos de diferente naturaleza. Estos incluyen el empleo de dos superácidos (HBF_4 y $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$), tres α -hidroxiácidos orgánicos naturales, como el ácido láctico, mandélico o tartárico, y, por último, tres ácidos naturales relativamente hidrofóbicos (caprílico, geránico o citronélico) (Figura 4.2c).

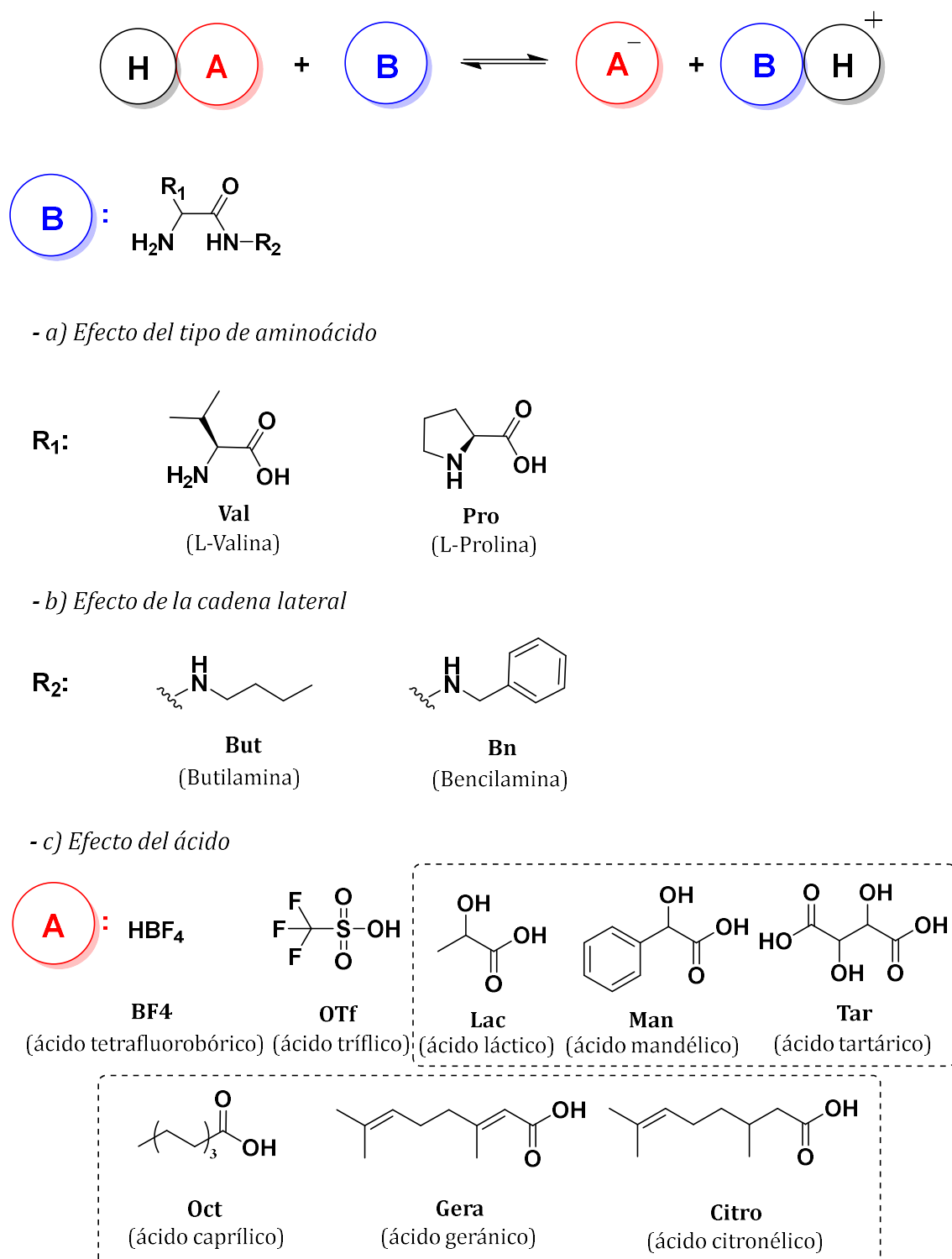


Figura 4.2. Síntesis de nuevos líquidos iónicos prácticos: reacciones de intercambio de protón entre ácidos y α,β -aminoamidas.

Para analizar los nuevos PILs obtenidos se realizaron estudios de caracterización mediante diferentes técnicas que se presentan a continuación con el fin de establecer la formación de

una nueva especie y el grado de transferencia de protón desde el ácido (HA) a la base (B) de Brønsted empleados.

4.1.3 Estudio de formación de líquidos iónicos próticos mediante FT-IR-ATR

En primer lugar, se procedió a un estudio de los PILs sintetizados mediante la espectroscopía FT-IR-ATR. La técnica de espectroscopia vibratoria de infrarrojo (IR) ha sido ampliamente empleada para la caracterización de los líquidos iónicos, ya que esta permite obtener información tanto sobre la naturaleza de las interacciones iónicas como del papel que desempeñan los enlaces de hidrógeno anión-cación.¹⁵ La espectroscopia IR presenta, en comparación con la espectroscopia de resonancia magnética nuclear, una escala de tiempo más corta de 10^{-13} s. De este modo, la espectroscopia infrarroja es de gran utilidad para mostrar la evolución y proporcionar una imagen detallada de la evolución de los cambios que ocurren durante la formación de los PILs. De hecho, esta técnica se utilizó para determinar la presencia y evolución tanto de las especies moleculares como iónicas en el proceso de formación de PILs.^{16,17}

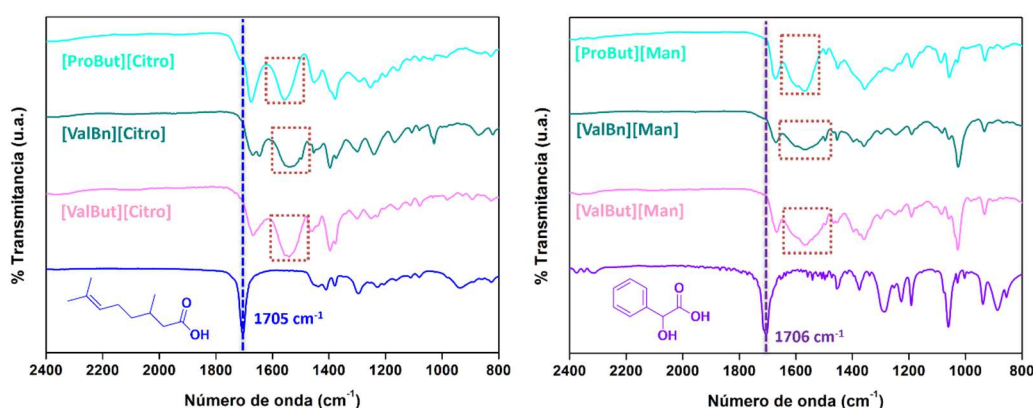


Figura 4.3. Espectros IR de diferentes PILs y de los correspondientes ácidos precursores en la región de 2400–800 cm^{-1} .

La Figura 4.3 recoge la región de 2400–800 cm^{-1} de los espectros IR obtenidos de los PILs sintetizados a partir de la neutralización de tres α,β -aminoamidas (ProBut, ValBn y ValBut)

¹⁵ Palumbo, O.; Cimini, A.; Trequatrini, F.; Brubach, J. B.; Roy, P.; Paolone, A. The infrared spectra of protic ionic liquids: performances of different computational models to predict hydrogen bonds and conformer evolution. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2020**, *22* (14), 7497-7506.

¹⁶ Shen, M.; Zhang, Y.; Chen, K.; Che, S.; Yao, J.; Li, H. Ionicity of Protic Ionic Liquid: Quantitative Measurement by Spectroscopic Methods. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121* (6), 1372-1376.

¹⁷ Bica, K.; Shamshina, J.; Hough, W. L.; MacFarlane, D. R.; Rogers, R. D. Liquid forms of pharmaceutical co-crystals: exploring the boundaries of salt formation. *Chemical Communications* **2011**, *47* (8), 2267-2269.

con ácido citronélico y mandélico, respectivamente, y su comparación con el ácido libre correspondiente. En general, se observa la desaparición de la banda asociada a la vibración del grupo C=O del ácido (*ca.* 1700 cm⁻¹). Además, en todos los casos, se observa la aparición de banda ancha en la región entre 1500-1650 cm⁻¹ que se puede asociar a la vibración correspondiente al estiramiento asimétrico del carbonilo C=O del carboxilato (COO⁻) de las correspondientes especies aniónicas, lo que, en principio, sugeriría una transferencia elevada entre el protón ácido y el grupo amina libre de la α,β -aminoamida.^{16,18,19} Aunque esta banda es difícil de analizar en detalle, ya que aparece en la misma zona de las bandas asociadas a la vibración de la amida II procedente de la α,β -aminoamida.

¹⁸ Moshikur, R.; Chowdhury, M. R.; Fujisawa, H.; Wakabayashi, R.; Moniruzzaman, M.; Goto, M. Design and Characterization of Fatty Acid-Based Amino Acid Ester as a New “Green” Hydrophobic Ionic Liquid for Drug Delivery. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2020**, *8* (36), 13660–13671.

¹⁹ Reid, J. E. S. J.; Bernardes, C. E. S.; Agapito, F.; Martins, F.; Shimizu, S.; Minas da Piedade, M. E.; Walker, A. J. Structure–property relationships in protic ionic liquids: a study of solvent–solvent and solvent–solute interactions. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2017**, *19* (41), 28133–28138.

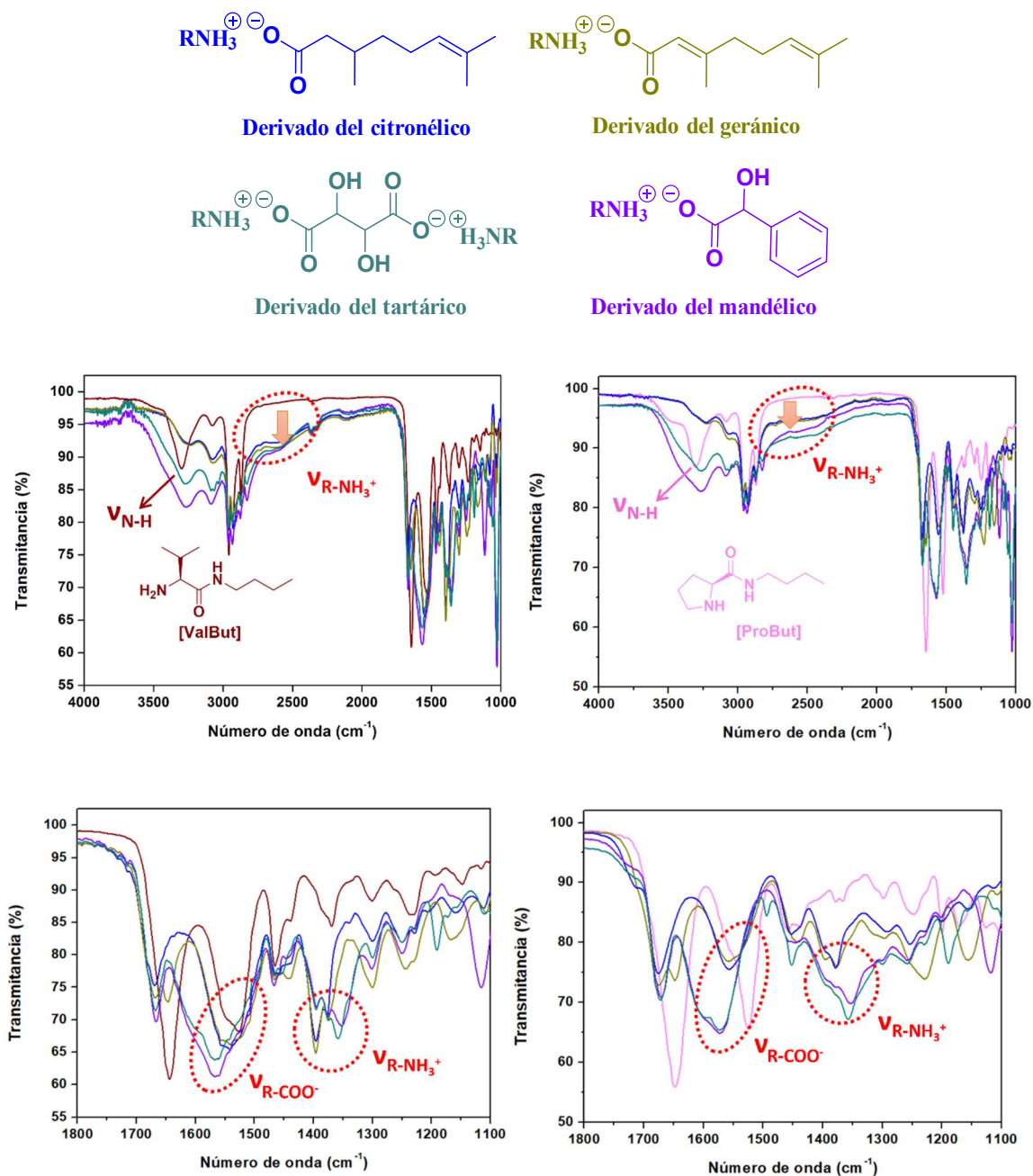


Figura 4.4. Estructuras y espectros IR de diversos PILs y de las correspondientes α,β -aminoamidas derivadas de la L-valina y L-prolina como precursores en la región de 4000–1000 cm^{-1} y la región de 1800–1100 cm^{-1} .

Por otro lado, la formación de las sales correspondientes también se puede observar cuando se analiza la región de los espectros de 3600-2400 cm^{-1} . Así, a modo de ejemplo ilustrativo, la Figura 4.4 muestra los espectros de los PILs obtenidos con las α,β -aminoamidas derivadas de L-valina y L-prolina como base libre y cuatro ácidos diferentes. En todos los casos, cuando se comparan con la α,β -aminoamida de partida, se observa una banda ancha que aparece a un número de onda entre 2800-2400 cm^{-1} y que puede asociarse al estiramiento asimétrico

en el grupo -NH_3^+ procedente de las sales de aminas cuaternarias.²⁰ De igual modo, la banda ancha entre $3400\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al estiramiento del -NH- de la amida muestra cambios tanto de intensidad como de desplazamiento del máximo centrado inicialmente a 3300 cm^{-1} .²¹ Esto puede atribuirse tanto a la formación de la especie iónica como a la presencia de interacciones por puentes de hidrógeno entre el catión y el anión. Además, la formación del par iónico se puede confirmar por la presencia de la vibración de torsión simétrica asociada a -NH_3^+ entre $1400\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ y el estiramiento asimétrico asociado al grupo COO^- entre $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$. En dichas regiones, los PILs derivados del tártarico y el mandélico muestran ligeros desplazamientos respecto de los derivados del geránico y el citronélico. Estas diferencias observadas en función del ácido podrían estar asociadas al diferente grado de ionicidad de los PILs obtenidos según la naturaleza del ácido empleado. La ionicidad será evaluada y estudiada en un apartado posterior mediante resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$).

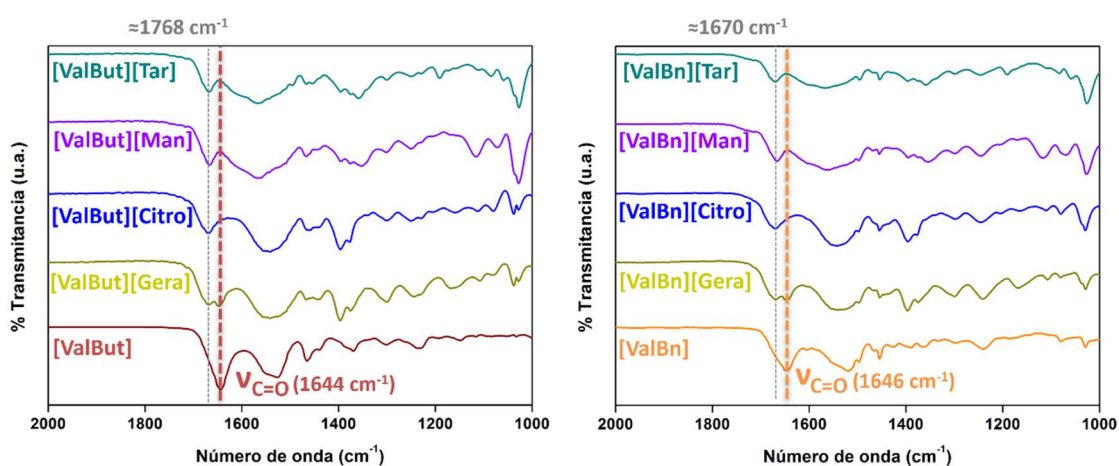


Figura 4.5. Espectros IR de diferentes PILs y de las correspondientes bases precursoras en la región de $2000\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$.

Finalmente, la Figura 4.5 muestra la variación observada para el C=O que corresponde a la vibración de la amida I procedente de la α,β -aminoamida (1646 y 1644 cm^{-1} , respectivamente). Con la formación de los PILs, se aprecia el desplazamiento de dicha banda a la región de $1668\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$. Este desplazamiento se puede asociar a la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares entre el -NH- del grupo amida y del grupo carbonilo

²⁰ Wang, C.; Chopade, S. A.; Guo, Y.; Early, J. T.; Tang, B.; Wang, E.; Hillmyer, M. A.; Lodge, T. P.; Sun, C. C. Preparation, Characterization, and Formulation Development of Drug-Drug Protic Ionic Liquids of Diphenhydramine with Ibuprofen and Naproxen. *Molecular Pharmaceutics* **2018**, *15* (9), 4190-4201.

²¹ Hoque, M.; Thomas, Morgan L.; Miran, M. S.; Akiyama, M.; Marium, M.; Ueno, K.; Dokko, K.; Watanabe, M. Protic ionic liquids with primary alkylamine-derived cations: the dominance of hydrogen bonding on observed physicochemical properties. *RSC Advances* **2018**, *8* (18), 9790-9794.

del ácido correspondiente. Como resultado de la participación del grupo -NH- en la creación de nuevos enlaces de hidrógeno, la vibración del banda correspondiente al carbonilo de amida (NH-C=O) se desplaza a un mayor número de onda.^{22,23}

En resumen, los estudios iniciales de los PILs por espectroscopia infrarroja sugieren la formación de las sales correspondientes entre las tres α,β -aminoamidas y los ácidos estudiados. Del mismo modo, indica que la presencia de grupos funcionales tanto en el anión como en el catión les confiere la habilidad de establecer interacciones adicionales, principalmente puentes de hidrógeno. Además, la simple interacción iónica catión-anión puede contribuir de manera relevante a la energía de cohesión del PIL.

4.1.4 Estudio de formación de líquidos iónicos próticos mediante DSC

El comportamiento de fase de los ILs y compuestos relacionados se puede obtener de manera sencilla mediante un análisis por termocalorimetría usando un calorímetro diferencial de barrido o DSC (en inglés). Esta técnica permite medir y evaluar los cambios de entalpía de un material en función del tiempo o la temperatura. Como se representa en la Figura 4.6, se pueden establecer diferentes transiciones definidas por la temperatura de fusión (T_m , pico endotérmico observado en la curva de calentamiento), la temperatura de congelación (T_f , pico exotérmico al enfriar la muestra), la temperatura de cristalización en frío (T_{cc} , pico exotérmico al calentarse la muestra de un estado líquido subenfriado a un estado sólido cristalino), la temperatura de transición sólido-sólido (T_{ss} , pico exotérmico o endotérmico al calentarse desde un estado sólido cristalino) y la temperatura de transición vítrea (T_g , pequeño cambio de capacidad térmica al calentar desde el estado de vidrio amorfo a un estado líquido).²⁴ Estas posibles transiciones dependerán en gran medida de la fuerza de enlace del compuesto iónico. Así, los compuestos con una mayor energía de interacción presentarán transiciones (p. ej. T_m) a temperaturas mayores que aquellos con una menor interacción. De este modo, el comportamiento de fase de los PILs quedará determinado por las interacciones tanto coulombicas, entre el catión y el anión, como por interacciones supramoleculares, más débiles, entre ellos. Además, alguna de estas

²² Zotova, J.; Wojnarowska, Z.; Twamley, B.; Tajber, L. Formation of stoichiometric and non-stoichiometric ionic liquid and cocrystal multicomponent phases of lidocaine with azelaic acid by changing counterion ratios. *Journal of Molecular Liquids* **2021**, *344*, 117737.

²³ González, L.; Altava, B.; Bolte, M.; Burguete, M. I.; García-Verdugo, E.; Luis, S. V. Synthesis of Chiral Room Temperature Ionic Liquids from Amino Acids – Application in Chiral Molecular Recognition. *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, *2012* (26), 4996-5009

²⁴ Gómez, E.; Calvar, N.; Domínguez, A. Thermal Behaviour of Pure Ionic Liquids, Chapter 8, 2015. IntechOpen, edited by Scott Handy.

transiciones puede relacionarse con otros parámetros de los ILs tales como la viscosidad y la conductividad. De este modo, el análisis térmico permite obtener conclusiones generales sobre la influencia de la estructura del catión y del anión, así como el efecto de los grupos funcionales y cadenas laterales presentes en estos.

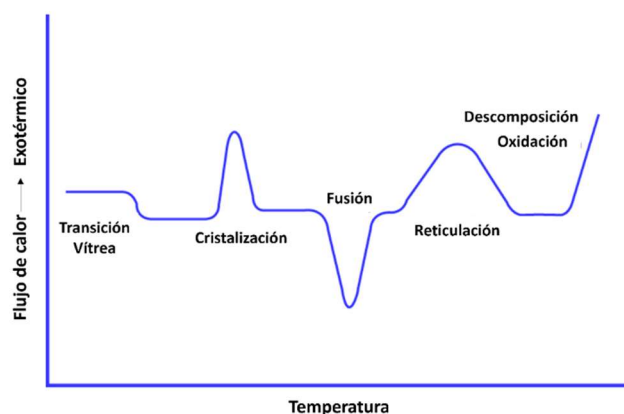


Figura 4.6. Diagrama de un termograma de DSC con transiciones típicas.

En la literatura,^{25,26} se han observado para los ILs, sin considerar los sistemas polimórficos más complejos, tres tipos de comportamiento térmico más comunes:

- i. El primer tipo de comportamiento queda definido por líquidos iónicos que presentan únicamente transiciones relacionadas con la presencia de un vidrio amorfo. Estos ILs presentan una tendencia débil a la cristalización. Así, estos sistemas presentan una transición vítrea (T_g) que aparece tanto en el ciclo de enfriamiento como de calentamiento.
- ii. El segundo tipo de comportamiento se caracteriza por presentar una transición de congelación, formando cristales al enfriarse, y una fusión, al calentarse, siendo sistemas con una gran tendencia a la formación de cristales. En general, la temperatura de congelación (T_f) es inferior a la de fusión (T_m), un efecto conocido como sobreenfriamiento.
- iii. El tercer tipo de comportamiento que aparece en los ILs no muestra tendencia a cristalizar al enfriarse, sin embargo, al calentarse presenta cristalización en frío (T_{cc}).

²⁵ Kulkarni, P. S.; Branco, L. C.; Crespo, J. G.; Nunes, M. C.; Raymundo, A.; Afonso, C. A. M. Comparison of Physicochemical Properties of New Ionic Liquids Based on Imidazolium, Quaternary Ammonium, and Guanidinium Cations. *Chemistry – A European Journal* **2007**, *13* (30), 8478-8488.

²⁶ Zhang, Q.; Li, Z.; Zhang, J.; Zhang, S.; Zhu, L.; Yang, J.; Zhang, X.; Deng, Y. Physicochemical Properties of Nitrile-Functionalized Ionic Liquids. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111* (11), 2864-2872.

Con el fin de establecer el comportamiento térmico de los PILs obtenidos, se realizó en primer lugar un estudio de estabilidad térmica empleando la termogravimetría o TGA (en inglés). Este análisis mostró que los compuestos obtenidos presentaban una estabilidad térmica con temperaturas de descomposición (T_d) mayores que 160 °C (ver Tabla 4.3 y Tabla 4.4). En general, los PILs obtenidos con ácidos más fuertes pueden inducir una mayor transferencia de protón y, por lo tanto, presentar una mayor ionicidad y una mayor estabilidad térmica. Los derivados de los ácidos hidrofóbicos presentan en general una menor estabilidad con T_d que comienzan sobre 160 °C, posiblemente debido a una menor ionicidad de estos sistemas.

Una vez establecida la estabilidad de los PILs, se estudió su comportamiento térmico mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Así, en primer lugar estos se sometieron a un ciclo de calentamiento a 120 °C durante 15 minutos con el fin de eliminar la presencia de agua residual. Luego, se realizaron varios ciclos consecutivos de calefacción (-50 °C a 120 °C) y enfriamiento (120 °C a -50 °C) a una velocidad de 10 °C/min, para obtener las correspondientes transiciones de fase. La Figura 4.7, Figura 4.8, Figura 4.9 y las Tabla 4.3 y Tabla 4.4 presentan los resultados obtenidos para las transiciones de fase de los diferentes PILs sintetizados derivados de L-valina y L-prolina.

Tabla 4.3. Temperaturas de transición de los PILs derivados de las α,β -aminoamidas de L-valina

| | T_g (°C) | T_m (°C) | T_d (°C) | | T_g (°C) | T_m (°C) | T_d (°C) |
|----------------------------|------------|---------------------|------------|-----------------------------|------------|----------------------|------------|
| [ValBn][OTf] | 6 | - | 295 | [ValBut][OTf] | 15 | - | 292 |
| [ValBn][BF ₄] | 27 | - | 281 | [ValBut][BF ₄] | 5 | - | 260 |
| [ValBn] ₂ [Tar] | 62 | - | 230 | [ValBut] ₂ [Tar] | 58 | - | 171 |
| [ValBn][Man] | 30 | - | 224 | [ValBut][Man] | 22 | - | 206 |
| [ValBn][Lac] | 19 | - | 172 | [ValBut][Lac] | 11 | - | 166 |
| [ValBn][Oct] | - | 44 (2) ^a | 166 | [ValBut][Oct] | - | 48 (7) ^a | 163 |
| [ValBn][Gera] | - | - | 239 | [ValBut][Gera] | - | - | 243 |
| [ValBn][Citro] | - | 37 (3) ^b | 251 | [ValBut][Citro] | - | 33 (-5) ^b | 173 |

T_g (temperatura de transición vítrea), T_m (fusión), T_d (descomposición). ^a T_f (congelación), ^b T_{cc} (Cristalización fría).

En vista de los resultados obtenidos podemos decir que la mayoría de los PILs derivados tanto de la ValBut como de la ValBn podrían considerarse del tipo i (Figura 4.7), ya que estos

no presentan transiciones de fase bien definidas (fusiones o cristalizaciones). Estos PILs presentan temperatura de transición vítrea (T_g) tanto en el ciclo de calentamiento como de enfriamiento, que pueden atribuirse a la formación de un vidrio amorfo y aparecen alrededor de temperatura ambiente. Solo para los PILs obtenidos empleando ácido tartárico, donde la relación ácido base es 1:2, la transición ocurre a una temperatura mayor (sobre 60 °C). En vista del comportamiento térmico observado, podemos decir que son sistemas que presentan una tendencia débil a la cristalización y al polimorfismo.²⁷

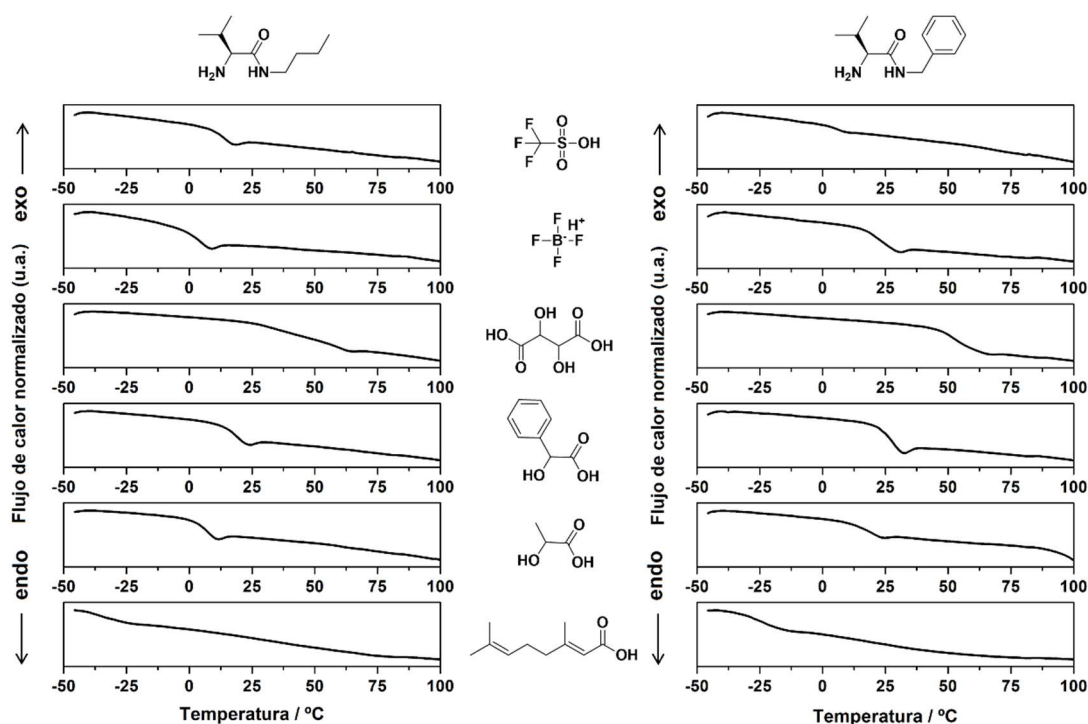


Figura 4.7. Termogramas del primero tipo de PILs con transición vítrea. Las curvas corresponden al segundo ciclo de calentamiento. (velocidad de calentamiento: $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

Sin embargo, en esta serie también se detectan dos excepciones a este comportamiento. En primer lugar, para los derivados del ácido caprílico se observa claramente la aparición de una temperatura de congelación (T_f) junto a una de fusión (T_m) (Figura 4.8). Este comportamiento, con relación a la tipología antes mencionada, sería asignable a un IL del tipo ii. Es decir, sería un sistema con gran tendencia a cristalizar. Esta diferencia se podría relacionar con interacciones anión-anión mediante fuerzas de Van der Waals asociadas a la presencia de la cadena alifática del ácido.

²⁷ Stoimenovski, J.; MacFarlane, D. R.; Bica, K.; Rogers, R. D. Crystalline vs. Ionic Liquid Salt Forms of Active Pharmaceutical Ingredients: A Position Paper. *Pharmaceutical Research* **2010**, 27 (4), 521-526.

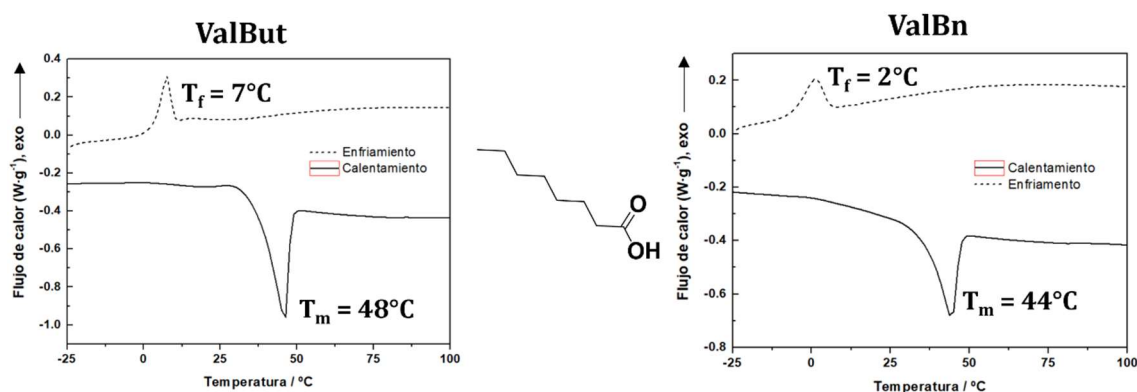


Figura 4.8. Termogramas del segundo tipo de PILs con ácido caprílico. Las curvas corresponden al segundo ciclo de calentamiento.

La segunda excepción, se encuentra para los PILs obtenidos a partir del ácido citronélico. (Figura 4.9). Estos presentan un comportamiento de tipo iii. Así, estos sistemas no forman cristales al enfriarse, pero presentan, claramente, una cristalización en frío (T_{cc}) seguida de una fusión (T_m). Este fenómeno de sobreenfriamiento se asocia generalmente con polímeros y otros materiales amorfos y está presente en muchos líquidos iónicos. Cabe destacar que estas diferencias con respecto al ácido caprílico, se pueden asociar a la presencia en el ácido de insaturaciones que pueden afectar a las interacciones anión-anión mediante fuerzas de Van der Waals. De hecho, si se comparan las temperaturas de fusión de estos sistemas, estas son ligeramente menores para los PILs derivados del citronélico, lo que estaría de acuerdo con una menor interacción anión-anión debido a la presencia de la cadena alifática ramificada y presencia de insaturaciones en el ácido citronélico. Por otro lado y para el caso de los derivados del ácido geránico, que presenta dos insaturaciones, esta interacción será aún más débil y se explica que en comparación con los sistemas anteriores no se observen transiciones significativas por encima de 50 °C. Así, podemos concluir que cuando se emplean ácidos alquílicos la presencia o ausencia de insaturaciones en la cadena alquílica del anión influye en el comportamiento de fase de los PILs. El aumento del punto de fusión de los PILs con la ausencia de las insaturaciones y una menor sustitución en la cadena alquílica del ácido induce un empaquetamiento eficiente y una mayor tendencia a la cristalización.²⁸

²⁸ Biswas, M.; Dule, M.; Samanta, P. N.; Ghosh, S.; Mandal, T. K. Imidazolium-based ionic liquids with different fatty acid anions: phase behavior, electronic structure and ionic conductivity investigation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16* (30), 16255-16263.

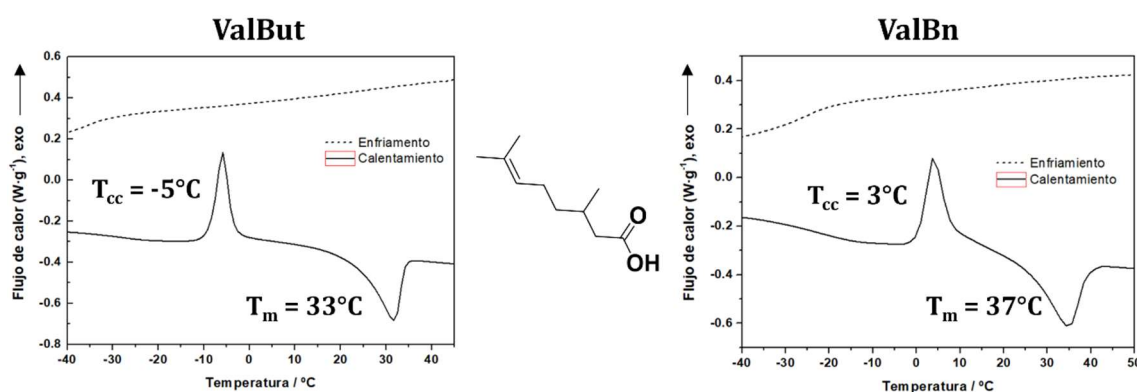


Figura 4.9. Termogramas del tercer tipo de PILs con ácido citronélico. Las curvas corresponden al segundo ciclo de calentamiento.

En general, cuando se comparan compuestos análogos en ambas familias, los derivados de la familia ValBn muestran valores ligeramente mayores que los derivados de la familia ValBut (Bn>But). Esta tendencia puede justificarse debido a la posibilidad de mayores fuerzas intermoleculares como consecuencia de interacciones π - π entre la cadena lateral aromática del catión, solo presente en la familia ValBn.

Finalmente, los compuestos próticos derivados de la α,β -aminoamida de L-prolina muestran un comportamiento térmico asignable a ILs del primer tipo, no presentando transiciones definidas de cristalización y fusión sino únicamente transiciones vítreas como muestran los valores de la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Temperaturas de transición de los PILs derivados de las α,β -aminoamidas de L-prolina

| | T_g (°C) | T_m (°C) | T_d (°C) |
|-----------------------------|------------|------------|------------|
| [ProBut] ₂ [Tar] | 7 | - | 220 |
| [ProBut][Man] | 5 | - | 290 |
| [ProBut][Lac] | -19 | - | 241 |
| [ProBut][Gera] | - | - | 251 |
| [ProBut][Citro] | -16 | - | 240 |

Cuando se comparan estos valores con los valores observados para los compuestos análogos derivados de L-valina, se aprecia claramente que la serie L-prolina muestra transiciones a temperaturas inferiores. Esta tendencia puede justificarse probablemente debido a un grado diferente de libertad conformacional o, lo que es lo mismo, a la

disminución de la simetría de cationes que contribuye a un empaquetamiento iónico menos eficiente. Además, la diferente naturaleza de la amina libre que actúa como base (primaria vs secundaria) resulta en la supresión o reducción de la temperatura de transición debido a que se reduce la posibilidad de formar puentes de hidrógeno intramoleculares.^{18,21}

4.1.5 Estudio de formación de líquidos iónicos próticos mediante RMN

A continuación, y con el fin de completar la caracterización de los PILs obtenidos, se realizaron estudios por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Esta técnica ofrece información cualitativa sobre la formación de especies iónicas, pero también de las posibles interacciones tanto anión-catión como de otras interacciones intermoleculares asociadas a las diferentes variables estructurales de los PILs obtenidos. Por lo tanto, las familias derivadas de ValBut, ValBn y ProBut se estudiaron por resonancia magnética nuclear de protón para evaluar la formación de los compuestos próticos correspondientes utilizando metanol- d_4 como disolvente deuterado. Cabe esperar que a medida que aumenta tanto la capacidad donante de protones o la fuerza del ácido como la capacidad aceptora o la fuerza de la base, el desplazamiento químico se ve fuertemente afectado y las señales características de la α,β -aminoamida tienden a moverse a campos más bajos con un mayor grado de transferencia de protones.

En el caso de la familia ValBut, los espectros de protón de los compuestos resultantes de la neutralización mostraron un desplazamiento químico a campos más bajos tanto para el protón isopropílico (H_a) como para el protón del carbono quiral (H_b) de la L-valina ($\Delta\delta = 0.2$ ppm y 0.5 ppm, respectivamente). Como se observa en la Figura 4.10, el desplazamiento químico observado para H_b y H_a estaría relacionado con la formación del grupo amonio y, la mayor proximidad de H_b a dicho grupo, lleva a un mayor desapantallamiento.

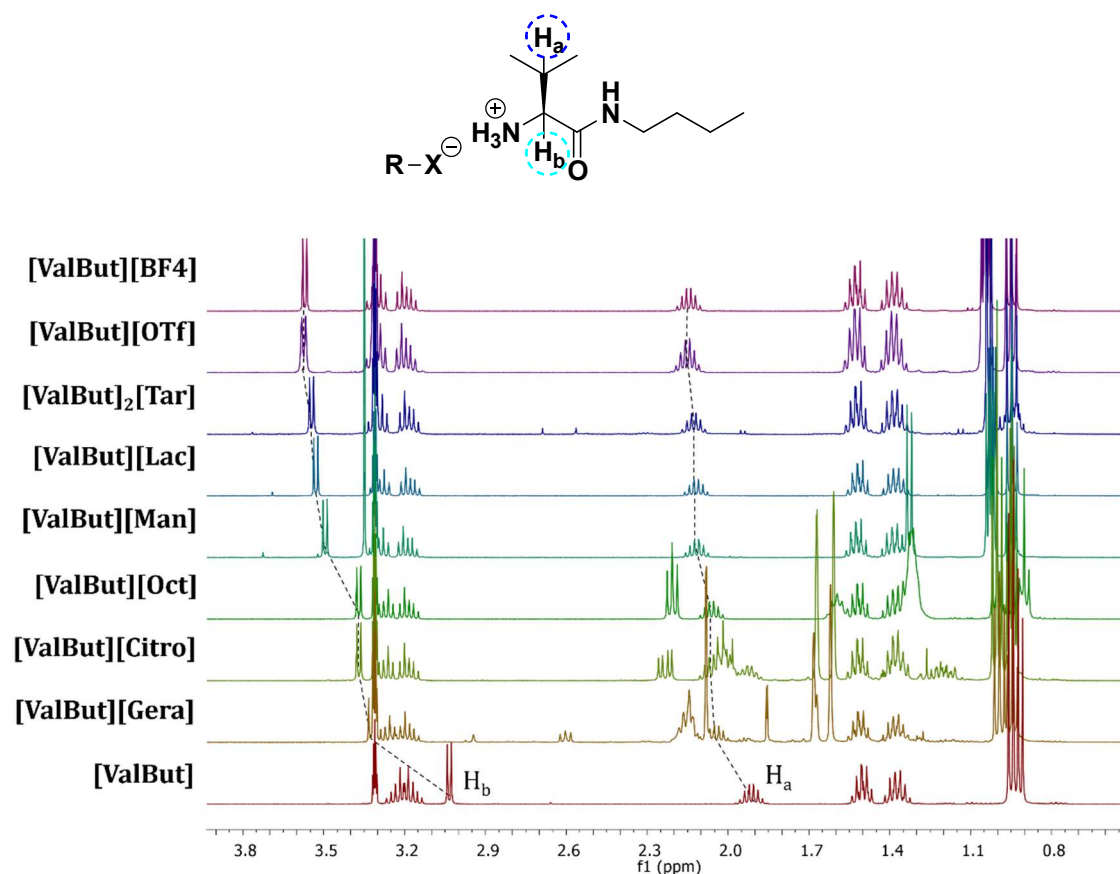


Figura 4.10. Estructura general de la familia ValBut y efecto sobre el desplazamiento de los protones H_a y H_b mediante el estudio de RMN (CD_3OD , 75 mM, $T:30^\circ C$).

Adicionalmente, los protones H_c procedentes de la cadena alifática en posición alfa respecto del grupo $-NH-$ de la amida muestran un cambio asociado al desplazamiento químico y, por otro lado, estos protones se vuelven químicamente menos equivalentes entre ellos debido al desdoblamiento de la señal correspondiente a dichos protones como se observa en la Figura 4.11. Este fenómeno puede asociarse a una mayor restricción conformacional mediante la participación del grupo amida en interacciones por puentes de hidrógeno.

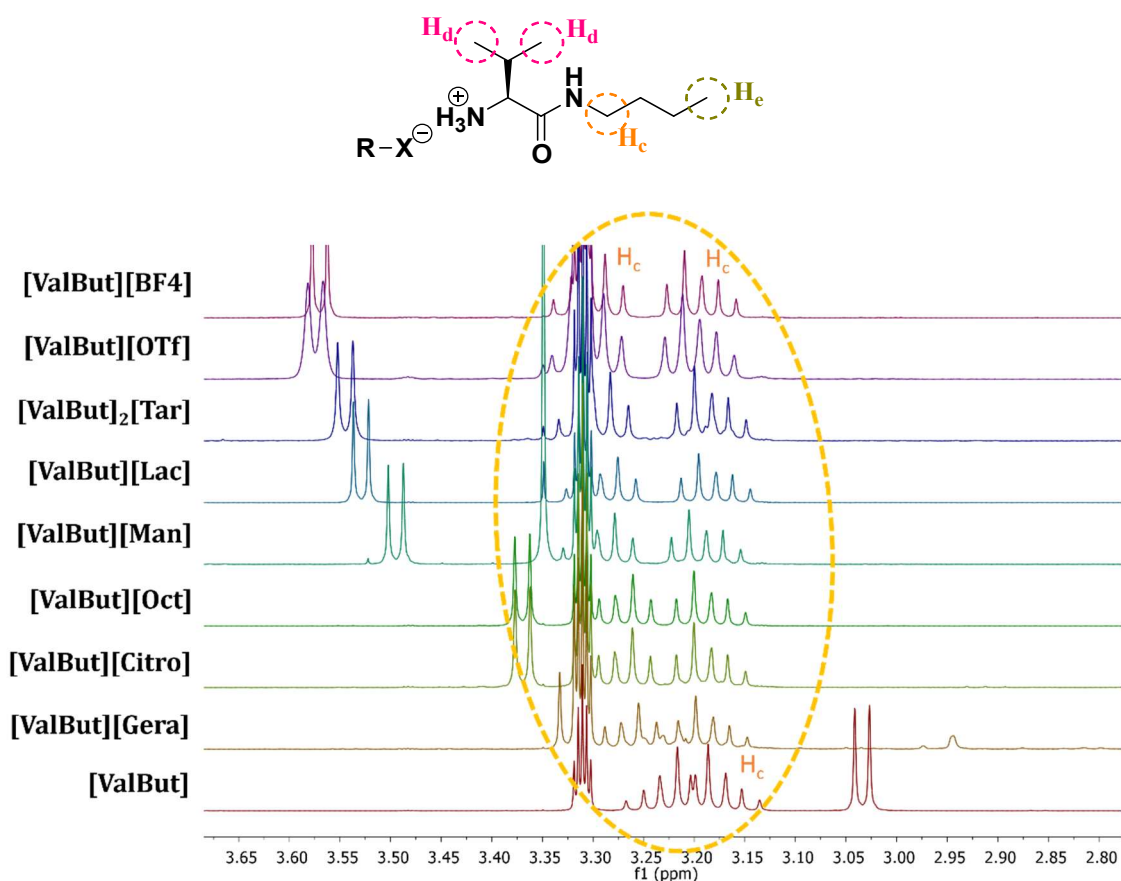


Figura 4.11. Estructura general de la familia ValBut y efecto sobre el desplazamiento de los protones H_c mediante el estudio de RMN (CD₃OD, 75 mM, T:30°C).

De manera similar, los protones metílicos **H_d** procedentes de la L-valina presentan un efecto más suave al cambiar ligeramente la equivalencia química debido a la desaparición de los dobletes característicos cuando se encuentra como amina libre y se produce la formación de una especie de doblete en la formación de los PILs como se detalla en la Figura 4.12, esto puede asociarse a un cambio conformacional al formarse el PIL. A su vez, el cambio de desplazamiento químico permite la distinción con respecto a los protones **H_e** correspondientes al metilo terminal de la cadena alifática incorporada en la formación del enlace amida.

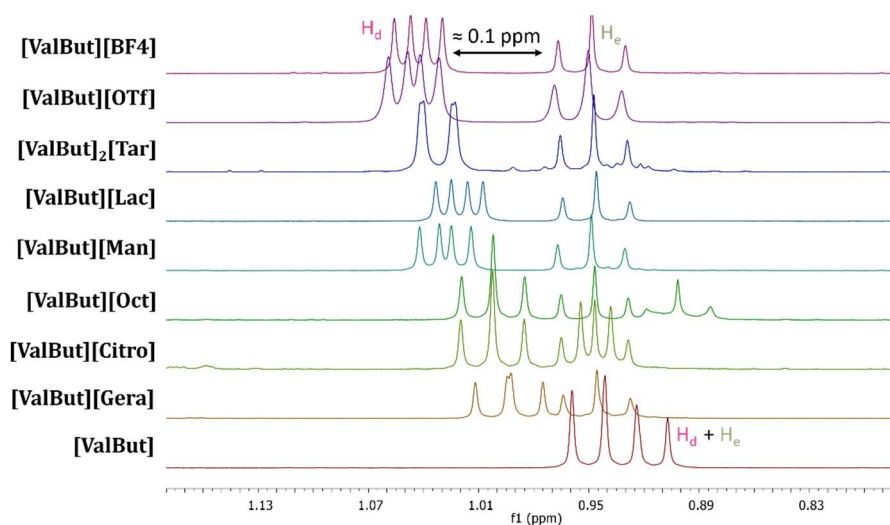


Figura 4.12. Efecto sobre el desplazamiento de los protones H_d y H_e mediante el estudio de RMN (CD_3OD , 75 mM, $T:30^\circ C$).

Para los compuestos obtenidos para la familia de derivados de ValBn se observó un comportamiento similar respecto del desplazamiento químico (Figura 4.13). El análisis se basó en el seguimiento de los protones característicos ya identificados para la familia ValBut.

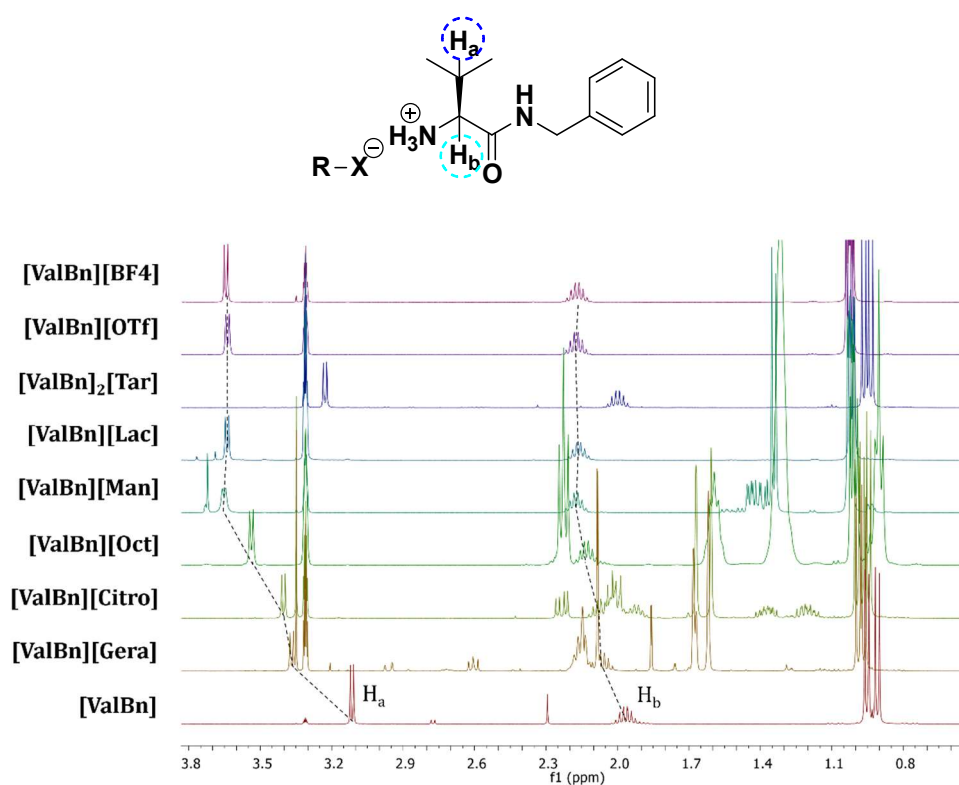


Figura 4.13. Estructura general de la familia ValBn y efecto sobre el desplazamiento de los protones H_a y H_b mediante el estudio de RMN (CD_3OD , 75 mM, $T:30^\circ C$).

De igual modo, los cambios de desplazamiento químico a campos más bajos son mayores para el protón del carbono quiral (H_b) que para el protón isopropílico (H_a). Los valores de $\Delta\delta$ son similares a los observados en la familia ValBut, teniendo cambios de hasta 0.5 ppm para el protón H_b y de 0.2 ppm para el protón H_a , respectivamente. No obstante, se evidencia que el líquido iónico derivado del ácido tartárico no muestra la misma tendencia observada para la familia ValBut y su cambio de desplazamiento químico es mucho menor, siendo más próximo a la forma libre.

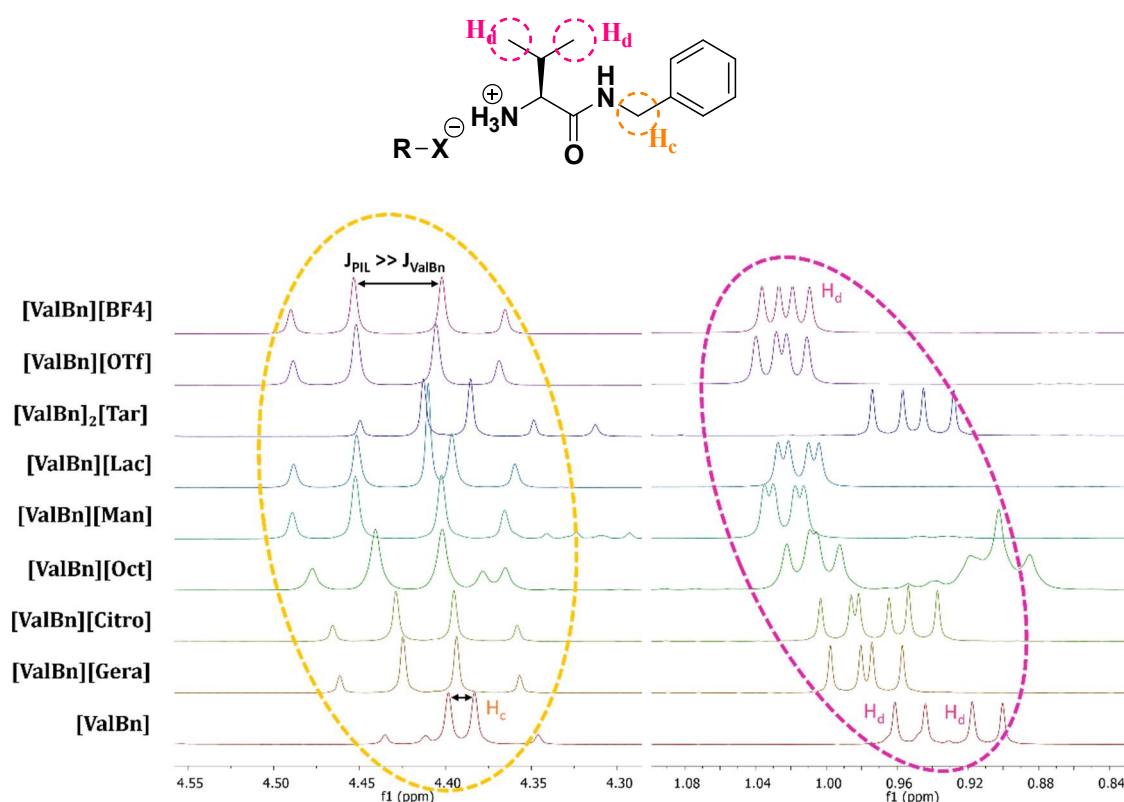


Figura 4.14. Estructura general de la familia ValBn y efecto sobre el desplazamiento de los protones H_c y H_d mediante el estudio de RMN (CD_3OD , 75 mM, $T:30^\circ C$).

En cuanto a otras señales características, los protones H_c próximos al grupo $-NH-$ de la amida muestran tanto un cambio asociado al desplazamiento químico como un cambio en la equivalencia magnética asociada a la constante de acoplamiento (de 6 a 20 Hz), ya que la modificación del entorno viene generada por la presencia del protón ácido en la formación del líquido iónico prótico (Figura 4.14). Asimismo, los protones metílicos H_d procedentes de la L-valina muestran cambios de equivalencia química y se repite un patrón similar al observado para la familia ValBut. En este caso, el efecto se aprecia con mayor claridad debido a la ausencia de solapamiento por señales de similar desplazamiento químico.

Finalmente, la familia de derivados de ProBut se estudió con un número reducido de los ácidos propuestos. En este caso, se prepararon compuestos próticos con los siguientes ácidos: tártrico, mandélico, láctico, citronélico y geránico. El análisis de ^1H -RMN se basó en el seguimiento del protón (H_b) característico del carbono quiral asociado a este tipo de aminoácido.

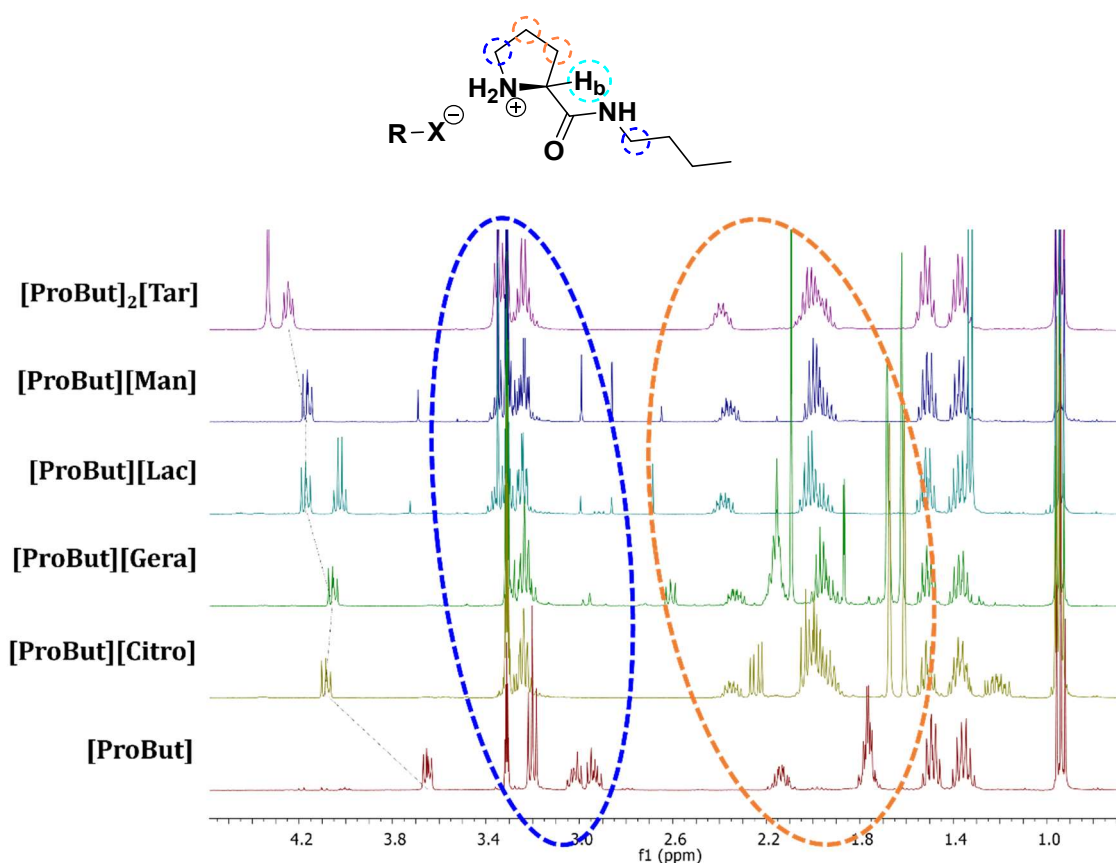


Figura 4.15. Estructura general de la familia ProBut y efecto sobre el desplazamiento del protón H_b mediante el estudio de RMN (CD_3OD , 75 mM, T:30°C).

En la Figura 4.15 se observa la formación de los compuestos próticos derivados de la butilamida de L-prolina debido al desplazamiento químico a campos más bajos bien definido para el protón (H_b) del carbono quiral. Los cambios de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) muestran un rango entre 0.4-0.6 ppm siendo mayores que los observados para los derivados de L-valina. En general, se puede apreciar en la zona entre 1.8-3.4 ppm un desplazamiento químico a campos más bajos para los protones metilénicos del anillo de la L-prolina y la cadena lateral, el cual puede asociarse a una mayor restricción conformacional por la formación de puentes de hidrógeno como se ha observado para los PILs derivados de la L-valina.

4.1.6 Evaluación del efecto asociado a la constante de acidez (K_a)

Las propiedades de los PILs dependen en gran medida del grado de transferencia del protón desde el ácido a la base, así como los posibles enlaces de hidrógeno en que están involucrados los protones adicionales presentes en la amina.

En general, se considera que un PIL es una sal “pura” cuando la transferencia de protón es al menos del 99 %.^{29,30} En medio acuoso una diferencia en pK_a de los precursores ($\Delta pK_a = [pK_a(\text{BH}^+) - pK_a(\text{HA})]$, donde HA y B equivalen a precursores ácido y básico), de cerca de cuatro debería ser suficiente para producir una transferencia completa de protón. Sin embargo, en la literatura, para la formación de PILs existen discrepancias en cuanto a que valor de ΔpK_a corresponde con una transferencia completa de protón. Así, Angell y colaboradores establecieron un valor de $\Delta pK_a > 10$ para asegurar la transferencia completa del protón y, por tanto, un PIL altamente iónico.³¹ Sin embargo, otros autores defienden que un valor de $\Delta pK_a = 4$ en ciertos sistemas es suficiente para conseguir una transferencia completa.³²

La situación es aún más compleja si se considera la naturaleza de la base. Así, para diferentes aminas primarias y terciarias con similares valores de pK_a se observa diferente grado de transferencia de protón cuando se neutralizan con un ácido común como es el ácido acético.³² Así, las aminas primarias presentan frente a las aminas terciarias un mayor grado de ionicidad, al ser la transferencia de protón más completa en el primer caso que en el segundo. Es decir, PILs basados en aminas primarias tienen una mayor tendencia a un comportamiento análogo al que se da en soluciones acuosas. Esta diferencia parece estar relacionada con la capacidad para formar enlaces de hidrógeno del catión básico. Así, en el caso de las aminas terciarias, solo es posible la formación de estas interacciones a través de un protón con el anión, mientras que las aminas primarias presentan varios protones para formar enlaces de hidrógeno.

²⁹ Nuthakki, B.; Greaves, T. L.; Krodkiwska, I.; Weerawardena, A.; Burgar, M. I.; Mulder, R. J.; Drummond, C. J. Protic Ionic Liquids and Ionicity. *Australian Journal of Chemistry* **2007**, *60* (1), 21-28.

³⁰ MacFarlane, D. R.; Seddon, K. R. Ionic Liquids Progress on the Fundamental Issues. *Australian Journal of Chemistry* **2007**, *60* (1), 3-5.

³¹ Yoshizawa, M.; Xu, W.; Angell, C. A. Ionic Liquids by Proton Transfer: Vapor Pressure, Conductivity, and the Relevance of ΔpK_a from Aqueous Solutions. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (50), 15411-15419.

³² Stoimenovski, J.; Izgorodina, E. I.; MacFarlane, D. R. Ionicity and proton transfer in protic ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12* (35), 10341-10347.

Por último, se debe tener en cuenta que la ionicidad también puede verse afectada por otros efectos que no son las interacciones coulómbicas entre el anión y catión. Por ejemplo, efectos de solvatación entre los grupos alquilo de cadena más larga provocan la aparición de interacciones hidrofóbicas, o la presencia de grupos funcionales adicionales en catión o anión, que puedan formar enlaces de hidrógeno. Estas interacciones adicionales pueden tener un efecto significativo sobre la ionicidad del PIL.^{33,34,35,36}

En vista de esto, es importante establecer el ΔpK_a para los sistemas aquí desarrollados con el fin de determinar cómo puede afectar el ΔpK_a en el grado de ionicidad. De este modo, se procedió, en primer lugar, a calcular el pK_a de las α,β -aminoamidas utilizadas. Para ello, se realizaron las titulaciones potenciométricas de los precursores básicos (ValBut, ValBn y ProBut). Los resultados de los valores de pK_a obtenidos en estas valoraciones se muestran en la Figura 4.16, donde se representa el diagrama de distribución de las especies de estas moléculas en función del pH.

³³ Stoimenovski, J.; Dean, P. M.; Izgorodina, E. I.; MacFarlane, D. R. Protic pharmaceutical ionic liquids and solids: Aspects of protonics. *Faraday Discussions* **2012**, *154* (0), 335-352.

³⁴ Miran, M. S.; Hoque, M.; Yasuda, T.; Tsuzuki, S.; Ueno, K.; Watanabe, M. Key factor governing the physicochemical properties and extent of proton transfer in protic ionic liquids: ΔpK_a or chemical structure? *Physical Chemistry Chemical Physics* **2019**, *21* (1), 418-426.

³⁵ Cui, Y.; Yin, J.; Li, C.; Li, S.; Wang, A.; Yang, G.; Jia, Y. Experimental and theoretical studies on compositions, structures, and IR and NMR spectra of functionalized protic ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18* (29), 19731-19737.

³⁶ Le Donne, A.; Adenusi, H.; Porcelli, F.; Bodo, E. Hydrogen Bonding as a Clustering Agent in Protic Ionic Liquids: Like-Charge vs Opposite-Charge Dimer Formation. *ACS Omega* **2018**, *3* (9), 10589-10600.

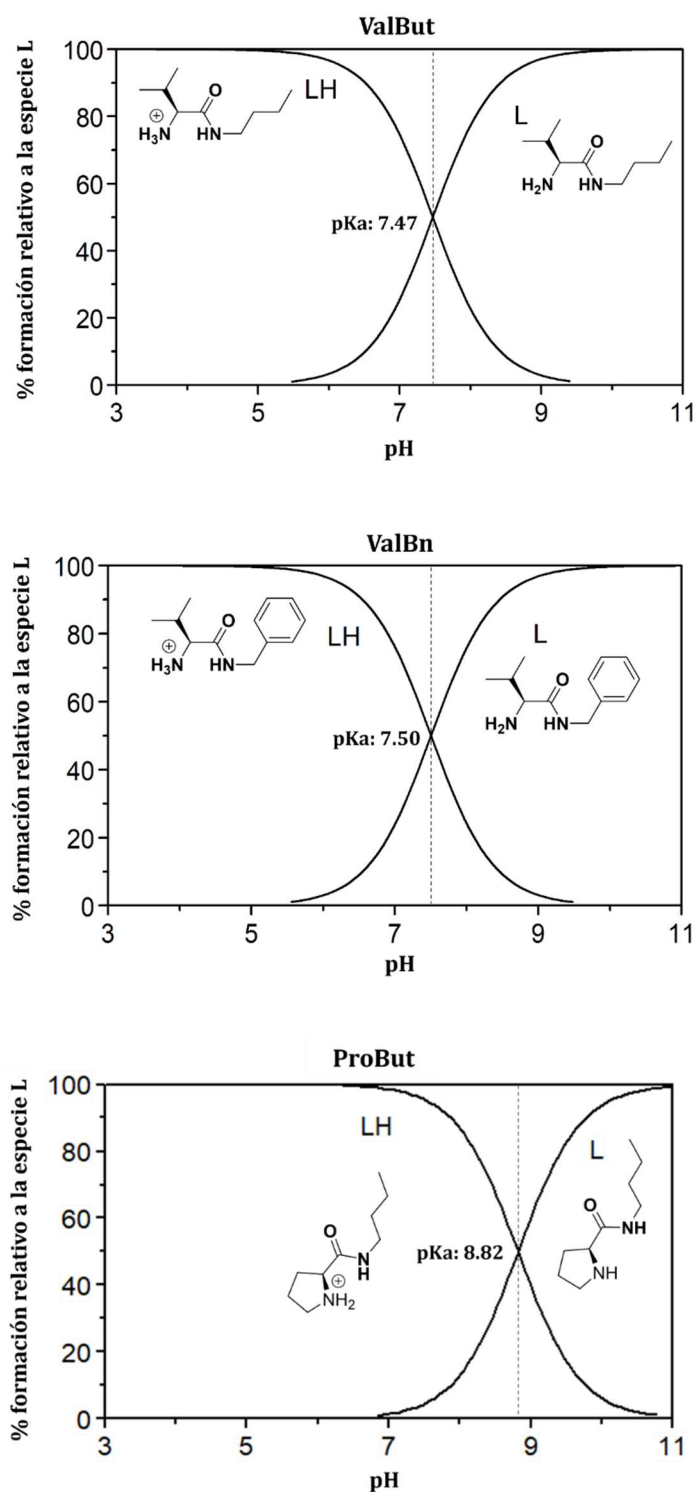


Figura 4.16. Diagramas de distribución para las especies ValBut, ValBn y ProBut como función del pH en NaCl 0.1M.

Los dos tipos de α,β -aminoamidas derivadas del aminoácido L-valina son bases débiles con valores similares de pK_a (7.47 para ValBut y 7.50 para ValBn). A partir de los resultados experimentales, se concluye que no hay influencia estructural en la constante de disociación

independientemente de la presencia de la cadena alifática o del anillo aromático. Por otro lado, el tipo de aminoácido tiene un efecto considerable en el valor de pK_a de la α,β -aminoamida, ya que el derivado de L-prolina es una amina secundaria y muestra un pK_a de 8.82, con una diferencia superior a la unidad respecto de su análogo con el aminoácido L-valina. Una vez obtenidos los valores de pK_a asociados a las bases, se puede decir que existen unos valores de $\Delta pK_a = [pK_a(BH^+) - pK_a(HA)]$, de entre 2-8 para los diferentes PILs obtenidos en función del ácido empleado.

Davidowski y colaboradores demostraron que se puede establecer mediante el empleo de la espectroscopia de 1H -RMN una relación entre los entornos de los protones de los PILs y el grado de transferencia mediante el seguimiento del desplazamiento químico y las constantes de acoplamiento de los PILs.³⁷ Así, cabría esperar que a medida que aumenta el pK_a del ácido empleado se produzca una mayor transferencia y, por tanto, un sistema de mayor ionicidad que se vea reflejado en el desplazamiento químico de las señales características de la α,β -aminoamida. En nuestro caso, en la sección 4.1.5, se observó como la interacción entre la α,β -aminoamida y los diferentes ácidos afecta al entorno químico de algunas de las señales características de esta, el cual se refleja en un desplazamiento de las señales en función de la naturaleza del ácido. Así, en la Figura 4.10, Figura 4.13 y Figura 4.15 se observaba claramente el desplazamiento del protón del carbono quiral de la α,β -aminoamida a campos más bajos en comparación con la base libre.

De hecho, cuando se representa gráficamente la variación de este desplazamiento observado para los diferentes PILs de la familia de ValBut y ProBut (Figura 4.17) en función de ΔpK_a se observa que a mayor ΔpK_a , la variación en el desplazamiento químico es mayor. Estos resultados indican una tendencia general que muestra una fuerte correlación entre el desplazamiento químico del protón y la acidez (pK_a) del ácido utilizado para la síntesis de los PILs.

³⁷ Davidowski, S. K.; Thompson, F.; Huang, W.; Hasani, M.; Amin, S. A.; Angell, C. A.; Yarger, J. L. NMR Characterization of Ionicity and Transport Properties for a Series of Diethylmethylamine Based Protic Ionic Liquids. *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, *120* (18), 4279-4285.

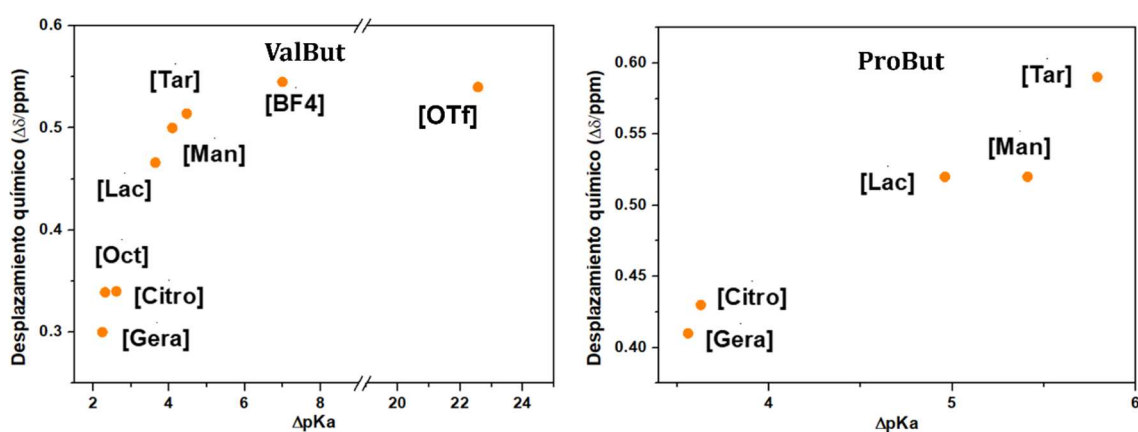


Figura 4.17. Efecto del ΔpK_a sobre el desplazamiento químico del protón H_b para las familias ValBut y ProBut.

En este sentido, se puede suponer una mayor ionicidad, con una transferencia de protón prácticamente completa para las especies derivadas del ácido mandélico, tártrico, tetrafluorobórico y tríflico, ya que ΔpK_a es cercana o superior a 4. En el caso de la familia derivada de ProBut, se observan diferencias tanto en los cambios de desplazamiento químico como en ΔpK_a dándose incrementos superiores en valor para ambos parámetros. Así por ejemplo, una mayor ionicidad o proximidad a la ionicidad completa se puede esperar para las especies derivadas de ácido citrónico o geránico en comparación con las mezclas con derivados de L-prolina.

4.1.7 Estudio de ionicidad de líquidos iónicos próticos mediante 1H -RMN

Como se ha mencionado anteriormente, para los PILs la reacción de transferencia de protón depende de la naturaleza del ácido y la base que los forman. Si el ácido precursor o base es muy fuerte, el equilibrio de formación de PILs se desplazará hacia la derecha, lo que conducirá a un IL compuesto casi en su totalidad por iones. Sin embargo, en los PILs que consisten en ácidos y bases débiles, es posible que la reacción no sea completa, lo que da como resultado un estado de equilibrio que es una solución de iones y especies neutras.

Algunos autores han observado que para ciertos PILs existe una transferencia incompleta de protones o un bajo grado de ionicidad.¹⁷ La ionicidad del líquido iónico es clave para algunas aplicaciones. Así, por ejemplo, propiedades como la biodisponibilidad o la farmacocinética dependerán tanto del grado de transferencia de protones del ácido a la base como de la formación de puentes de hidrógeno entre el catión y el anión.³⁸

³⁸ Cruz-Cabeza, A. J. Acid-base crystalline complexes and the pKa rule. *CrystEngComm* **2012**, *14* (20), 6362-6365.

Una ionicidad reducida puede mejorar la biodisponibilidad de PILs que empleen fármacos como ácido o base en su formulación, ya que las especies menos ionizadas pueden cruzar la barrera de la membrana biológica más fácilmente que las especies más iónicas.^{39,40,41} Sin embargo, Achinivu y colaboradores sugieren que cuando los PILs se quieren emplear como disolvente para la extracción de la lignina un elevado grado de ionicidad contribuye a mejorar la eficiencia de la extracción.⁴²

La Figura 4.18 recoge los modelos estructurales propuestos suponiendo un grado de alta ionicidad con fuerzas intermoleculares predominantes de carácter iónico y de baja ionicidad basado principalmente en interacciones o puentes de hidrógeno con predominancia de especies moleculares. De este modo, las tres posibilidades esperadas son: i) combinaciones en su mayoría ionizadas (HB^+A^-), ii) una mezcla de especies ionizadas (HB^+A^-), y complejos de protón compartido ($\text{B}-\text{HA}$), y iii) en su mayoría complejo de ácido y base de especies moleculares neutras o no ionizadas.

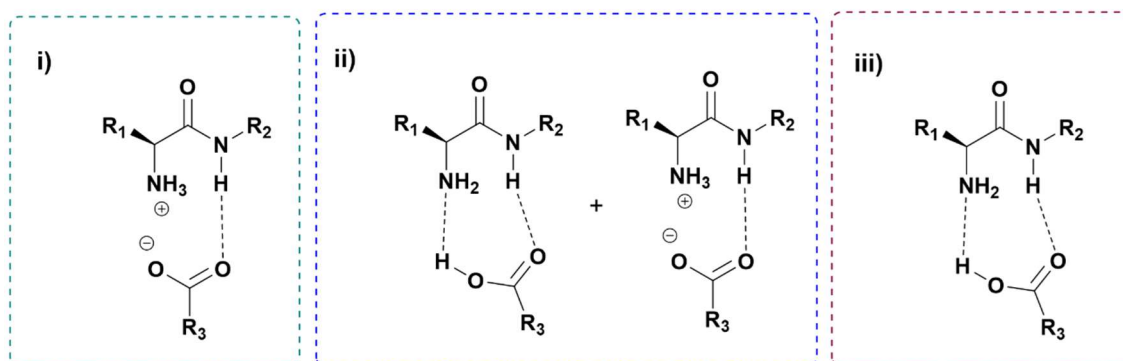


Figura 4.18. Modelos estructurales propuestos según el grado de ionicidad.

Consecuentemente, conocer la ionicidad de los PILs es esencial para explicar su comportamiento y propiedades. Sin embargo, hasta la fecha no se ha establecido ningún método "estándar" para su determinación. De igual modo, no se ha establecido una clasificación de lo que puede considerarse como un "líquido iónico protico puro". Existen diferentes metodologías para estimar el grado de ionicidad de los líquidos iónicos

³⁹ Hough, W. L.; Smiglak, M.; Rodríguez, H.; Swatloski, R. P.; Spear, S. K.; Daly, D. T.; Pernak, J.; Grisel, J. E.; Carliss, R. D.; Soutullo, M. D.; et al. The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients. *New Journal of Chemistry* **2007**, 31 (8), 1429-1436.

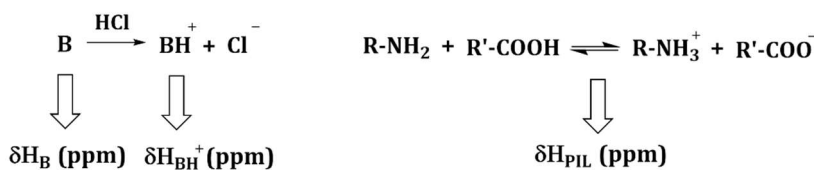
⁴⁰ Md Moshikur, R.; Chowdhury, M. R.; Moniruzzaman, M.; Goto, M. Biocompatible ionic liquids and their applications in pharmaceuticals. *Green Chemistry* **2020**, 22 (23), 8116-8139.

⁴¹ Stoimenovski, J.; MacFarlane, D. R. Enhanced membrane transport of pharmaceutically active protic ionic liquids. *Chemical Communications* **2011**, 47 (41), 11429-11431.

⁴² Achinivu, E. C.; Howard, R. M.; Li, G.; Gracz, H.; Henderson, W. A. Lignin extraction from biomass with protic ionic liquids. *Green Chemistry* **2014**, 16 (3), 1114-1119.

próticos.⁴³ La mayoría de estas metodologías ofrecen una visión cualitativa de la formación de especies iónicas, interacciones intermoleculares y características, las cuáles pueden utilizarse para estimar el grado de transferencia del protón. Estas incluyen entre otras, los diagramas de Walden,³³ que relacionan la conductividad y la fluidez del medio,⁴⁴ la conductividad,⁴⁵ la espectroscopia IR¹⁶ o las técnicas térmicas.⁴⁶ En este contexto, la espectroscopia de ^1H -RMN se ha mostrado particularmente útil por su capacidad cuantitativa para sondear entornos de protones, mediante la variación de los desplazamientos químicos ($\Delta\delta$) y constantes de acoplamiento (J) para determinar el grado de transferencia de protones.^{47,48} En particular, podemos destacar el trabajo de Elguero y colaboradores que reportaron una metodología basada en la espectroscopia de RMN que permite estimar la ionicidad de líquidos iónicos formados por ácidos y bases de Brønsted.⁴⁹ En esta metodología el porcentaje de ionicidad de un sistema se calcula y estima a partir de la ecuación descrita en el Esquema 4.2.

$$\text{Ionicidad}_{\text{PIL}} (\%) = (\delta H_{\text{PIL}} - \delta H_{\text{B}}) \cdot 100 / (\delta H_{\text{BH}^+} - \delta H_{\text{B}})$$



Esquema 4.2. Equilibrio químico para base libre (B), sal iónica (BH⁺) y compuesto prótico (PIL).

Siguiendo lo establecido en esta metodología, se han realizado los espectros de protón en DMSO- d_6 tanto de la base como amina libre (B), de la base·neutralizada con HCl (BH⁺) y la familia de derivados sintetizados empleando las α,β -aminoamidas como base (ValBut,

⁴³ Nordness, O.; Brennecke, J. F. Ion Dissociation in Ionic Liquids and Ionic Liquid Solutions. *Chemical Reviews* **2020**, *120* (23), 12873-12902.

⁴⁴ Belieres, J.-P.; Angell, C. A. Protic Ionic Liquids: Preparation, Characterization, and Proton Free Energy Level Representation. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111* (18), 4926-4937.

⁴⁵ Noda, A.; Susan, M. A. B. H.; Kudo, K.; Mitsushima, S.; Hayamizu, K.; Watanabe, M. Brønsted Acid–Base Ionic Liquids as Proton-Conducting Nonaqueous Electrolytes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (17), 4024-4033.

⁴⁶ Xu, W.; Angell, C. A. Solvent-Free Electrolytes with Aqueous Solution-Like Conductivities. *Science* **2003**, *302* (5644), 422-425.

⁴⁷ Overbeck, V.; Ludwig, R. Chapter Three - NMR Studies of Protic Ionic Liquids. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Webb, G. A. Ed.; Vol. 95; Academic Press, 2018; pp 147-190.

⁴⁸ Chen, K.; Wang, Y.; Yao, J.; Li, H. Equilibrium in Protic Ionic Liquids: The Degree of Proton Transfer and Thermodynamic Properties. *The Journal of Physical Chemistry B* **2018**, *122* (1), 309-315.

⁴⁹ Moreira, D. N.; Fresno, N.; Pérez-Fernández, R.; Frizzo, C. P.; Goya, P.; Marco, C.; Martins, M. A. P.; Elguero, J. Brønsted acid–base pairs of drugs as dual ionic liquids: NMR ionicity studies. *Tetrahedron* **2015**, *71* (4), 676-685.

ValBn y ProBut) y diferentes ácidos con el fin de establecer su ionicidad según la naturaleza del ácido empleado. Los desplazamientos químicos para la señal del protón H_b del carbono quiral, identificado previamente en el apartado 4.1.5, obtenidos para α,β -aminoamida (B), su sal iónica con HCl (BH^+) y los diferentes PILs se resumen en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Desplazamientos químicos del protón H_b para B, base-HCl y PILs en DMSO- d_6

| | <u>ValBut</u> | | <u>ValBn</u> | | <u>ProBut</u> | |
|------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| | δH_B (ppm) | δH_{BH^+} (ppm) | δH_B (ppm) | δH_{BH^+} (ppm) | δH_B (ppm) | δH_{BH^+} (ppm) |
| | 2.89 | 3.28 | 3.00 | 3.42 | 3.49 | 3.92 |
| Gera | | | | | | |
| δH_{PIL} (ppm) | 2.92 | | 2.99 | | 3.69 | |
| Citro | | | | | | |
| δH_{PIL} (ppm) | 2.90 | | 2.99 | | 3.75 | |
| Oct | | | | | | |
| δH_{PIL} (ppm) | 2.91 | | 2.99 | | - | |
| Lac | | | | | | |
| δH_{PIL} (ppm) | 3.15 | | 3.20 | | 3.78 | |
| Man | | | | | | |
| δH_{PIL} (ppm) | 3.31 | | 3.39 | | 3.90 | |
| BF₄ | | | | | | |
| δH_{PIL} (ppm) | 3.45 | | 3.56 | | - | |

Tabla 4.6. Grado de ionicidad y porcentaje de especies ionizadas y no ionizadas para los PILs.

| | pK_a | <u>ValBut</u> | <u>ValBn</u> | <u>ProBut</u> |
|--|--------|---------------|--------------|---------------|
| | | 7.50 | 7.47 | 8.82 |
| Ácido Geránico (Gera) | 5.26 | | | |
| ΔpK_a | | 2.24 | 2.21 | 3.56 |
| % ionizado | | 7 | <1 | 51 |
| % no ionizado | | 93 | >99 | 49 |
| Ácido Citronélico (Citro) | 5.19 | | | |
| ΔpK_a | | 2.31 | 2.28 | 3.63 |
| % ionizado | | 3 | <1 | 46 |
| % no ionizado | | 97 | >99 | 54 |
| Ácido Octanóico (Oct) | 4.89 | | | |
| ΔpK_a | | 2.61 | 2.58 | - |
| % ionizado | | 5 | <1 | - |
| % no ionizado | | 95 | >99 | - |
| Ácido Láctico (Lac) | 3.86 | | | |
| ΔpK_a | | 3.64 | 3.61 | 4.96 |
| % ionizado | | 66 | 47 | 67 |
| % no ionizado | | 34 | 53 | 33 |
| Ácido Mándelico (Man) | 3.41 | | | |
| ΔpK_a | | 4.09 | 4.06 | 5.41 |
| % ionizado | | >99 | 93 | 95 |
| % no ionizado | | <1 | 7 | 5 |
| Ácido fluorobórico (BF₄) | -0.4 | | | |
| ΔpK_a | | 7.00 | 6.97 | - |
| % ionizado | | >99 | >99 | - |
| % no ionizado | | <1 | <1 | - |

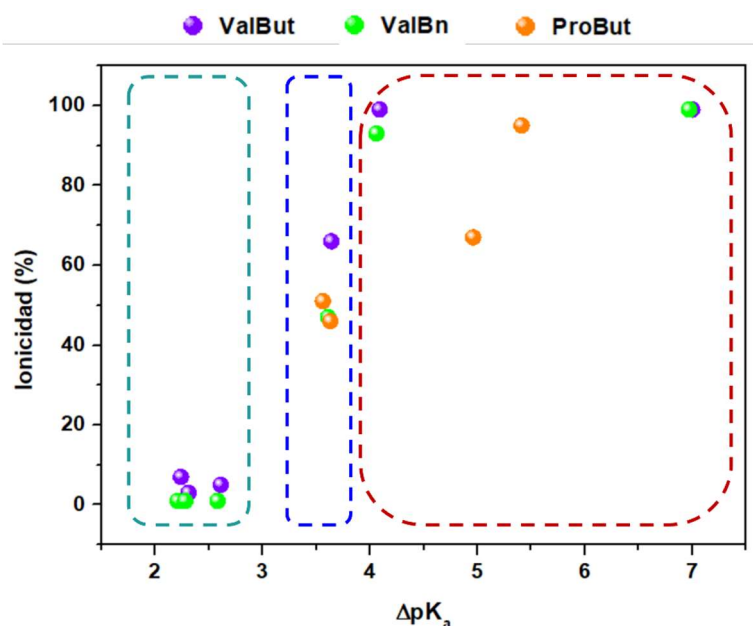


Figura 4.19. Representación de regiones a partir de la relación entre la ionicidad de los PILs y ΔpK_a . Especies moleculares no ionizadas (zona verde), especies ionizadas y no ionizadas (zona azul) y especies ionizadas (zona roja).

En la Tabla 4.6. se reportan los porcentajes de especies ionizadas y no ionizadas para los diferentes PILs estudiados junto con el ΔpK_a y el pK_a de los diferentes ácidos empleados. La Figura 4.19 representa los valores de la Tabla 4.6 para una mejor interpretación de estos. En esta representación se observa a un mayor ΔpK_a , como cabría esperar, una tendencia mayor a la ionicidad o a un mayor porcentaje iónico de especies. Por otro lado, se pueden observar tres zonas claramente diferenciadas. Una primera región de nula o baja ionicidad asociada a ΔpK_a con valores entre 0-2.5, una segunda región con mezcla de especies moleculares e ionizadas para ΔpK_a con valores entre 3-4 y, finalmente, una tercera región correspondiente a la ionicidad completa para ΔpK_a con valores superiores a 4. En relación con lo propuesto en la bibliografía, se observa que $\Delta pK_a=4$ no es suficiente para una completa ionicidad en algunas combinaciones de ácidos y bases como la mezcla del ácido láctico con el derivado de L-prolina. Este efecto puede estar influenciado por el tipo de amina, ya que la transferencia de protones es más completa en aminas primarias (L-valina) que en aminas secundarias (L-prolina) o terciarias. Este efecto se atribuye a la capacidad de enlace de hidrógeno de los iones de amonio para proporcionar un buen entorno de solvatación para los iones producidos por la transferencia de protones.⁵⁰ En el caso de la

⁵⁰ Stoimenovski, J.; Izgorodina, E. I.; MacFarlane, D. R. Ionicity and proton transfer in protic ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12* (35), 10341-10347.

amina terciaria, el único protón transferido está disponible para el enlace de hidrógeno con el anión, mientras que el catión de la amina primaria puede ofrecer múltiples sitios de enlaces de hidrógeno. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que interacciones intermoleculares adicionales derivados de largas cadenas de alquilo, interacciones π - π y otros enlaces de hidrógeno como la funcionalidad, -OH, por ejemplo, pueden alterar fácilmente estas tendencias.⁵¹ No obstante, un mayor ΔpK_a debido a un carácter más básico de la L-prolina conlleva que las combinaciones con ácido geránico y citronélico muestren diferencias notables en los porcentajes de especies observadas, ya que la baja o casi nula ionicidad en combinación con los derivados de ValBut y ValBn no se observa para los derivados de ProBut. Por otro lado, el efecto de la cadena introducida en la formación del enlace amida no tiene una influencia o efecto relevante en la transferencia del protón o el grado de ionicidad.

4.1.8 Estudios ecotoxicológicos de líquidos iónicos próticos

La legislación actual de la Unión Europea relativa al registro, evaluación, autorización y restricción de productos químicos (REACH, 2006) impone la evaluación de seguridad de nuevos productos químicos en la que se incluyen perfiles ecotoxicológicos y de biodegradación.⁵² A menudo se afirma que los ILs son compuestos "respetuosos con el medio ambiente". Sin embargo, tienen el potencial de causar efectos adversos si se filtran al medio ambiente, como por ejemplo, si se derraman debido a errores humanos o errores técnicos. Para estimar los riesgos de los ILs, en las últimas décadas, se ha evaluado la toxicidad de un número significativo de ILs para varios microorganismos y macroorganismos.⁵³ Estos estudios apuntan una serie de problemas relacionados con su síntesis, toxicidad y biodegradabilidad, lo que confiere una serie de dudas desde el punto de vista ambiental.⁵⁴ En relación a los PILs, existe la idea generalizada de que los PILs deberían ser menos tóxicos que los ILs apróticos,⁵⁵ pero esto no tiene por qué ser así. En general,

⁵¹ Deng, Y.; Yao, J.; Li, H. Effects of ionicity and chain structure on the physicochemical properties of protic ionic liquids. *AIChE Journal* **2020**, *66* (10), 16982.

⁵² Oliveira, M. V. S.; Vidal, B. T.; Melo, C. M.; de Miranda, R. d. C. M.; Soares, C. M. F.; Coutinho, J. A. P.; Ventura, S. P. M.; Mattedi, S.; Lima, Á. S. (Eco)toxicity and biodegradability of protic ionic liquids. *Chemosphere* **2016**, *147*, 460-466.

⁵³ Beil, S.; Markiewicz, M.; Pereira, C. S.; Stepnowski, P.; Thöming, J.; Stolte, S. Toward the Proactive Design of Sustainable Chemicals: Ionic Liquids as a Prime Example. *Chemical Reviews* **2021**, *121* (21), 13132-13173.

⁵⁴ de Jesus, S. S.; Maciel Filho, R. Are ionic liquids eco-friendly? *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2022**, *157*, 112039.

⁵⁵ Peric, B.; Sierra, J.; Martí, E.; Cruañas, R.; Garau, M. A. A comparative study of the terrestrial ecotoxicity of selected protic and aprotic ionic liquids. *Chemosphere* **2014**, *108*, 418-425.

líquidos iónicos derivados de biocompuestos como colina y aminoácidos presentan perfiles de toxicidad baja tanto para los humanos, como para el medio ambiente.⁵⁶ Nuestros sistemas, al ser estructuralmente relacionados con estos, podrían presentar una toxicidad reducida. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la combinación de un anión y catión no tóxicos no garantiza que su sal no lo sea. Con el fin de realizar un cribado inicial que nos permitiera establecer el perfil toxicológico de algunos de nuestros sistemas se recurrió al "método de difusión en agar".⁵⁷ La prueba de difusión en agar es un método simple y efectivo para detectar la toxicidad causada por líquidos iónicos en función de su capacidad para inhibir el crecimiento de un determinado microorganismo. Como se indica en la Figura 4.20 se trata de impregnar la sustancia a evaluar a una concentración conocida en discos de papel de filtro y luego colocarlos en una superficie. En dicha superficie, se inocula una cantidad estandarizada de bacterias, sembrándolas de forma uniforme para obtener después de la inoculación un "césped" bacteriano. Después de un período de incubación, si la sustancia a evaluar es inhibidora, aparece una zona clara sin crecimiento alrededor del disco y el diámetro está relacionado con la toxicidad.

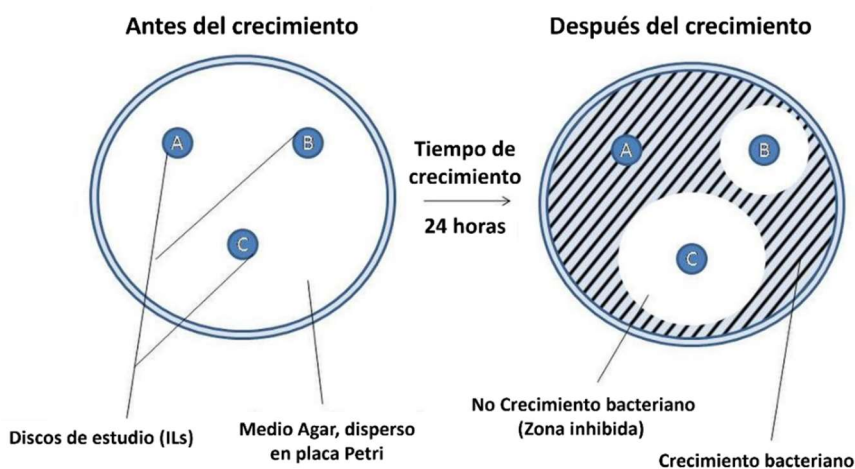


Figura 4.20. Representación de un ensayo ecotoxicológico de difusión en agar

En este sentido, los PILs diseñados se evaluaron toxicológicamente utilizando E.Coli como microorganismo. Para esta evaluación, todas las placas se incubaron durante la noche a 37 °C y se registró el radio de la zona de inhibición alrededor del papel de filtro impregnado con el PIL. Cada PIL se estudió por quintuplicado y las zonas de inhibición citadas son el

⁵⁶ Gouveia, W.; Jorge, T. F.; Martins, S.; Meireles, M.; Carolino, M.; Cruz, C.; Almeida, T. V.; Araújo, M. E. M. Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials. *Chemosphere* **2014**, *104*, 51-56.

⁵⁷ Ventura, S. P. M.; de Barros, R. L. F.; Sintra, T.; Soares, C. M. F.; Lima, A. S.; Coutinho, J. A. P. Simple screening method to identify toxic/non-toxic ionic liquids: agar diffusion test adaptation. *Ecotoxicology and environmental safety* **2012**, *83*, 55-62.

promedio de las cinco réplicas. Como referencia, se realizó el procedimiento empleando un líquido iónico de fosfonio (bromuro de tetrabutilfosfonio) de efecto tóxico conocido.

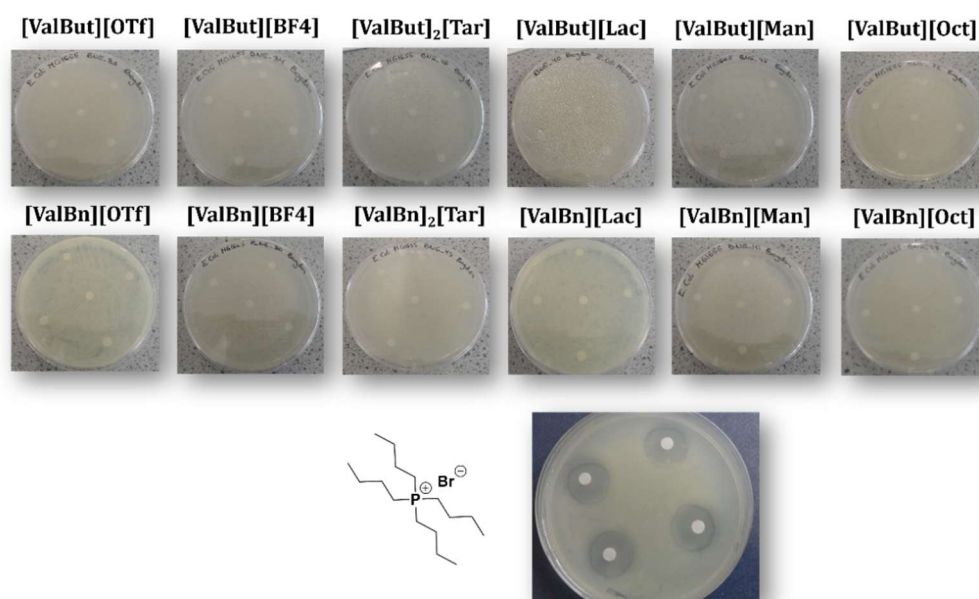


Figura 4.21. Resultados de la prueba de difusión en agar para una serie de compuestos de la familia ValBut y ValBn.

El análisis inicial de toxicidad se realizó en los PILs derivados de L-Valina obtenidos en la primera fase del trabajo experimental. En este estudio no se incluyeron los derivados obtenidos con los ácidos geránico y citronélico. Los resultados obtenidos para los PILs estudiados, que se muestran en la Figura 4.21 y la Tabla 4.7, muestran que el bloque de construcción seleccionado para construir nuevos líquidos iónicos prácticos no es tóxico para la cepa de *E. coli* en el rango de concentración probado, a diferencia de los líquidos iónicos comunes basados en imidazolio muestran tendencias claras en su toxicidad cuando se prueban en las mismas condiciones.^{58,59,60} Este cribado inicial sugiere que los PILs basados en α,β -aminoamidas derivados de aminoácidos podrían presentar un perfil toxicológico reducido para la salud humana.

⁵⁸ Rebros, M.; Gunaratne, H. Q. N.; Ferguson, J.; Seddon, K. R.; Stephens, G. A high throughput screen to test the biocompatibility of water-miscible ionic liquids. *Green Chemistry* **2009**, *11* (3), 402-408.

⁵⁹ Paul, C. E.; Gotor-Fernández, V.; Lavandera, I.; Montejo-Bernardo, J.; García-Granda, S.; Gotor, V. Chemoenzymatic preparation of optically active 3-(1H-imidazol-1-yl)cyclohexanol-based ionic liquids: application in organocatalysis and toxicity studies. *RSC Advances* **2012**, *2* (16), 6455-6463.

⁶⁰ Wood, N.; Ferguson, J. L.; Gunaratne, H. Q. N.; Seddon, K. R.; Goodacre, R.; Stephens, G. M. Screening ionic liquids for use in biotransformations with whole microbial cells. *Green Chemistry* **2011**, *13* (7), 1843-1851.

Tabla 4.7. Resultados de pruebas de ecotoxicidad de líquidos iónicos próticos mediante el método de difusión en Agar

| Líquido iónico prótico | Peso de PIL sobre disco (mg) | Tamaño de zona de inhibición (mm) |
|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| [ValBut][OTf] | 7.87 | <1 |
| [ValBut][BF4] | 5.42 | <1 |
| [ValBut][Oct] | 6.15 | <1 |
| [ValBut][Lac] | 11.71 | <1 |
| [ValBut][Man] | 7.52 | <1 |
| [ValBut] ₂ [Tar] | 9.33 | <1 |
| [ValBn][OTf] | 6.90 | <1 |
| [ValBn][BF4] | 8.27 | <1 |
| [ValBn][Oct] | 6.67 | <1 |
| [ValBn][Lac] | 10.88 | <1 |
| [ValBn][Man] | 7.37 | <1 |
| [ValBn] ₂ [Tar] | 6..76 | <1 |

4.1.9 Aplicación de PILs en desarrollo de materiales inteligentes

En los últimos años, el desarrollo de materiales inteligentes ha atraído la atención de los investigadores para la detección de analitos de interés en tiempo real. Entre otros compuestos, las aminas volátiles se utilizan a gran escala en la industria química para producir productos químicos destinados a la farmaceutica, agricultura (herbicidas o fertilizantes) o granjas avícolas.^{61,62,63} En este último caso, la directiva de la UE (Directiva del Consejo 2007/43/EC)⁶⁴ por la que se establecen las disposiciones mínimas para la protección de los pollos destinados a la producción de carne, fija que la concentración de

⁶¹ Jiang, W.-J.; Zhang, J.-B.; Zou, Y.-T.; Peng, H.-L.; Huang, K. Manufacturing Acidities of Hydrogen-Bond Donors in Deep Eutectic Solvents for Effective and Reversible NH₃ Capture. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2020**, *8* (35), 13408-13417.

⁶² Matheus, D.O.; Fernanda, C.S.; Jair, O.S.; Arele, A.C.; Ilda Fátima Ferreira, T.; Antônio, P.S.C. Ammonia Emission in Poultry Facilities: A Review for Tropical Climate Areas. *Atmosphere* **2021**, *12*, 1091.

⁶³ Ulrich, S.; Moura, S. O.; Diaz, Y.; Clerc, M.; Guex, A. G.; de Alaniz, J. R.; Martins, A.; Neves, N. M.; Rottmar, M.; Rossi, R. M.; et al. Electrospun colourimetric sensors for detecting volatile amines. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2020**, *322*, 128570.

⁶⁴ DIRECTIVA 2007/43/CE DEL CONSEJO de 28 de junio de 2007 por la que se establecen las disposiciones mínimas para la protección de los pollos destinados a la producción de carne, pp 19-28.

NH₃ no debe exceder las 20 ppm. Sin embargo, en la práctica, la concentración de NH₃ puede superar fácilmente las 30-70 ppm, especialmente en invierno. El nitrógeno no metabolizado se excreta como ácido úrico, amoníaco y urea debido a la conversión ineficiente, ya que los animales se alimentan con alimentos ricos en proteínas, los cuales contienen un excedente de nitrógeno para garantizar que se cumplan los requisitos nutricionales. Posteriormente, la acción microbiana convierte estos subproductos en amoníaco.⁶⁵ Debido a su naturaleza tóxica, la exposición excesiva mediante su liberación durante el proceso de putrefacción de alimentos o su exhalación directa durante una fuga o derrame en su punto de uso pueden generar riesgos toxicológicos graves para la salud humana y el medio ambiente, resultando en enfermedades severas o contaminación peligrosa. De este modo, se desea un método eficiente, rápido y económico para detectar estos compuestos debido a su naturaleza a menudo tóxica que afecta a muchos sistemas, como el sistema respiratorio, el sistema digestivo o el corazón o, incluso, existe la posibilidad de producir cáncer.^{66,67} Por ello, para monitorizar la detección y exposición, los sensores e indicadores colorimétricos con una fuerte respuesta visual son particularmente útiles, ya que pueden emplearse como pruebas de evaluación *in situ* en el punto de interés.⁶³

En el contexto de innovación, los ILs pueden ser considerados para el desarrollo de nuevos materiales o sistemas de detección. El ajuste de las propiedades fisicoquímicas los han convertido en alternativas interesantes para mejorar metodologías, gracias al diseño o la posible modulación estructural basada en combinaciones entre cationes y aniones.^{68,69,70}

4.1.9.1 Desarrollo de un material inteligente basado en PILs hidrofóbicos

Los intentos de desarrollar nuevos materiales para construir indicadores o sensores de gases están dirigidos a la mejora de las condiciones de funcionamiento en comparación con sistemas ópticos convencionales. Para el análisis, las matrices de sondas colorimétricas

⁶⁵ Gay, S.W.; Knowlton, K.F. Ammonia Emissions and Animal Agriculture; Virginia Cooperative Extension Biological Systems Engineering Publication: Blacksburg, VA, USA, 2005.

⁶⁶ Shalaby, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* **1996**, *29* (7), 675-690.

⁶⁷ Wang, L.; Ran, X.; Tang, H.; Cao, D. Recent advances on reaction-based amine fluorescent probes. *Dyes and Pigments* **2021**, *194*, 109634.

⁶⁸ Chang, A.; Li, H.-Y.; Chang, I. N.; Chu, Y.-H. Affinity Ionic Liquids for Chemoselective Gas Sensing. *Molecules* **2018**, *23* (9), 2380.

⁶⁹ Wasilewski, T. Chapter 10 - Ionic liquids in gas sensors and biosensors. In *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, Inamuddin, Asiri, A. M., Kanchi, S. Eds.; Elsevier, 2020; pp 287-318.

⁷⁰ Niranjana, T.; Chokkareddy, R.; Redhi, G. G.; Naidu, N. V. Chapter 11 - Ionic liquids as gas sensors and biosensors. In *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, Inamuddin, Asiri, A. M., Kanchi, S. Eds.; Elsevier, 2020; pp 319-342.

deben ser relativamente hidrofóbicas para evitar tanto la disolución de las mismas como los problemas de lixiviación de la sonda colorimétrica.^{71,72} La razón principal es que se precisan sondas colorimétricas de naturaleza hidrofóbica para el análisis y, por tanto, muy insolubles en agua. Sin embargo, el número de sondas colorimétricas que cumplen este criterio es muy limitado. Por ello, se requiere una matriz hidrófoba sobre la que realizar la inmovilización para poder emplear una amplia gama de sondas colorimétricas.⁷³

Las propiedades fisicoquímicas altamente ajustables de los ILs han atraído una atención significativa por parte de la comunidad científica. En este contexto, una combinación cuidadosa de catión y anión facilita la identificación de su contribución a propiedades como la naturaleza hidrofílica/hidrofóbica.⁷⁴ De este modo, el líquido iónico puede actuar como un componente que inmovilice el receptor activo. Con esta perspectiva, se han realizado estudios para evaluar qué ILs son inmiscibles con el agua. A partir de los resultados, se observó que los aniones de cadena larga a partir de ácidos como el octanoico, geránico y citronélico conducen a una naturaleza hidrofóbica o, lo que es lo mismo, inmiscibilidad en medios acuosos como se muestra en la Figura 4.22. Por el contrario, el resto son hidrofílicos y solubles en agua como es el caso del ácido mandélico.

De este modo, se llevó a cabo un procedimiento de preparación de tejidos inteligentes a partir de la inmovilización de sondas colorimétricas mediante el empleo de PILs hidrofóbicos como soporte. Los indicadores colorimétricos son generalmente menos comunes que sus homólogos fluorométricos,¹⁷⁷ pero tienen la ventaja de que pueden evaluarse fácilmente a simple vista o utilizando tecnología de imagen digital que ahora está comúnmente disponible y es económica.

⁷¹ Muginova, S. V.; Myasnikova, D. A.; Kazarian, S. G.; Shekhovtsova, T. N. Applications of Ionic Liquids for the Development of Optical Chemical Sensors and Biosensors. *Analytical Sciences* **2017**, *33* (3), 261-274.

⁷² Rehman, A.; Zeng, X. Methods and approaches of utilizing ionic liquids as gas sensing materials. *RSC Advances* **2015**, *5* (72), 58371-58392.

⁷³ Galpothdeniya, W. I. S.; McCarter, K. S.; De Rooy, S. L.; Regmi, B. P.; Das, S.; Hasan, F.; Tagge, A.; Warner, I. M. Ionic liquid-based optoelectronic sensor arrays for chemical detection. *RSC Advances* **2014**, *4* (14), 7225-7234.

⁷⁴ Anderson, J. L.; Clark, K. D. Ionic liquids as tunable materials in (bio)analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2018**, *410* (19), 4565-4566.

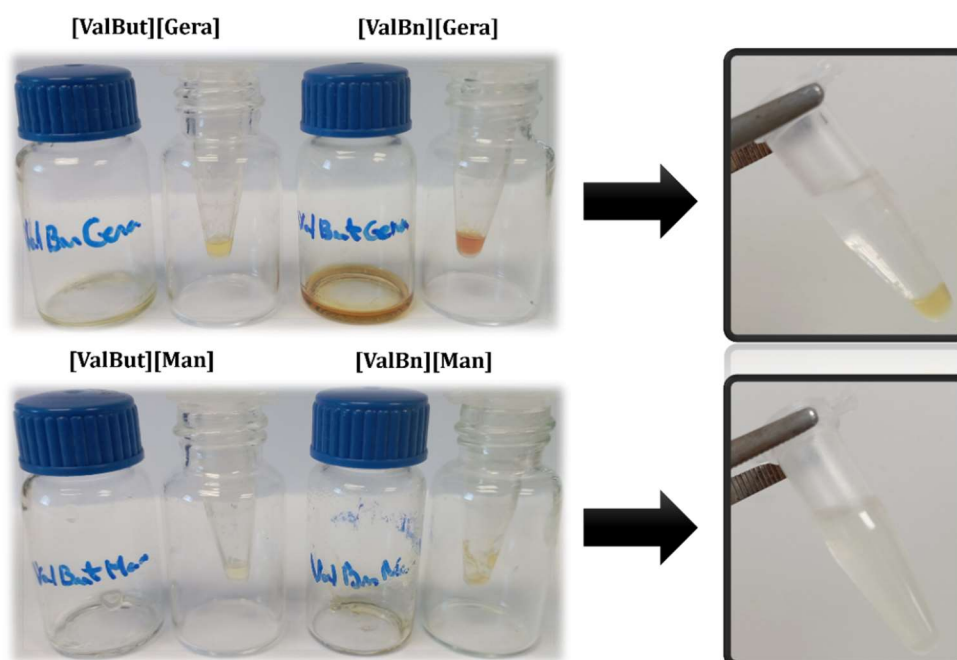


Figura 4.22. Pruebas de solubilidad. PILs hidrofóbicos derivados de ácido geránico (arriba) y PILs hidrofílicos derivados de ácido mandélico (abajo).

La preparación del tejido inteligente se realizó mediante un procedimiento sencillo que se representa en la Figura 4.23. De manera específica, el procedimiento se basa en la siguiente metodología:

- I. Pesar 20 mg del PIL hidrofóbico seleccionado y disolver en 100 μL de una disolución de la sonda colorimétrica en MeOH ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- II. Posteriormente, se distribuye la disolución (gota a gota) sobre la superficie de un tejido de dimensiones 1 cm x 1 cm aproximadamente.
- III. Finalmente, el tejido impregnado se seca durante 24 horas en una estufa a 50°C para evaporar el disolvente, quedándose impregnado con el PIL y la sonda disuelta en él.

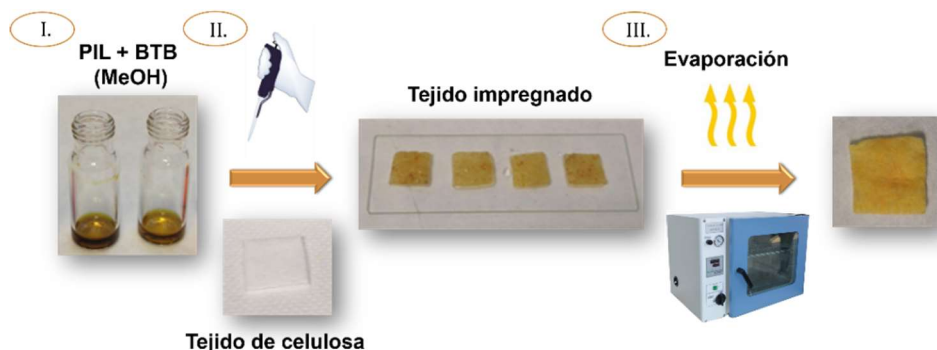


Figura 4.23. Metodología de preparación de los tejidos impregnados con PIL y sonda colorimétrica.

Los sistemas inteligentes se prepararon con tejido de 100 % celulosa de 80 g/m² de gramaje y, en nuestro estudio, se inmovilizó o impregnó un indicador colorimétrico de pH. La sonda colorimétrica o indicador de pH seleccionado es el azul de bromotimol referenciado como **BTB**, que muestra un cambio de color de amarillo a azul cuando se produce el viraje de la zona ácida a la zona básica como se indica en la Figura 4.24.

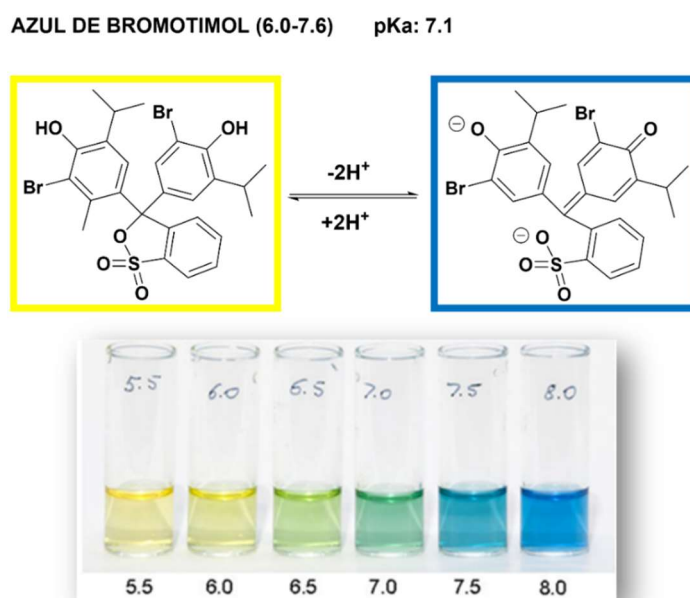


Figura 4.24. Estructuras y cambios de color del azul de bromotimol a diferentes valores de pH.

4.1.9.2 Estudio del efecto de inmovilización basado en PILs hidrofóbicos

En relación con los líquidos iónicos con carácter hidrofóbico, los líquidos iónicos próticos derivados de ácido geránico y ácido citronélico se estudiaron como candidatos para la inmovilización de la sonda colorimétrica. Para estudiar la eficiencia de inmovilización en presencia y ausencia de líquido iónico hidrofóbico, los tejidos inteligentes preparados se expusieron a un medio acuoso durante un período de 60 minutos para determinar si la sonda es liberada al medio acuoso o, por el contrario, el líquido iónico hidrofóbico como medio de soporte tiene un efecto que reduce la lixiviación.⁷⁵ Para investigar dicho comportamiento, las fases acuosas se analizaron espectrofotométricamente por UV-visible para determinar y cuantificar el posible lixiviado de sonda colorimétrica y poder evaluar el posible efecto de retención ejercido por la fase de líquido iónico soportada en la celulosa.

⁷⁵ Cao, L.; Sun, G.; Zhang, C.; Liu, W.; Li, J.; Wang, L. An Intelligent Film Based on Cassia Gum Containing Bromothymol Blue-Anchored Cellulose Fibers for Real-Time Detection of Meat Freshness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2019**, 67 (7), 2066-2074.

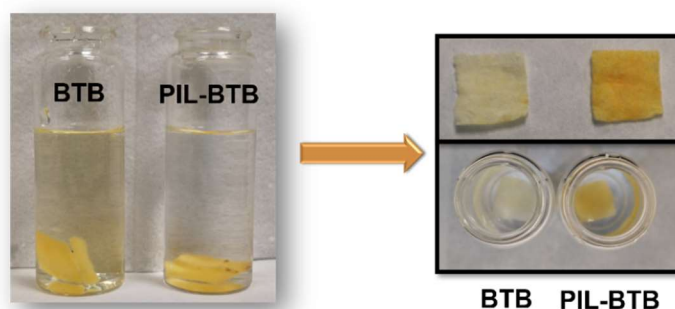


Figura 4.25. Comparación de la liberación de BTB en fase acuosa en ausencia y presencia de PIL hidrofóbico.

En la Figura 4.25, se puede observar, de manera visual, el efecto positivo que ejerce el PIL derivado de ácido citrónico debido a su carácter hidrofóbico a la lixiviación o migración de la sonda colorimétrica desde el tejido a la fase acuosa. Esto queda reflejado tanto en el color amarillo que tomó la solución en presencia del tejido impregnado y en ausencia de PIL, como por la pérdida de color del tejido una vez secado.

Este efecto se puede observar de una manera más cuantitativa evaluando las disoluciones acuosas expuestas al tejido mediante espectrofotometría de UV-visible. Así, se calculó el porcentaje de liberación de sonda colorimétrica mediante la ley de Beer-Lambert que permite determinar la concentración a partir de la absorbancia mediante la Ecuación 4.1. Por ello, mediante la Ecuación 4.2 se puede calcular el porcentaje de liberación de la muestra considerada (C_i) a partir de la concentración que supone un 100 % de liberación de la sonda colorimétrica en disolución (C_{100}), donde " A_λ " es la absorbancia a una longitud de onda, " ϵ_λ " es el coeficiente de absortividad molar y " b " es la longitud de paso de la cubeta.

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot b \cdot C$$

Ecuación 4.1. Cálculo de la concentración de la forma ácida del azul de bromotimol ($\lambda = 433 \text{ nm}$).

$$\text{Coeficiente de absortividad molar } (\epsilon_\lambda) = 1.38 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\text{Liberación de sonda } (\%) = \frac{C_{PIL}}{C_{100}} \cdot 100$$

Ecuación 4.2. Cálculo del porcentaje de liberación de sonda.

En la Figura 4.26, se observan grandes diferencias en el máximo de absorción característico para la sonda según la presencia (PIL-BTB) o ausencia del PIL hidrofóbico (BTB) respecto del 100 % de liberación (100-BTB). En la Tabla 4.8 los resultados muestran que la sonda prácticamente queda inmovilizada en el tejido inteligente en presencia del líquido iónico

hidrofóbico, mientras que si se impregna el indicador **BTB** sin la presencia del PIL, se produce una liberación superior al 50 % de la sonda colorimétrica.

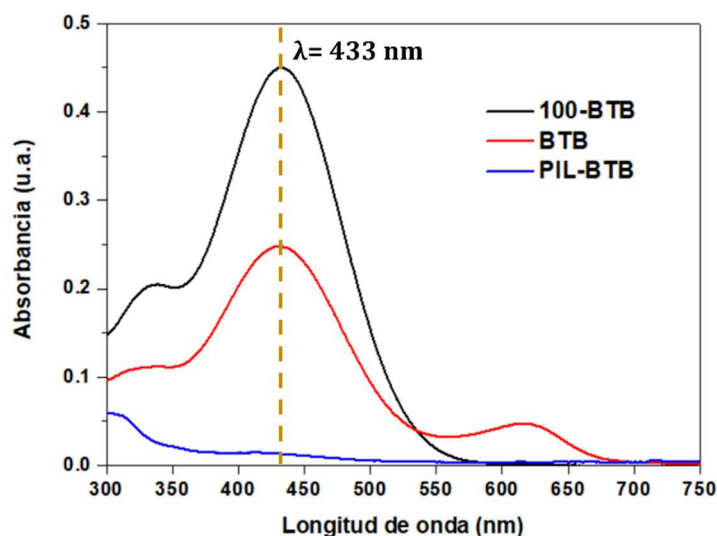


Figura 4.26. Comparación del espectro UV-visible de la liberación de la sonda BTB.

Tabla 4.8. Valores de absorbancia y concentración correspondientes a la liberación de BTB

| Referencia | Absorbancia ($\lambda=433\text{nm}$) | C (M) | Sonda liberada (%) |
|----------------|--|----------------------|--------------------|
| 100-BTB | 0.442 | $3.20 \cdot 10^{-5}$ | 100 |
| BTB | 0.2476 | $1.79 \cdot 10^{-5}$ | 56 |
| PIL-BTB | 0.0131 | $9.49 \cdot 10^{-7}$ | 3 |

4.1.9.3 Estudio de respuesta y sensibilidad de aminas volátiles

Una vez inmovilizada la sonda colorimétrica en el PIL soportado, se pasó a medir la respuesta y sensibilidad hacia las aminas volátiles. Para ello, se siguió una metodología reportada en la bibliografía, en la cual se puede estimar la concentración de amoníaco (NH_3) en fase gas como analito de referencia.^{76,77} La metodología se basa en mezclar soluciones de cloruro de amonio (NH_4Cl) de concentración conocida y hidróxido de sodio (NaOH) para

⁷⁶ Cho, Y. B.; Jeong, S. H.; Chun, H.; Kim, Y. S. Selective colorimetric detection of dissolved ammonia in water via modified Berthelot's reaction on porous paper. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, 256, 167-175.

⁷⁷ Jaikang, P.; Paengnakorn, P.; Grudpan, K. Simple colorimetric ammonium assay employing well microplate with gas pervaporation and diffusion for natural indicator immobilized paper sensor via smartphone detection. *Microchemical Journal* **2020**, 152, 104283.

generar la liberación in-situ del amoníaco (Figura 4.27). El estudio se llevó a cabo en un rango de concentraciones de 5 a 100 ppm.

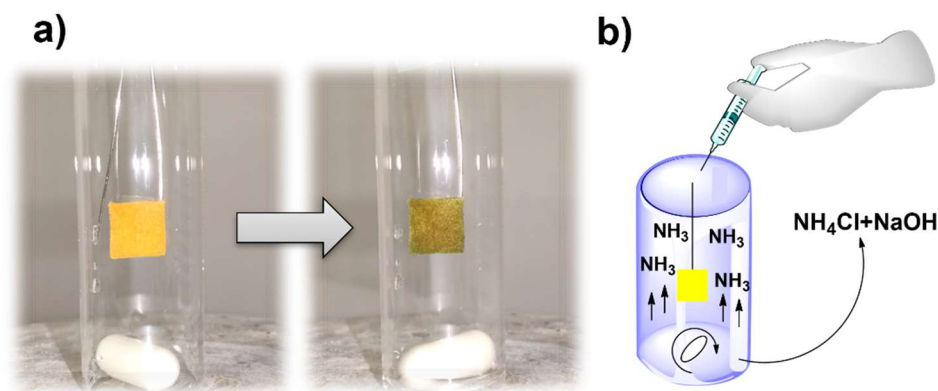
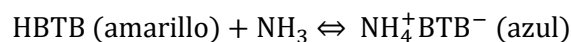


Figura 4.27. (a) Cambio de color para la exposición del sensor a la norma gaseosa NH_3 y (b) Preparación estándar gaseosa de amoníaco en el vial de vidrio sellado de 20 ml.

De este modo, se puede estudiar el efecto de la concentración de amoníaco en la fase gaseosa visualizando el cambio de color de la sonda a diferentes tiempos de exposición. Los cambios de color observados se deben a la reacción del Esquema 4.3, la forma protonada amarilla inicial del azul de bromotimol (BTB) se convierte en su forma desprotonada azul (BTB^-).⁷⁸



Esquema 4.3. Equilibrio de las formas ácida y básica de BTB en presencia de amoníaco.

La cinética de la reacción se siguió fotográficamente en función del tiempo a temperatura ambiente tras la exposición al analito de interés en fase gas. Como se observa en la Figura 4.28, existe un cambio de color (amarillo-verde-azul) en función de la concentración de la amina (NH_3) y del tiempo de exposición. Este cambio de color producido para las diversas concentraciones es claramente visible y evidente al ojo humano. Las imágenes muestran claramente que una mayor concentración conduce a un cambio más drástico y rápido como se cabría esperar. Además, se puede concluir que para 15 minutos de exposición el sistema muestra un límite de detección superior a 5 ppm, ya que a dicha concentración no se aprecia un cambio de color que proporcione una respuesta positiva en la presencia de NH_3 .

⁷⁸ Engel, L.; Benito-Altamirano, I.; Tarantik, K. R.; Pannek, C.; Dold, M.; Prades, J. D.; Wöllenstein, J. Printed sensor labels for colorimetric detection of ammonia, formaldehyde and hydrogen sulfide from the ambient air. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2021**, *330*, 129281.

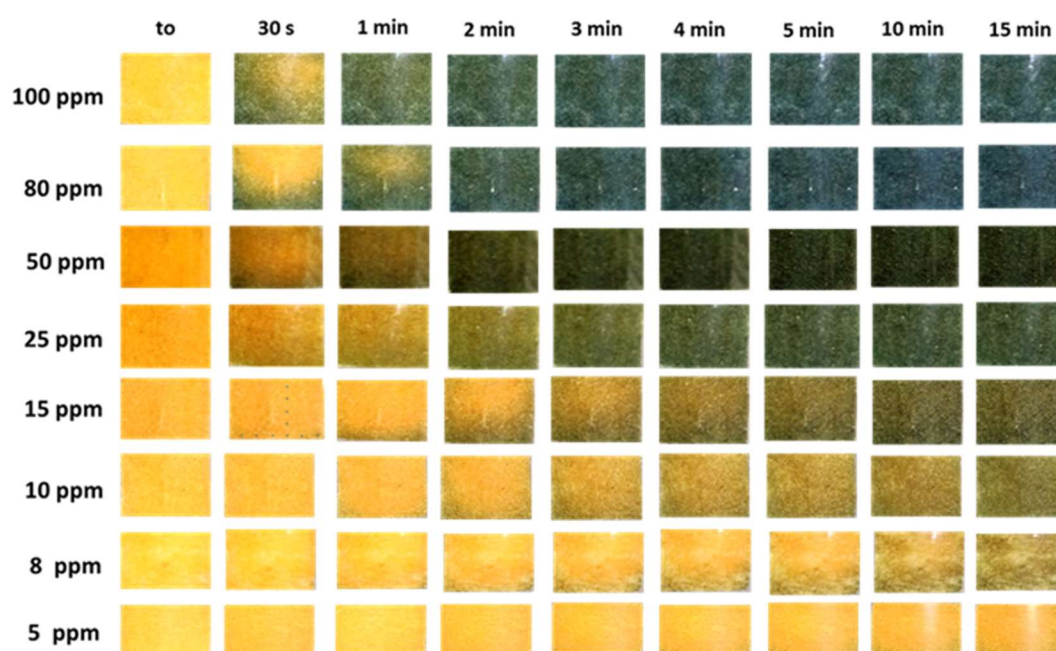


Figura 4.28. Evolución del color con el tiempo dependiendo de la concentración de NH_3 .

4.1.9.4 Desarrollo de un modelo matemático mediante las componentes RGB

Un análisis detallado de la información obtenida a partir de la composición del color en términos de la intensidad de los colores primarios de la luz o, lo que es lo mismo, componentes RGB, puede, en principio, ser utilizado para llevar a cabo análisis cuantitativo para la detección colorimétrica. Para la estimación de las componentes RGB, los datos corresponden al promedio de todos los píxeles de un área seleccionada para cada imagen y se analizaron por una aplicación de JavaScript para obtener el promedio en color de una imagen. Posteriormente, el análisis cuantitativo^{79,80} se llevó a cabo considerando la magnitud de cambio de color a partir de la distancia euclidiana (ΔRGB) entre las intensidades RGB de la muestra y las imágenes de referencia usando la Ecuación 4.3:

$$\Delta\text{RGB} = \sqrt{(R_s - R_{\text{ref}})^2 + (G_s - G_{\text{ref}})^2 + (B_s - B_{\text{ref}})^2}$$

Ecuación 4.3. Fórmula del cálculo de la distancia euclidiana (ΔRGB).

En la Ecuación 4.3, R, G y B presentan las intensidades de color promedio del rojo, verde y azul, respectivamente. Además, los subíndices “ref” y “s” indican las imágenes de referencia o condiciones iniciales y muestra, respectivamente.

⁷⁹ A strip array of colorimetric sensors for visualizing a concentration level of gaseous analytes with basicity. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *251*, 1089-1095.

⁸⁰ Nguyen, T.-T.; Bui, T. H.; Lee, Y.-I. Disposable Colorimetric Paper-Based Probe for the Detection of Amine-Containing Gases in Aquatic Sediments. *ACS Omega* **2019**, *4*, 12665-12670.

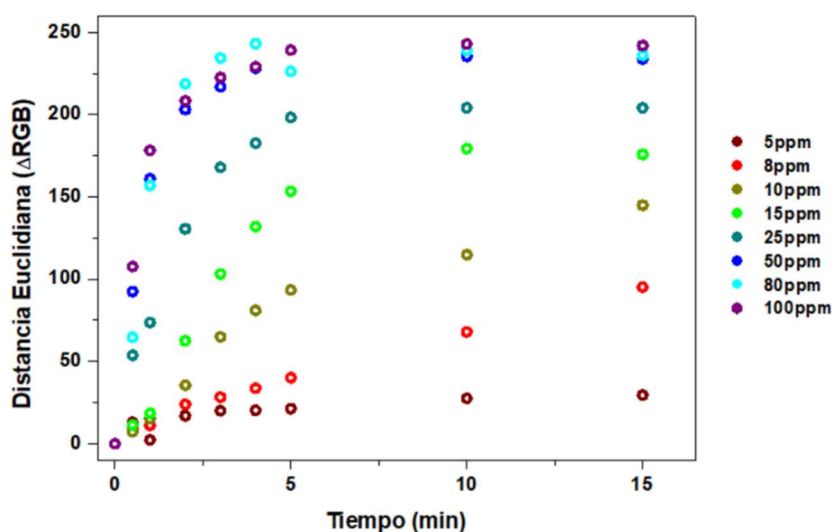


Figura 4.29. Variaciones de la distancia RGB para el sensor colorimétrico impregnado de colorante a lo largo del tiempo en el rango de 5 a 100 ppm.

Este análisis nos permite establecer de forma cuantitativa, tal y como se observa en la Figura 4.29, como se produce un cambio en los valores de la distancia euclidiana en función de la concentración. Un mayor cambio en este valor, supone una mayor variación en el color y, por lo tanto, una mayor concentración. Por otro lado, se puede observar de forma clara que la saturación de color se alcanza a partir de 50 ppm, ya que se alcanza el máximo incremento de color asociado al parámetro de estudio. Por el contrario, el color varía gradualmente y más lentamente de amarillo, verde a azul a menor concentración a lo largo del tiempo.

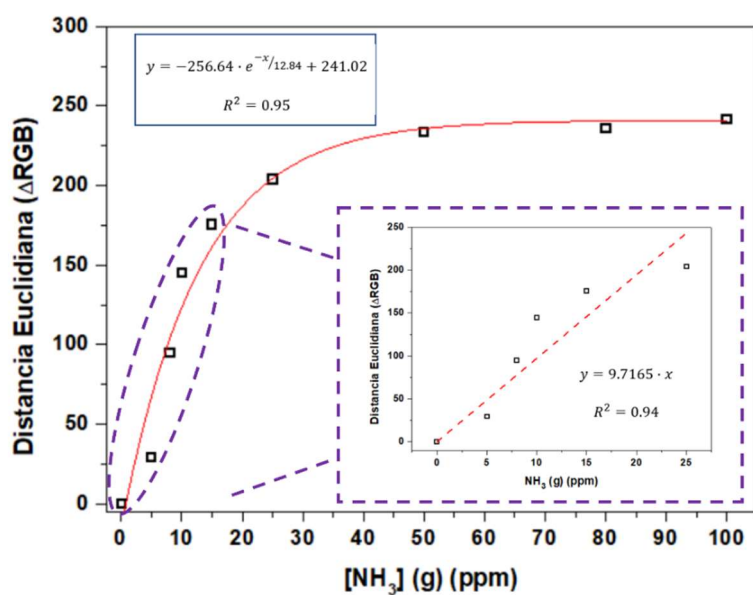


Figura 4.30. Representación exponencial de ΔRGB vs [NH₃] (ppm) a 15 min y regresión lineal de ΔRGB vs [NH₃] (ppm) a 15 min hasta 25 ppm.

Así, tomando los valores de este parámetro a los 15 minutos se puede obtener, como se muestra en la Figura 4.30, una curva de calibración para la detección de NH_3 . Esta curva muestra una tendencia exponencial a la saturación, en la región superior a 25 ppm correspondiente al nivel de meseta, pero para el rango de 5 a 25 ppm muestra una variación significativa. En este sentido, si el valor de distancia euclidiana es superior a 200, solo se puede establecer que la concentración es superior a 25 ppm y no se puede especificar cuantitativamente la concentración exacta. Del mismo modo, si se representan los valores entre el rango de 5 y 25 ppm, se puede establecer una relación lineal entre la distancia euclidiana y la concentración de NH_3 como se representa en la Figura 4.30.

4.1.10 Conclusiones

Por último, se recogen y presentan las principales conclusiones extraídas del presente capítulo.

- Una familia de 3 tipos de α,β -aminoamidas derivadas de los aminoácidos naturales L-valina y L-prolina han sido preparadas y se han abordado diferentes estrategias para diseñar la metodología para llevar a cabo la ruta sintética de los compuestos mencionados.
- La ruta sintética a partir de cloroformiato de etilo empleando 2-MeTHF como disolvente ha demostrado una drástica mejora del impacto medioambiental de acuerdo a métricas de la química verde, como la reducción del factor E.
- La optimización de la metodología es robusta y se ha evaluado su escalado no mostrando diferencias apreciables en términos de rendimiento y, además, los valores de factor E son inferiores debido al reciclado del disolvente.
- Una familia de 21 líquidos iónicos próticos se ha diseñado y preparado a partir de derivados de aminoácidos y ácidos de diferente naturaleza mediante una sencilla estrategia de neutralización ácido-base.
- Se demuestra la formación de los PILs a partir de estudios de caracterización tales como RMN de protón y espectroscopia de IR, los cuales presentan desplazamientos y cambios de señales características asociadas a la formación a partir de los precursores.

- El análisis térmico ha demostrado la influencia de la estructura de los constituyentes ácido y base, así como el efecto de los grupos funcionales y cadenas laterales presentes en estos, para la obtención de tres tipos de comportamiento de fase de los PILs según el tipo de interacciones dominantes entre catión-anión.
- Se ha evaluado el grado de ionicidad o transferencia de protón en los PILs y se ha demostrado mediante espectroscopia de RMN que se puede predecir la tendencia de menor o mayor ionicidad según ΔpK_a entre la base y el ácido.
- Se ha demostrado que la naturaleza sintonizable tanto del anión como del catión permite modular propiedades de los nuevos PILs tales como la solubilidad en medio acuoso.
- Se ha desarrollado un material inteligente basado en una sonda colorimétrica sensible al pH, la cual se ha inmovilizado en un tejido de celulosa mediante PILs de naturaleza hidrofóbica que previenen la lixiviación de la sonda.
- Se ha demostrado que el material inteligente es sensible a la concentración de gas amoníaco en un rango de concentración de 10 a 100 ppm mediante la detección visual.
- Se ha empleado un modelo matemático basado en las componentes RGB del color para evaluar la respuesta colorimétrica en la detección de NH_3 .
- En este contexto, se ha demostrado el desarrollo de un sistema basado en PILs que podría tener potencial aplicación para la monitorización y control en tiempo real en entornos con producción masiva de gases tales como aminas volátiles.

CAPÍTULO V

Sistemas sensibles a la humedad basados en Pol-ILs derivados de tiolactona

5 Capítulo V. Sistemas sensibles a la humedad basados en Pol-ILs derivados de tiolactona

Este capítulo describe la preparación, caracterización y aplicación de materiales poliméricos funcionales de naturaleza iónica a partir de monómeros iónicos derivados de tiolactona. La química de las tiolactonas ofrece tres ventajas clave para la preparación de polímeros funcionalizados:

- Bloques de construcción de base biológica
- Versatilidad e incorporación simple de grupos funcionales
- Polimerización eficiente de tipo tiol-eno.

En este contexto, se desarrolló una metodología sintética sencilla para la preparación de líquidos iónicos poliméricos con diferentes estructuras, cadenas laterales y entrecruzamientos y se evaluaron sistemáticamente sus propiedades. Finalmente, se investigó su potencial como sensores higroscópicos de respuesta colorimétrica mediante la inmovilización de sondas colorimétricas.

5.1 Tiolactona de homocisteína como plataforma funcional en la química de polímeros

La naturaleza se basa en sistemas de inmensa complejidad, siendo una fuente continua de inspiración para el desarrollo de nuevas macromoléculas o polímeros a través de una amplia gama de interacciones de naturaleza covalente o no covalente como pueden ser los puentes de hidrógeno, las interacciones iónicas, las interacciones π - π o el carácter hidrofóbico/hidrófilico.

En la química de polímeros, existe una demanda de metodologías de preparación sencilla y eficiente que garanticen la ortogonalidad, la cual se expresa por una completa regio- y quimioselectividad. Del mismo modo, la obtención o aislamiento del producto puro precisa utilizar condiciones de reacción suaves sin necesidad de un tratamiento complejo para su purificación, así como un simple manejo tanto a pequeña como a gran escala. Como

consecuencia, este conjunto de requisitos encaja en el término de química “Click” introducido por primera vez por Sharpless.¹

Inspirándose en la singularidad y ubicuidad de los tioésteres en la naturaleza, se ha prestado mucha atención a los materiales funcionalizados con tioésteres, que permiten aplicaciones que van desde polímeros sensibles hasta bioconjugados y polímeros (bio)degradables.² La motivación de este capítulo es la de explorar cómo la presencia en los líquidos iónicos de una unidad estructuralmente versátil (como es la tiolactona), puede emplearse para la preparación de líquidos iónicos poliméricos de funcionalidad controlada. En este sentido, la naturaleza ortogonal y la reactividad tipo “Click” del anillo de tiolactona es una característica clave en las estrategias de preparación de estos nuevos materiales funcionales.

Las tiolactonas son tioésteres cíclicos que se pueden subdividir en β -, γ - y δ -tiolactonas, según el número de átomos en el anillo (4, 5 y 6, respectivamente). Las β -tiolactonas son las tiolactonas más comunes debido a su disponibilidad y aplicabilidad sintética.³ En los últimos años, la reactividad de la tiolactona ha sido explorada como una funcionalidad tiol latente en la ciencia de los polímeros sintéticos. Este enfoque sintético tiene dos características particularmente atractivas en comparación con otras químicas de éster activado. En primer lugar, no se desperdician átomos ya que la química de la tiolactona da como resultado reacciones de conjugación con un 100 % de eficiencia atómica y, en segundo lugar, permite la doble modificación de la estructura polimérica.⁴

En este trabajo se plantea el empleo de la tiolactona de homocisteína. Esta presenta un anillo de 5 miembros derivado de la ciclación de la homocisteína, la cual es un homólogo del aminoácido cisteína y puede transformarse o metabolizarse a partir del aminoácido metionina (Figura 5.1).⁵ Por lo tanto, se trata de un bloque de construcción de base biológica que puede derivatizarse de forma sencilla y ortogonal, mediante la aminólisis de la tiolactona en presencia de aminas para producir *in situ* el tiol correspondiente para la

¹ Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (11), 2004-2021.

² Espeel, P.; Du Prez, F. E. One-pot multi-step reactions based on thiolactone chemistry: A powerful synthetic tool in polymer science. *European Polymer Journal* **2015**, *62*, 247-272.

³ Goethals, F.; Frank, D.; Du Prez, F. Protected thiol strategies in macromolecular design. *Progress in Polymer Science* **2017**, *64*, 76-113.

⁴ Baysak, E.; Gunay, U. S.; Daglar, O.; Durmaz, H. Synthesis and post-polymerization modification of polyester containing pendant thiolactone units. *European Polymer Journal* **2019**, *112*, 241-247.

⁵ Bolander-Gouaille, C. The homocysteine metabolism. In *Focus on Homocysteine*, Bolander-Gouaille, C. Ed.; Springer Paris, 2001; pp 14-19.

obtención de una variedad de monómeros. Este tiol puede reaccionar en presencia de un alqueno, mediante una reacción tiol-eno, introduciendo así, un segundo nivel de funcionalidad que da lugar a compuestos funcionalizados ortogonalmente.

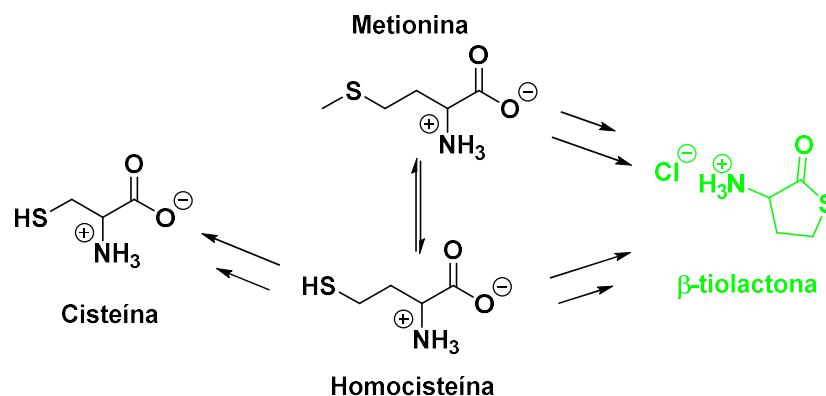


Figura 5.1. Análogos mediante transformaciones bioquímicas o metabólicas.

5.2 Reacción “Click” tiol-eno

Como se ha determinado en el apartado anterior, la aminólisis del anillo de tiolactona genera y ofrece un segundo grupo funcional reactivo como es el grupo tiol (-SH). En condiciones adecuadas, el tiol puede emplearse para el desarrollo de monómeros y polímeros derivados de estos. En este contexto, la química o polimerización de tipo tiol-eno surge como un campo de investigación en constante crecimiento para dicha aproximación. Tanto la aminólisis como la reacción asociada al tiol se pueden explotar mediante una reacción “one-pot” o en cascada para la preparación de materiales funcionalizados.⁶ Esta estrategia de síntesis de polímeros que contienen tiolactona proporciona una poderosa herramienta para diseñar una versatilidad de estructuras y funcionalidades, lo que conduce a una amplia gama de propiedades.

5.2.1 El rol de los tioles en la química de polímeros

Los tioles son el análogo representativo de azufre de los alcoholes, aunque difieren en su reactividad y propiedades debido a la naturaleza fisicoquímica del enlace S-H. Comparado con el O-H (459 kJ/mol, 96 pm de distancia de enlace), el enlace S-H es más débil (363 kJ/mol) siendo la distancia de enlace S-H mayor (134 pm). Debido a una menor electronegatividad y a su mayor número atómico y radio, el azufre es más polarizable y la

⁶ Espeel, P.; Goethals, F.; Du Prez, F. E. One-Pot Multistep Reactions Based on Thiolactones: Extending the Realm of Thiol–Ene Chemistry in Polymer Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (6), 1678-1681.

nube de electrones está deslocalizada y distribuida por igual, lo que da como resultado un anión tiolato bien estabilizado y con una mayor acidez en comparación con los alcoholes.⁷ El fuerte interés en el desarrollo de polímeros que contienen tioles tiene su origen en el hecho de que son sustratos potenciales para la incorporación de diversas funcionalidades químicas mediante un amplio rango de reacciones tipo tiol-X.⁸ En la Figura 5.2, se muestra una recopilación de 17 estrategias de reacción diferentes donde se emplean tioles como reactivo de partida.

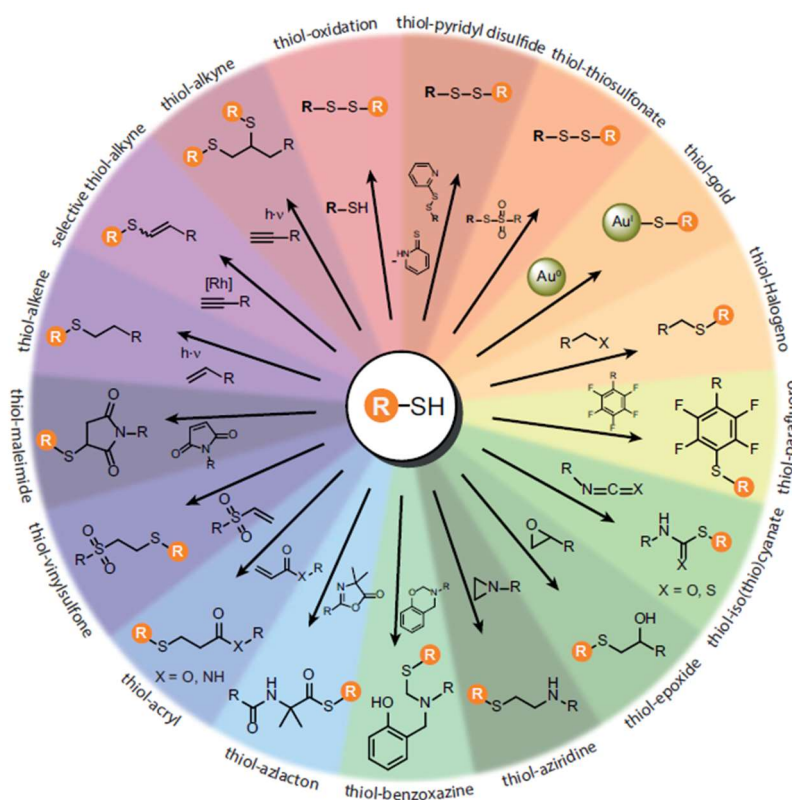


Figura 5.2. Recopilación de reacciones tipo tiol-X (tomado de ref. 8).

5.2.2 Polimerización tipo tiol-eno

Un ejemplo notable de las reacciones tiol-X es la reacción radical tiol-eno, que se conoce desde 1905.⁹ Las características de esta reacción, tales como altos rendimientos, velocidad

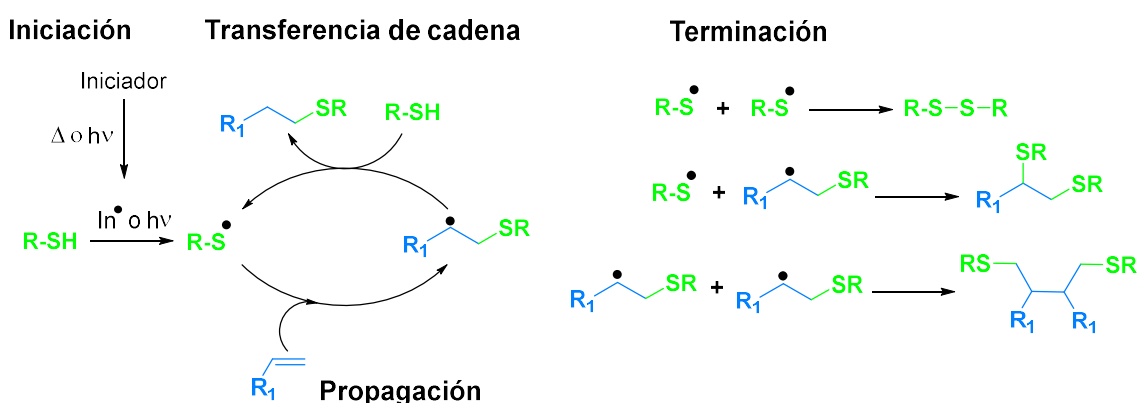
⁷ Csizmadia, I. G. In *The Thiol Group* (1974); John Wiley & Sons, Ltd.: 1974, pp 1–109.

⁸ Espeel, P.; Goethals, F.; Du Prez, F. E. In *Thiol-X Chemistries in Polymer and Materials Science*; The Royal Society of Chemistry: 2013; Chapter 9, pp 195–216.

⁹ Posner, T. Beiträge zur Kenntniss der ungesättigten Verbindungen. II. Ueber die Addition von Mercaptanen an ungesättigte Kohlenwasserstoffe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1905**, *38* (1), 646–657.

e insensibilidad al agua, permiten su uso en una amplia gama de aplicaciones, incluyendo post-modificación y síntesis de polímeros.^{10,11} Además, combina las ventajas de la formación de redes poliméricas uniformes, entrecruzamiento rápido e insensibilidad al oxígeno, en comparación con la formación de materiales derivados de acrilatos. Por otro lado, se caracteriza por una gelificación retardada, ya que las redes de tiol-eno se forman típicamente a partir de componentes de bajo peso molecular que mantienen una viscosidad relativamente baja hasta que se alcanzan conversiones altas.

El mecanismo de la química del radical tiol-eno procede a través de un proceso en cadena, el cual consiste en una etapa de iniciación, propagación, transferencia de cadena y terminación como se ilustra en el Esquema 5.1.¹² En particular, las reacciones de tiol-eno mediadas por radicales exhiben velocidades de reacción mucho más rápidas que otro tipo de polimerizaciones convencionales, ya que los tiempos necesarios para lograr altas conversiones suelen oscilar de 1 a 10 segundos.¹³



Esquema 5.1. Mecanismo radicalario de reacción tiol-eno.

La polimerización o reacción del radical tiol-eno puede desencadenarse por iniciación térmica o mediante un iniciador inducido fotoquímicamente para la generación del radical tiol ($R-S^\bullet$). Posteriormente, se propaga por adición al doble enlace y se forma un intermedio con un carbono radicalario que regenera el radical tiol a partir de otro tiol y, de este modo, se puede iniciar nuevamente el ciclo. Finalmente, la reacción del tiol-eno se termina con la

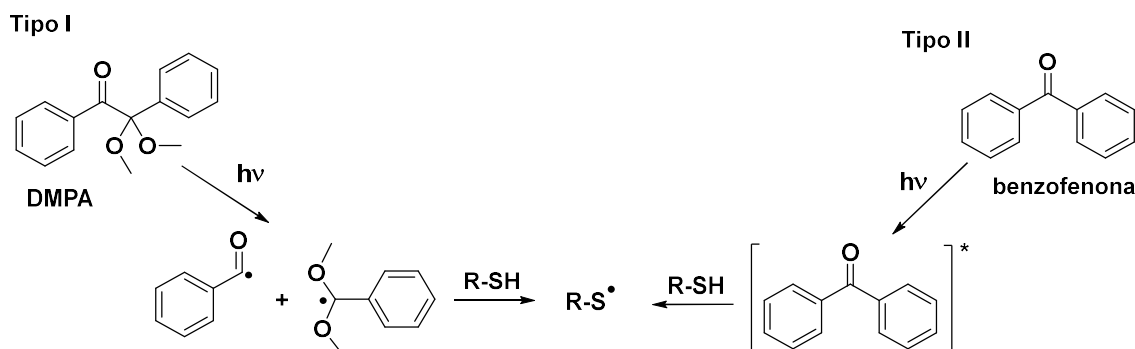
¹⁰ Hoyle, C. E.; Lee, T. Y.; Roper, T. Thiol-enes: Chemistry of the past with promise for the future. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004**, *42* (21), 5301-5338.

¹¹ Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. Thiol-Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (9), 1540-1573.

¹² Lowe, A. B. Thiol-ene "click" reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polymer Chemistry* **2010**, *1* (1), 17-36.

¹³ Hoyle, C. E.; Lowe, A. B.; Bowman, C. N. Thiol-click chemistry: a multifaceted toolbox for small molecule and polymer synthesis. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39* (4), 1355-1387.

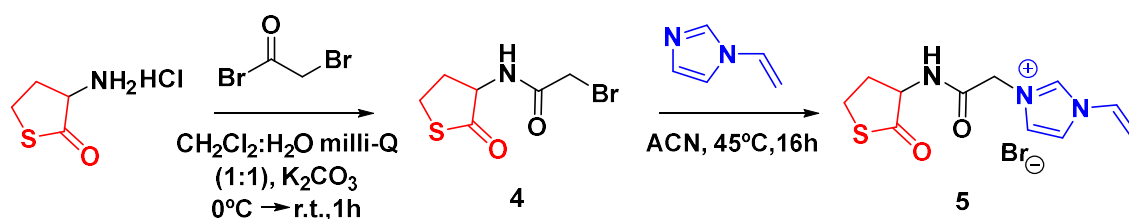
formación de puentes disulfuro (S-S) y la recombinación de radicales, tal y como se muestra en el Esquema 5.1. Respecto a los fotoiniciadores, hay dos tipos (Esquema 5.2): Tipo I como el 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA) que absorbe un fotón y se divide en dos radicales reactivos o Tipo II como la benzofenona que reacciona en el estado excitado.



Esquema 5.2. Mecanismos de generación del radical tiolo a partir de los fotoiniciadores tipo I y II.

5.3 Metodología y síntesis del monómero iónico derivado de la tiolactona de homocisteína

En este capítulo se plantea, como objetivo inicial, la preparación de un monómero de naturaleza iónica de tipo AB' que pueda emplearse en procesos de polimerización tiol-eno. El primer grado de funcionalización de este monómero está definido por un anillo de tiolactona (A), como potencial generador de un grupo tiol en presencia de una amina. Además, el monómero iónico contiene un grupo vinilo (B'). En este caso, la ruta sintética (Esquema 5.3) consta de dos etapas: la formación de una amida a partir de un bromuro de ácido para la síntesis del intermedio **4** y la cuaternización del imidazol vinílico para la formación del monómero iónico **5**.



Esquema 5.3. Ruta sintética para la preparación del compuesto **5**.

Una vez realizada la síntesis del compuesto **5**, se estudió la solubilidad del monómero y se observó que es un monómero iónico hidrofílico altamente polar, siendo únicamente soluble en disolventes polares como H_2O y DMSO o en mezclas acuosas con disolventes orgánicos polares e insoluble en disolventes como $ACN, CH_2Cl_2, AcOEt$ y THF (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Estudio de solubilidad del compuesto 5

| Soluble | Insoluble |
|--------------------------------|--|
| H ₂ O | DMF |
| DMSO | MeOH |
| H ₂ O:DMF (1:1) | DMF:MeOH (1:1) |
| H ₂ O:MeOH (1:1) | ACN, CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, THF.. |

5.4 Apertura del anillo de tiolactona mediante aminólisis

La reactividad más importante de las tiolactonas consiste en el ataque nucleofílico al grupo carbonilo, el cual conlleva la apertura del anillo y la liberación del tiol (-SH), de una manera altamente selectiva y sin generar, en el proceso, cualquier clase de subproductos. El tipo más común de nucleófilo utilizado para la apertura de tiolactona son las aminas. La aminólisis es un proceso eficiente para la lisis cuantitativa de esta estructura cíclica, ya que el enlace amida formado es mucho más estable que el enlace carbonilo-azufre preexistente. En general, se postulan dos mecanismos diferentes: uno asistido por aminas y otro asistido por tiol.¹⁴

Las tiolactonas son más sensibles a la apertura del anillo que las lactonas análogas.^{15,16} El enlace tipo tioéster (CO-S) relativamente reactivo y la tensión del anillo de la tiolactona determinan el mecanismo de apertura del anillo.^{17,18} Además, las lactonas tienen centros activos tanto en el grupo carbonilo como en el átomo de carbono unido al oxígeno del grupo

¹⁴ Desmet, G. B.; D'hooge, D. R.; Sabbe, M. K.; Marin, G. B.; Du Prez, F. E.; Espeel, P.; Reyniers, M.-F. Computational Study and Kinetic Analysis of the Aminolysis of Thiolactones. *The Journal of Organic Chemistry* **2015**, *80* (17), 8520-8529.

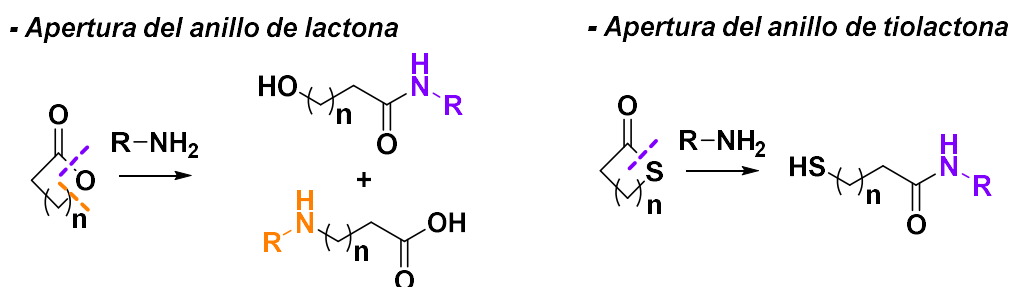
¹⁵ Lin'kova, M. G.; Kuleshova, N. D.; Knunyants, I. L. THIOLACTONES. *Russian Chemical Reviews* **1964**, *33* (10), 493-507.

¹⁶ Espeel, P.; Goethals, F.; Du Prez, F. E. CHAPTER 9 Thiolactones as Functional Handles for Polymer Synthesis and Modification. In *Thiol-X Chemistries in Polymer and Materials Science*, The Royal Society of Chemistry, 2013; pp 195-216.

¹⁷ Noel, A.; Delpéch, B.; Crich, D. Comparison of the reactivity of β -thiolactones and β -lactones toward ring-opening by thiols and amines. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, *10* (32), 6480-6483.

¹⁸ Crich, D.; Sana, K. S_N2-Type Nucleophilic Opening of β -Thiolactones (Thietan-2-ones) as a Source of Thioacids for Coupling Reactions. *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74* (9), 3389-3393.

éster,¹⁹ por lo que existe una clara distinción respecto a la naturaleza reactiva de las lactonas y las tiolactonas en presencia de nucleófilos, tal y como se muestra en el Esquema 5.4.



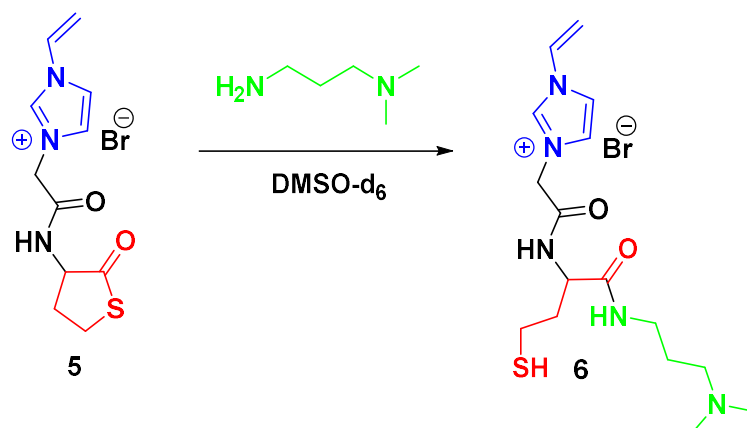
Esquema 5.4. Diferente comportamiento en la apertura del anillo de lactonas y tiolactonas por ataque nucleofílico.

La eficiencia de la hidrólisis del anillo de tiolactona depende del pH. Así, a pH neutros o ligeramente ácidos (pH = 6 – 7) se produce una hidrólisis lenta y “*catalizada por agua*”. Por el contrario, en la hidrólisis catalizada por una base o si se realiza a pH superiores a 7, se observa un crecimiento considerable en las constantes de velocidad de la hidrólisis a medida que aumenta el pH (hasta 28 veces más rápido que la hidrólisis “*catalizada por agua*”).²⁰

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se escogió la 3-dimetilaminopropilamina (DMAPA) como amina o nucleófilo de referencia para estudiar la apertura del anillo de tiolactona de la sal de imidazolio **5**, según la reacción del modelo del Esquema 5.5. Esta reacción de aminólisis se estudió mediante el empleo de diferentes técnicas espectroscópicas como resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR-ATR) y Raman. Cabe señalar que la eficiencia de la aminólisis, se ha determinado cuantitativamente mediante RMN y, cualitativamente, mediante las otras dos técnicas espectroscópicas.

¹⁹ Gresham, T. L.; Jansen, J. E.; Shaver, F. W.; Gregory, J. T.; Beears, W. L. β -Propiolactone. V. Reaction with Alcohols. *Journal of the American Chemical Society* **1948**, *70* (3), 1004-1006.

²⁰ Garel, J.; Tawfik, D. S. Mechanism of Hydrolysis and Aminolysis of Homocysteine Thiolactone. *Chemistry – A European Journal* **2006**, *12* (15), 4144-4152.



Esquema 5.5. Apertura del compuesto **5** derivado de tiolactona con 3-dimetilaminopropilamina.

5.4.1 Estudio cinético de la apertura del anillo por RMN

Para llevar a cabo este estudio se realizó la reacción entre el compuesto **5** y la 3-dimetilaminopropilamina en una relación molar (1:1) a temperatura ambiente y empleando DMSO- d_6 como disolvente deuterado. Como se puede apreciar en la Figura 5.3, la reacción de aminólisis entre el compuesto **5** y la 3-dimetilaminopropilamina muestra una cinética muy rápida. De hecho, a los 5 minutos de reacción, se observa claramente la aparición de la señal del protón **m'** correspondiente al -NH- de la amida resultante de la aminólisis del anillo de tiolactona. Del mismo modo, como consecuencia de dicha apertura, a un desplazamiento a campos más altos se produce la aparición de las señales **a'**, **b'** y **c'** correspondientes a las señales de los protones **a**, **b** y **c** (asignables al anillo de tiolactona). A medida que transcurre el tiempo, la intensidad de estas señales disminuye evidenciándose la apertura de la estructura cíclica de la tiolactona. Además, se puede concluir que la reacción es prácticamente completa a las 5 horas como lo demuestra la casi completa desaparición de las señales mencionadas anteriormente.

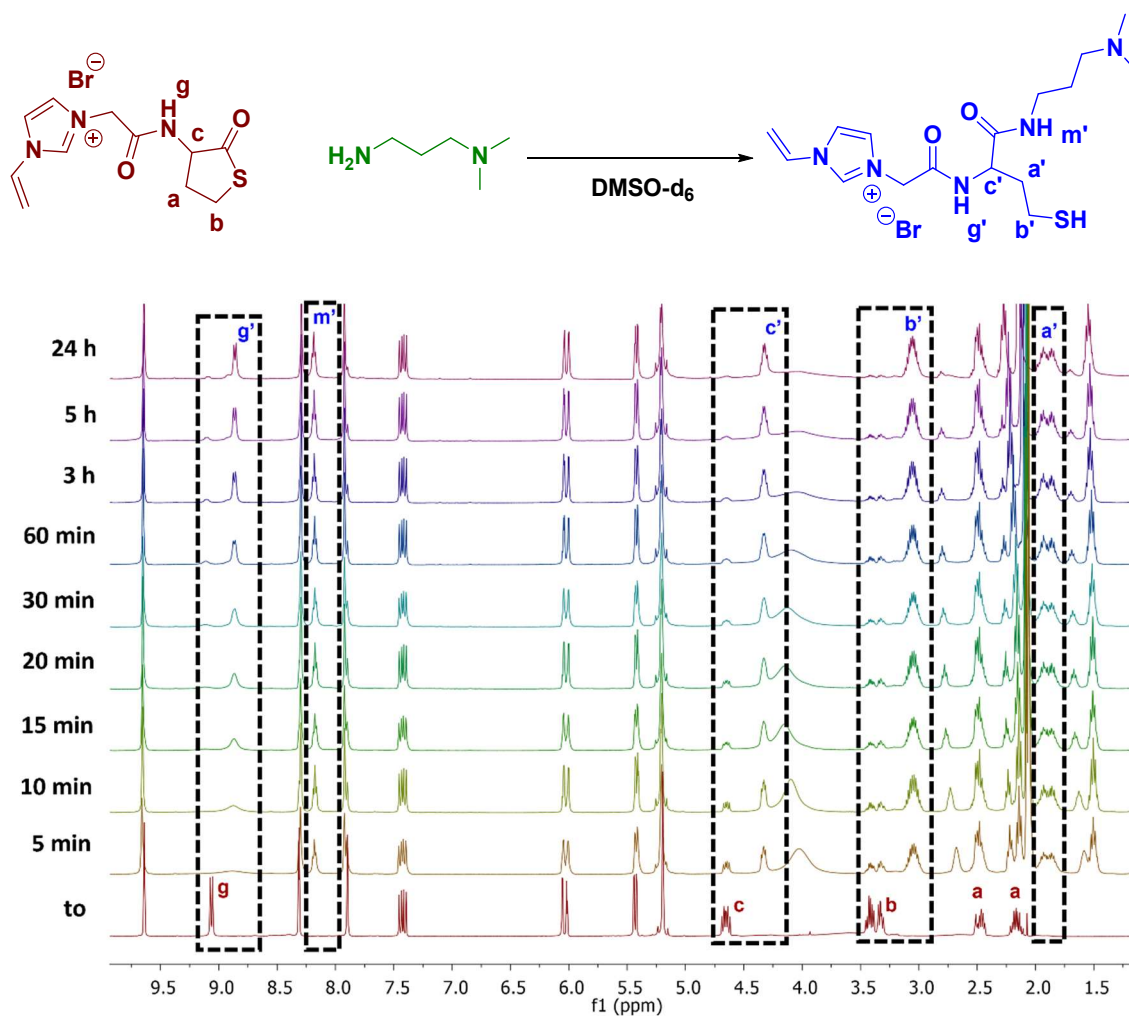


Figura 5.3. Espectros de ^1H -RMN registrados a diferentes tiempos para monitorizar la cinética de la reacción (DMSO-d_6 , $T = 30^\circ\text{C}$).

La asignación de señales correspondientes al producto **6** se representa en la Figura 5.4. En función de la aparición y desaparición de las señales significativas se pudo monitorizar la velocidad de esta reacción y determinar cómo varía el rendimiento de la reacción con el tiempo.

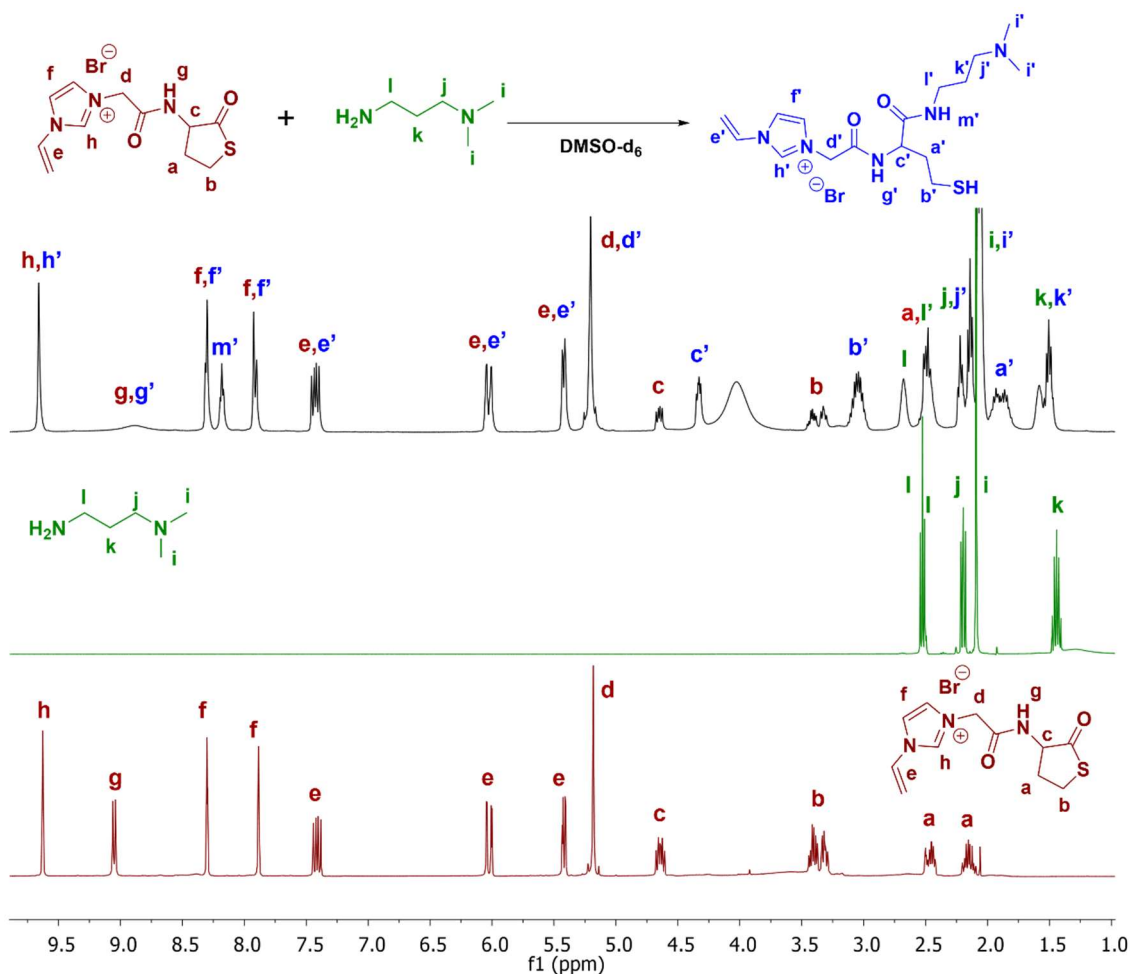


Figura 5.4. Asignación de señales en la aminólisis del compuesto **5** para obtener el compuesto **6** (DMSO- d_6 , $T = 30^\circ\text{C}$).

Para ello, el rendimiento se calculó mediante la variación de la integración de las señales correspondientes a los protones del imidazolio **f**, **f'** y el protón **m'** correspondiente a la formación del enlace amida en la apertura del anillo de tiolactona. Por otro lado, en la zona alifática se puede escoger la señal del protón del -CH- del carbono quiral **c** y **c'** o los protones del -CH₂-S (**b** y **b'**) para realizar los cálculos en base a los valores de las integrales correspondientes. En este caso, el rendimiento se ha estimado como un valor promedio a partir de los resultados obtenidos mediante la Ecuación 5.1, Ecuación 5.2 y Ecuación 5.3:

$$R_{\text{to}} (\%) = \frac{\text{Integral}_{\text{CH } c'}}{\text{Integral}_{\text{CH } c} + \text{Integral}_{\text{CH } c'}} \cdot 100$$

Ecuación 5.1. Cálculo del rendimiento a partir de los protones **c** y **c'**.

$$Rto (\%) = \frac{Integral_{CH_2} b'}{Integral_{CH_2} b + Integral_{CH} b'} \cdot 100$$

Ecuación 5.2. Cálculo del rendimiento a partir de los protones b y b'.

$$Rto (\%) = \frac{Integral_{NH} m'}{(Integral_{CH} f + Integral_{CH} f')/2} \cdot 100$$

Ecuación 5.3. Cálculo del rendimiento a partir de los protones f, f' y m'.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.2 y en la Figura 5.5. Como puede apreciarse, la reacción avanza de forma muy rápida en los instantes iniciales, con un rendimiento cerca del 70 % para los primeros 5 minutos, y una variación más lenta transcurrido este tiempo hasta alcanzar cerca del 90 % tras una hora de reacción, donde la reacción deja de progresar aunque se empleen tiempos de reacción más prolongados.

Tabla 5.2. Rendimiento químico de la apertura de la tiolactona con el transcurso del tiempo.

| Tiempo | 5 min | 10 min | 15 min | 20 min | 30 min | 60 min | 3h | 5h | 24h |
|---------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|----|----|-----|
| Rto (%) | 67 | 72 | 74 | 75 | 78 | 81 | 85 | 86 | 90 |

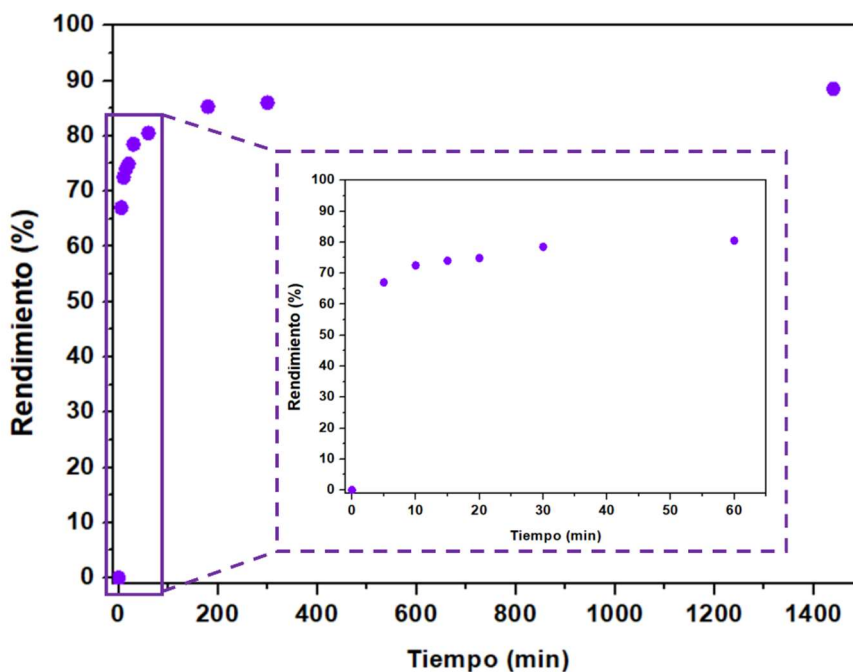


Figura 5.5. Representación del rendimiento de la apertura en función del tiempo de reacción.

5.4.2 Estudio de la apertura del anillo por espectroscopia FT-IR-ATR

El progreso de la reacción también se puede monitorizar a partir de los espectros de IR observándose el cambio de las señales características asociadas a la apertura de la tiolactona en presencia de aminas. En el estudio de IR se adquirieron espectros en un intervalo de tiempo de los primeros 30 minutos de la reacción. En la Figura 5.6 se muestra la aparición de una banda de absorción ligeramente ancha a 3550-3400 cm^{-1} asociada al estiramiento N-H del enlace amida formado como resultado de la aminólisis del tioéster de la tiolactona. Además, se observa el aumento de intensidad de dicha señal con el tiempo indicando el avance de la reacción. Del mismo modo, el compuesto **5** muestra una banda a 940 cm^{-1} que se puede asignar al estiramiento C-S del anillo de tiolactona y la aminólisis produce la desaparición de este pico característico con el tiempo.

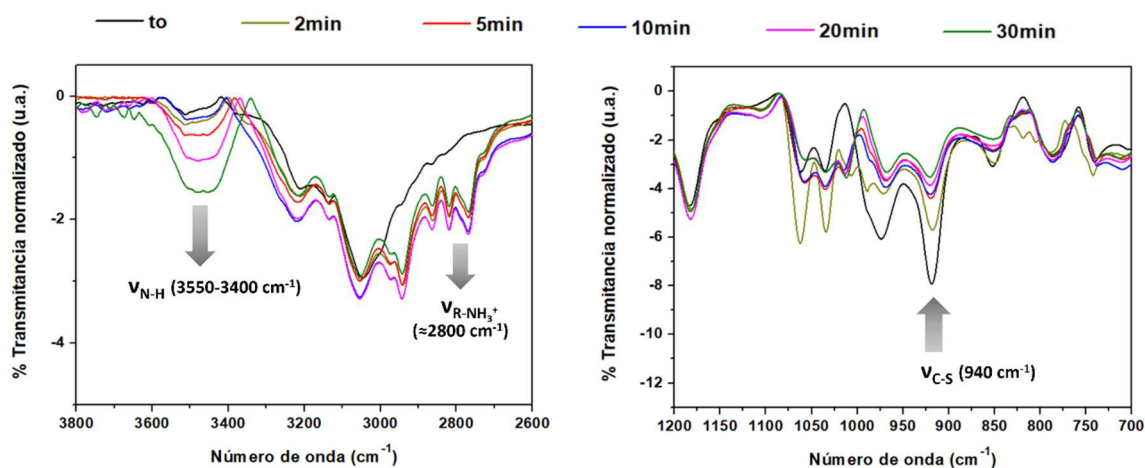


Figura 5.6. Espectros IR a diferentes tiempos de la aminólisis en la región de 3800–2600 cm^{-1} y la región de 1200-700 cm^{-1} .

Por otro lado, se observa una banda con picos definidos en torno a 2800 cm^{-1} . Esta región es característica del estiramiento asimétrico del grupo $-\text{NH}_3^+$ asociado a las sales de aminas cuaternarias. Esta evidencia permite sugerir la posibilidad de la existencia de una forma zwitteriónica debido a la migración del protón del tiol libre a la amina terciaria terminal de la 3-dimetilaminopropilamina, tal y como se indica en la Figura 5.7.

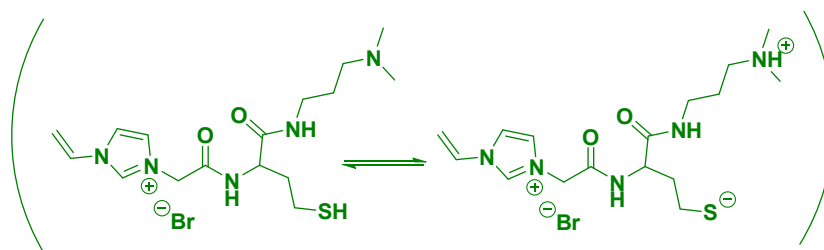
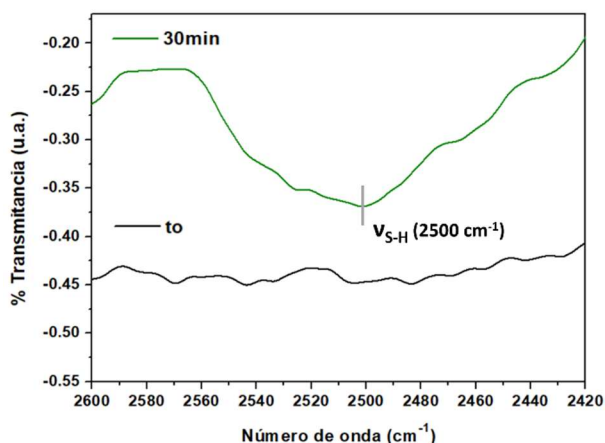


Figura 5.7. Estructuras propuestas del compuesto 6.

Sin embargo, la Figura 5.8 muestra la comparación de los espectros del monómero **5** y la aminólisis en un período de 30 minutos en la región de 2600-2400 cm^{-1} y permite mostrar también la presencia de una banda de baja intensidad característica de tiol (-SH) a 2500 cm^{-1} , lo que indica la apertura de la estructura cíclica por la liberación del tiol²¹ y se sugiere la existencia de un equilibrio entre las especies ilustradas en la Figura 5.7 donde la especie zwitteriónica puede ser la mayoritaria en relación a la intensidad de las bandas.

Figura 5.8. Comparación IR en la región de 2600–2420 cm^{-1} .

Como se ilustra en la Figura 5.9, el espectro de IR del compuesto **5** muestra una banda ligeramente ancha con el máximo centrado a 1690 cm^{-1} , la cual se puede asignar al estiramiento del carbonilo (C=O) asociado tanto a la presencia del tioéster como de la amida. Después de la adición de la amina, se observa cómo se reduce la intensidad de esta banda debido a la desaparición de la señal atribuida al grupo tioéster y se produce la aparición de una nueva banda a 1670 cm^{-1} , que corresponde al carbonilo (C=O) del nuevo

²¹ Su, Z.; Li, C.; Tan, J.; Xue, Y.; Zhang, G.; Yang, Y.; Zhang, Q. Synthesis of poly(amide-thioether) with tunable hydrophilicity via thiolactone chemistry and its application in oil-in-oil emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* **2019**, *549*, 201-211.

grupo amida presente en el compuesto **6**.²² Por otro lado, se puede identificar ligeras variaciones en la tensión (C=C) del doble enlace terminal en 1550 cm^{-1} , así como las bandas de estiramiento (C=C) a 1465 cm^{-1} y (C=N) a 1440 cm^{-1} correspondientes a la presencia del anillo de imidazolio.²³

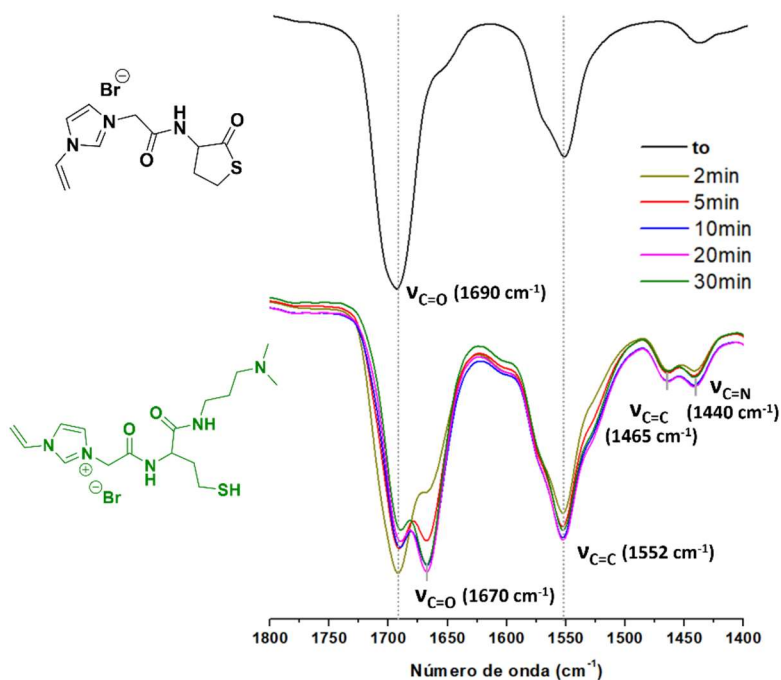


Figura 5.9. Espectros IR a diferentes tiempos de la aminólisis en la región de $1800\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$.

5.4.3 Estudio de la aminólisis por espectroscopia de Raman

Finalmente, se realizó un seguimiento de la apertura de la tiolactona para la generación del monómero **6** mediante aminólisis del compuesto **5** en presencia de DMPA (0.5 % mol) empleando espectroscopia de Raman. En este caso, el estudio se realizó empleando como disolvente una mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:4, v/v) debido a las interferencias generadas empleando otro tipo de medio de reacción. Aun así y como se observa en la Figura 5.10, se pueden apreciar determinadas bandas asignables a vibraciones correspondientes a los disolventes en las mezclas estudiadas según se referencia en la bibliografía.²⁴

²² Valverde, D.; Muñoz, I.; García-Verdugo, E.; Altava, B.; Luis, S. V. Preparation of Nanofibers Mats Derived from Task-Specific Polymeric Ionic Liquid for Sensing and Catalytic Applications. *Polymers* **2021**, *13* (18), 3110.

²³ Montolio, S.; Zagorodko, O.; Porcar, R.; Isabel Burguete, M.; Luis, S. V.; Tenhu, H.; García-Verdugo, E. Poly(acrylamide-homocysteine thiolactone) as a synthetic platform for the preparation of polymeric ionic liquids by post ring-opening-orthogonal modifications. *Polymer Chemistry* **2017**, *8* (33), 4789-4797.

²⁴ Vaskova, H.; Tomeček, M. Rapid spectroscopic measurement of methanol in water-ethanol-methanol mixtures. *MATEC Web of Conferences* **2018**, *210*, 02035.

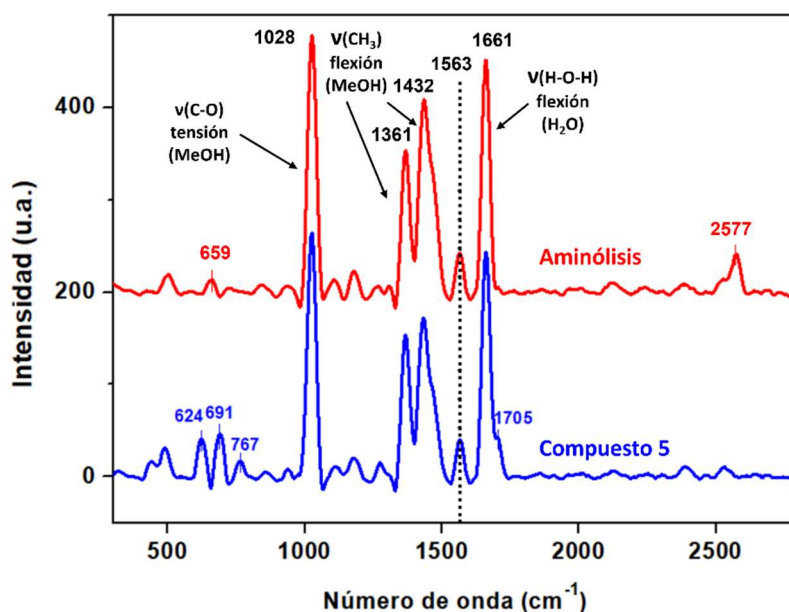


Figura 5.10. Comparación de espectros Raman. Asignación de señales correspondientes a la mezcla (H₂O:MeOH) y asignación de señales correspondientes al compuesto 5 (línea azul) y la reacción de aminólisis (línea roja).

Una vez asignadas las bandas correspondientes a la mezcla de disolvente, se pueden identificar las señales correspondientes tanto a los reactivos de partida como al monómero **6** generado por la apertura de la tiolactona. Así, como se ilustra en la Figura 5.10, se puede confirmar la apertura del anillo de tiolactona por la aparición de la banda a 2577 cm⁻¹,²⁵ asociada al grupo tiol (-S-H, línea roja), que no está presente en el espectro inicial que corresponde a la sal de imidazolio funcionalizada con la aminotiolactona disuelta en MeOH (línea azul). La baja intensidad de la señal característica del tiol sugiere la presencia de un equilibrio entre las especies propuestas (Figura 5.7) en correlación con los resultados obtenidos mediante espectroscopia IR. Por otro lado, se observan variaciones en la zona de 600-700 cm⁻¹, las cuales se pueden asociar a vibraciones C-S alifáticas a 624, 691 y 767 cm⁻¹ que desaparecen tras la apertura de la tiolactona observándose en el producto una única banda a 659 cm⁻¹ que se puede asociar a la vibración C-S del tiol. Por otro lado, se observa la desaparición de una banda a 1705 cm⁻¹ que aparece como un hombro solapado con una banda propia del disolvente. Esta banda se puede asociar al carbonilo (C=O) del grupo

²⁵ Bai, S.; Xu, R.; Wang, W.; Yu, D. Dual-response of temperature and humidity asymmetrical cotton fabric prepared based on thiol-ene click chemistry. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2019**, 567, 104-111.

tioéster, la cual desaparece tras el proceso de la aminólisis. Finalmente, se puede identificar una banda a 1563 cm^{-1} correspondiente a vibración del $\text{C}=\text{C}$ presente en el compuesto 6.

5.5 Polimerización amina-tiol-eno

Una vez establecida la metodología de apertura de la sal de imidazolio funcionalizada con la tioactona para la generación en presencia de una amina de un monómero iónico de tipo AB' , que contiene tanto el tiol (A) como el doble enlace olefínico (B'), se estudió la polimerización tiol-eno en una reacción “one-pot” para la preparación de membranas poliméricas multifuncionales, tal y como se muestra en la Figura 5.11.

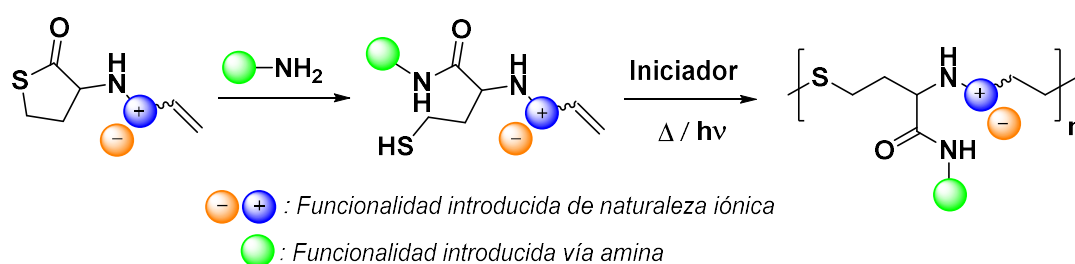


Figura 5.11. Modelo de preparación basado en aminólisis y polimerización radical tiol-eno.

El estudio se realizó a partir del estudio previo con la 3-dimetilaminopropilamina en presencia del fotoiniciador DMPA empleando una irradiación UV a 365 nm como se ilustra en la Figura 5.12.

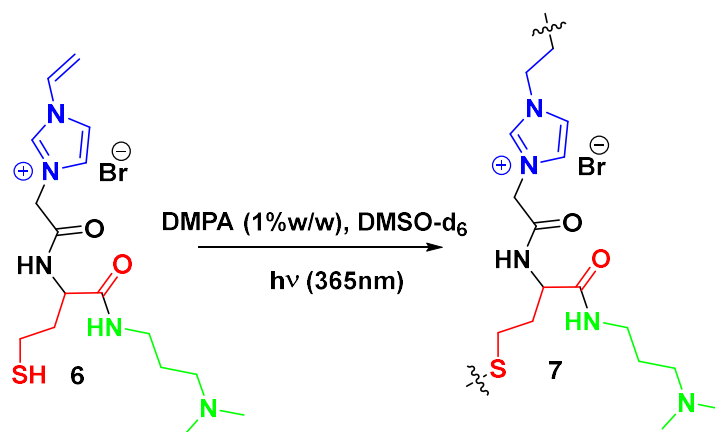


Figura 5.12. Condiciones de polimerización tiol-eno.

5.5.1 Estudio de la fotopolimerización por RMN

El estudio de fotopolimerización por RMN se realizó utilizando DMSO- d_6 como disolvente deuterado. El análisis se basó principalmente en el seguimiento de la evolución de las señales de protón correspondientes al doble enlace, ya que se presupone la desaparición o disminución debido al proceso de polimerización tiol-eno.

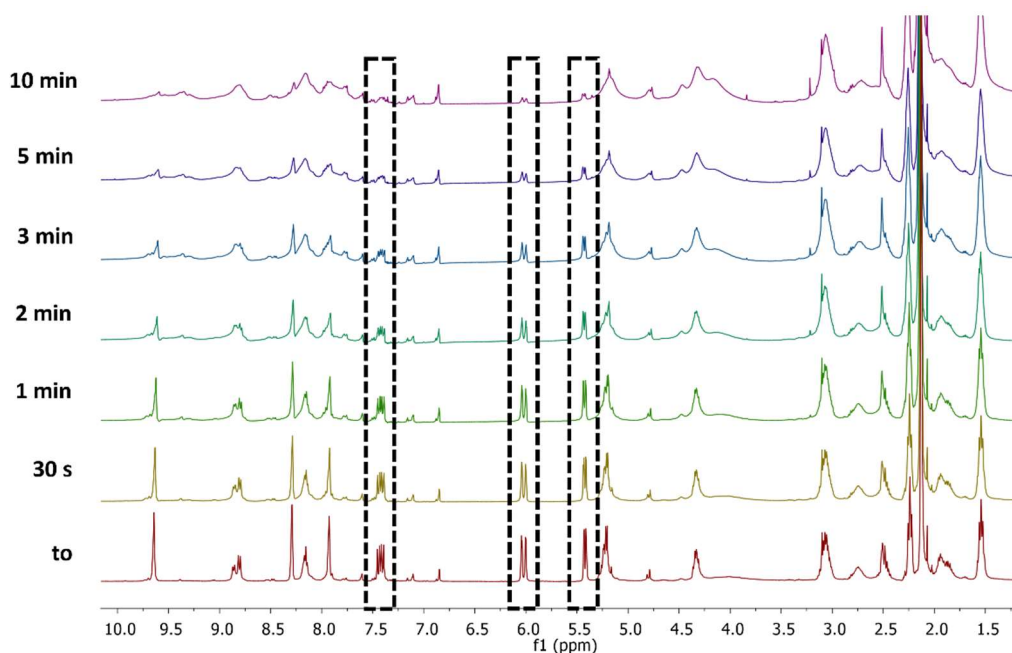


Figura 5.13. Espectros de ^1H -RMN a diferentes tiempos para monitorizar la fotopolimerización (DMSO- d_6 , $T = 30^\circ\text{C}$).

En la primera etapa, se añadió la amina al monómero en disolución y se dejó reaccionar durante 24 horas. En la segunda etapa, se añadió el fotoiniciador DMPA (0.5 % mol) y se irradió a 365 nm. El estudio de fotopolimerización se realizó a partir de la asignación de señales representada en la Figura 5.4 (apartado 5.4.1) y la monitorización de la polimerización a diferentes tiempos. Como se observa en la Figura 5.13, la fotopolimerización tiene lugar con el tiempo como indica la desaparición de las señales correspondientes al doble enlace terminal del monómero **6**. Los resultados sugieren un elevado grado de conversión, ya que la desaparición de las señales asignadas al doble enlace es prácticamente completa en un intervalo de 5-10 minutos. Además, el ensanchamiento de las señales asociadas al anillo de imidazolio en la zona aromática y protones alifáticos en la región entre 4-5.4 ppm evidencian la aparición de bandas características asociadas a la formación de polímeros.

Por otro lado, se evaluó la estabilidad del monómero en disolución y la sensibilidad a la luz solar en un período de 24 horas. Como se ilustra en la Figura 5.14, la polimerización no es fotoinducida por la luz solar y, por otro lado, el compuesto **6** en disolución se muestra estable y no se producen reacciones secundarias o la formación de intermedios.

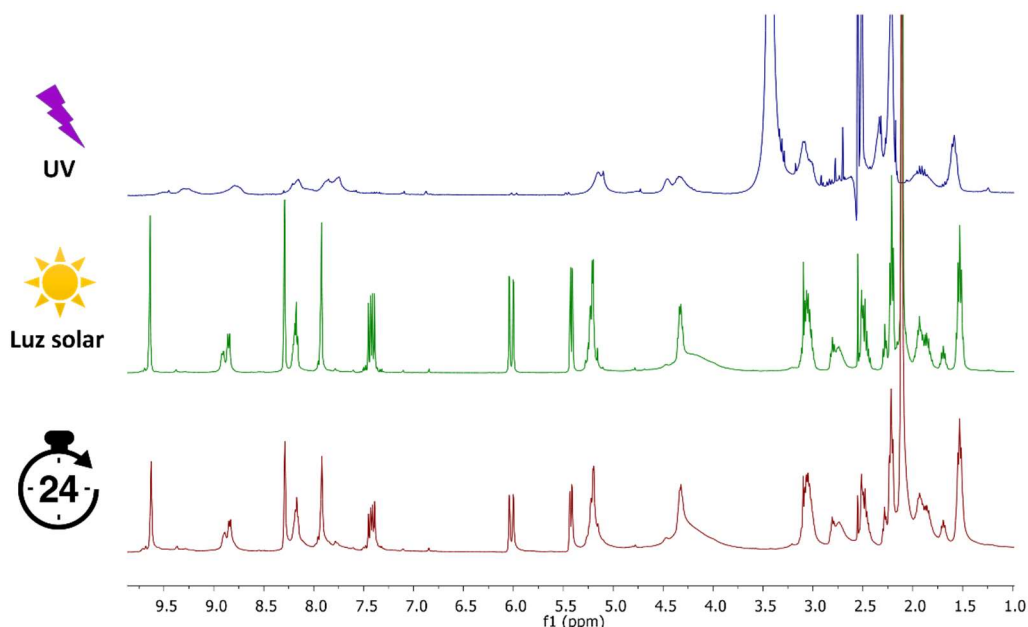


Figura 5.14. Espectros de ^1H -RMN para el estudio de estabilidad y sensibilidad. (a) Exposición UV a 365 nm, (b) Exposición a luz solar y (c) 24 horas en agitación (DMSO-d_6 , $T = 30^\circ\text{C}$).

5.5.2 Estudio de la fotopolimerización por Raman

Un estudio adicional para caracterizar la polimerización fotoinducida del monómero **6** se realizó mediante la espectroscopia de Raman. Como en el caso del estudio de la apertura de la tiolactona mediante esta técnica (apartado 5.4.3), la polimerización se estudió en una mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:4, v/v) debido a las interferencias generadas por otras mezclas de disolventes.

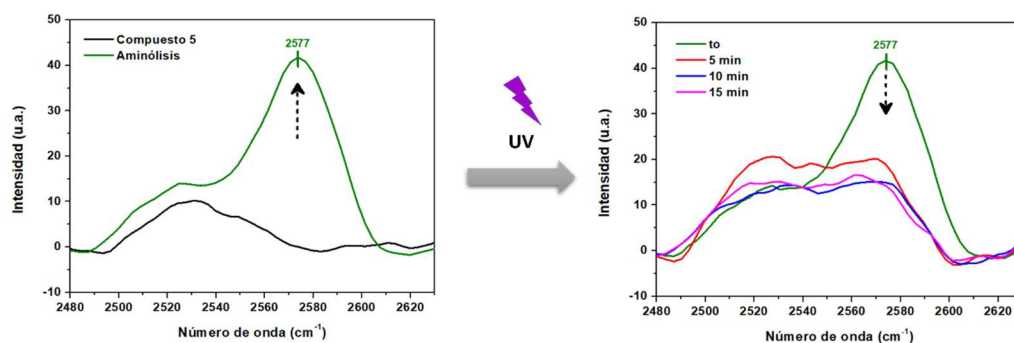


Figura 5.15. Estudio del proceso de polimerización mediante análisis por Raman en la región entre $2480\text{-}2630\text{ cm}^{-1}$.

Como se observa en la Figura 5.15, el estudio por Raman permite demostrar la polimerización del monómero debido a la disminución de la señal de vibración (2577 cm^{-1}) asociada al tiol libre -S-H generado en el proceso de aminólisis.

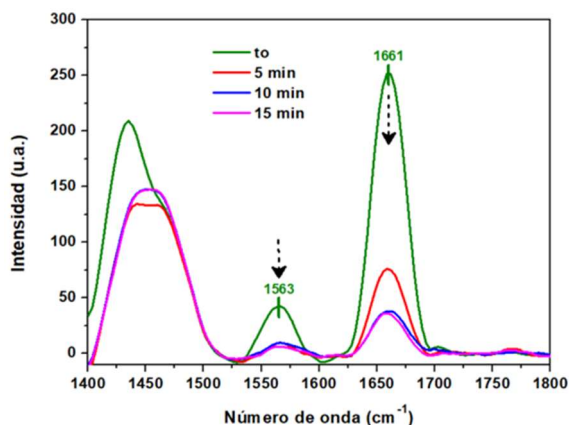


Figura 5.16. Estudio de la polimerización mediante análisis por Raman entre $1400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$.

Además, se puede observar la disminución de la banda a 1563 cm^{-1} asignable al C=C debido a la desaparición por la polimerización con -S-H y el decrecimiento en intensidad asociado a la vibración C=O de la amida I debido a una mayor rigidez inducida por la cadena polimérica formada como se observa en la Figura 5.16.

5.6 Preparación de materiales poliméricos

Una vez demostrada la posibilidad de generar estructuras poliméricas mediante esta metodología sencilla, se procedió a evaluar el diseño y síntesis de líquidos iónicos poliméricos con diferente composición, funcionalidad y grado de reticulación.

5.6.1 Optimización de la metodología de polimerización

En primer lugar, se evaluó el efecto de la elección del disolvente o mezcla de disolventes para llevar a cabo la preparación del material polimérico en forma de membranas, que se obtuvieron mediante el método de casting. Las membranas iniciales se prepararon empleando diferentes mezclas de agua con DMSO, MeOH y una mezcla DMF:DMSO como se muestra en la Figura 5.17.

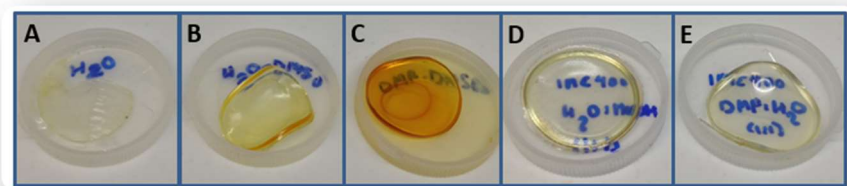


Figura 5.17. Polimerización en diferentes disolventes. (A) H₂O, (B) H₂O:DMSO (1:1), (C) DMF:DMSO (1:1), (D) H₂O:MeOH(1:1) y (E) H₂O:DMF (1:1).

En general, los sistemas con cierto contenido en disolvente orgánico generan membranas más uniformes, posiblemente debido a la reducida solubilidad del DMPA en agua. Como se observa para la polimerización de la mezcla monomérica en medio completamente acuoso, la polimerización no se produce para la formación de la membrana (membrana **A**, Figura 5.17). Por otro lado, en los casos que se empleó el DMSO (membranas **B** y **C**, Figura 5.17), se apreciaron muchos inconvenientes como fuerte olor y complicada eliminación del DMSO en el proceso de secado. Como consecuencia, las mezclas H₂O:MeOH (1:1) y H₂O:DMF (1:1) representaron las alternativas menos tóxicas y más viables para la obtención de las membranas correspondientes (membranas **D** y **E** en la Figura 5.17). Finalmente, se optó por DMF como disolvente orgánico debido a que el MeOH podría actuar como nucleófilo para producir la apertura del anillo y dar lugar a la formación de un éster secundario.

Por otro lado, se evaluaron diferentes tipos de superficies como soporte o molde para llevar a cabo la polimerización y el proceso de casting, con el objetivo de lograr disponer de un método reproducible para la preparación de membranas con un diámetro definido. La utilización de moldes de silicona para la deposición de la mezcla, la polimerización, su posterior secado y la separación de la membrana fue el sistema óptimo en términos de reproducibilidad. La Figura 5.18 ilustra de manera esquemática la preparación de la membrana incluyendo la generación de los monómeros (B), la fotopolimerización (C), el secado (D) y el desmolde (E) para obtener una membrana de líquido iónico polimérico del diámetro y grosor deseados (F).

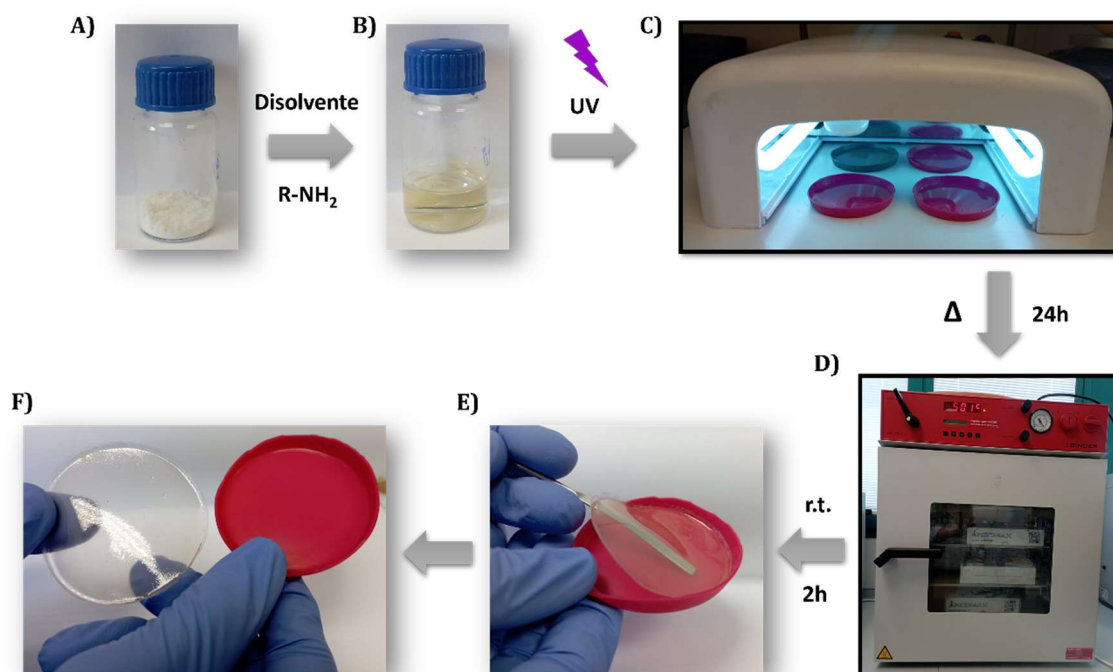


Figura 5.18. Metodología de membranas poliméricas. (A) Cantidad de monómero pesada, (B) Disolución del monómero y aminólisis, (C) Fotopolimerización UV (365 nm), (D) Secado en estufa ($50^\circ C$, 24h), (E) Separación de la membrana y (F) Membrana polimérica separada del molde.

5.6.2 Composición de membranas poliméricas

Una vez se optimizó la metodología de polimerización, el siguiente objetivo fue preparar membranas mediante la funcionalización con diferentes aminas. Las aminas propuestas (3-dimetilaminopropilamina, **A-1** y etanolamina, **A-2**) conducen a la obtención de polímeros funcionalizados con diferentes grupos polares y, por lo tanto, susceptibles de ser solubles en ciertos disolventes. Por ello, se planteó la posibilidad de introducir cierto grado de entrecruzamiento para obtener polímeros con diferente grado de reticulación mediante la introducción de un tercer componente como es la amina tripodal tris(2-aminoetil)amina (**A-3**) como se ilustra en la Figura 5.19.

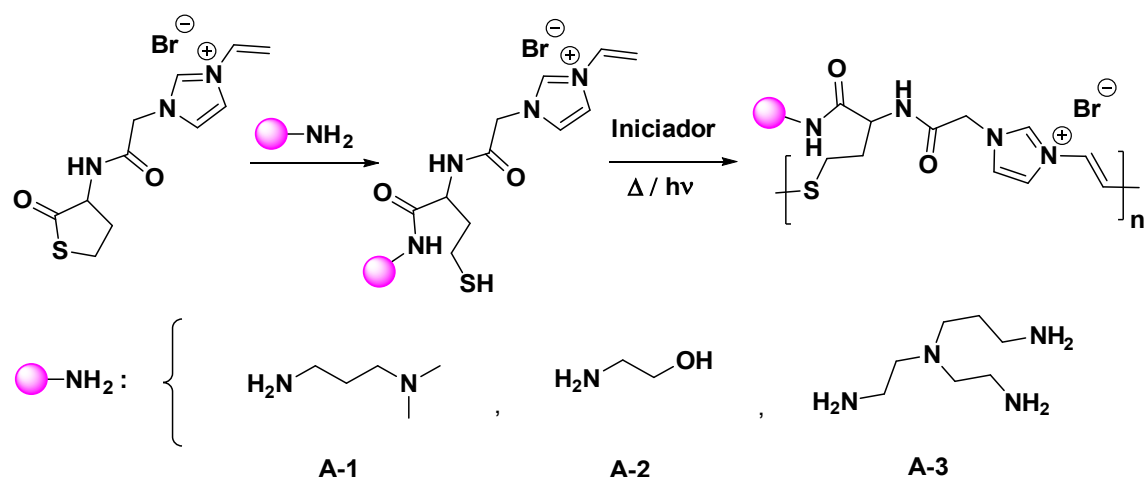


Figura 5.19. Aminas de estudio utilizadas en la reacción amina-tiol-eno del monómero sintetizado. La composición de las membranas poliméricas se preparó con variaciones en la proporción molar de tres tipos de aminas primarias. Estas composiciones se resumen en la Tabla 5.3. Las membranas poliméricas obtenidas se ilustran en la Figura 5.20.

Tabla 5.3. Composición y grado de reticulación de membranas poliméricas.

| Referencia | <chem>CN(C)CCN</chem> | <chem>NCCO</chem> | <chem>NCCNCCN</chem> |
|------------|-----------------------|-------------------|----------------------|
| M-1 | 100 % | - | - |
| M-2 | 50 % | 50 % | - |
| M-3 | 45 % | 45 % | 10 % |
| M-4 | 37.5 % | 37.5 % | 25 % |
| M-5 | 25 % | 25 % | 50 % |

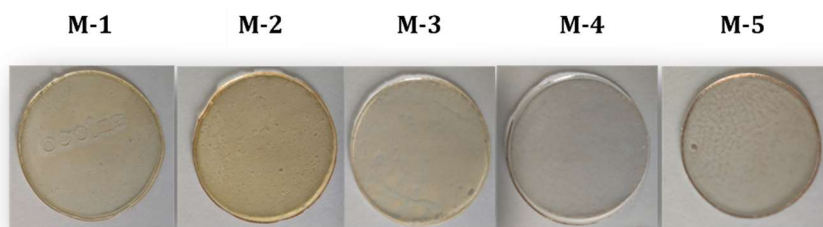


Figura 5.20. Membranas poliméricas obtenidas según las composiciones de la Tabla 5.3.

La solubilidad de las membranas poliméricas diseñadas se evaluó para determinar qué composiciones eran más adecuadas para la etapa posterior de inmovilización de una sonda colorimétrica. Las pruebas de solubilidad se realizaron en MeOH y H₂O, ya que las sondas colorimétricas son generalmente solubles en ambos disolventes. Los resultados se resumen en la Tabla 5.4 y la Figura 5.21. Como cabría esperar, las membranas en ausencia de amina entrecruzante (**A-3**) son solubles, mientras que los polímeros con un grado de reticulación del 50% muestran estabilidad en MeOH y cierto hinchamiento en H₂O. De este modo, las pruebas de inmovilización se realizaron con membranas de 50 % de entrecruzamiento.

Tabla 5.4. Resultados de las pruebas de solubilidad e hinchamiento de las membranas poliméricas.

| | M-1 | M-2 | M-3 | M-4 | M-5 |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| MeOH | - | - | - | + | ++ |
| H ₂ O | -- | -- | -- | -- | + |

Bajo hinchamiento (++) , hinchamiento sin pérdida de forma (+) , hinchamiento con pérdida de forma (-) y alto hinchamiento y completa disolución (--).

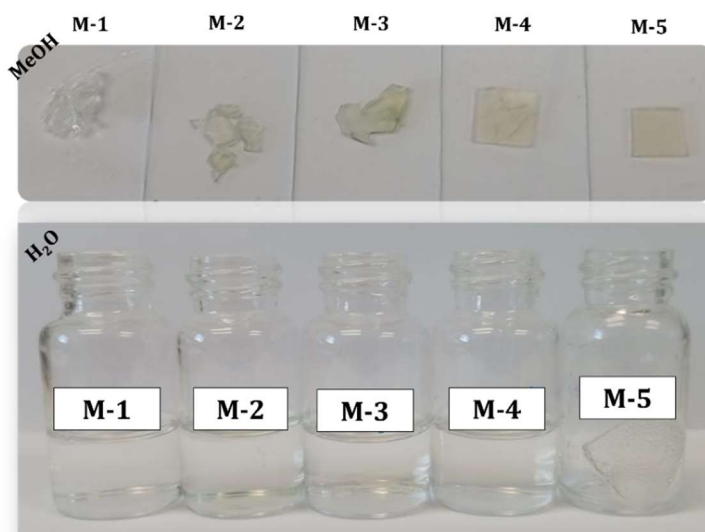


Figura 5.21. Pruebas de solubilidad e hinchamiento de las membranas poliméricas.

5.6.3 Evaluación de la naturaleza higroscópica

La etapa crítica en la preparación de las membranas es la separación del molde, ya que esta etapa está limitada por las propiedades mecánicas de la membrana polimérica. Si la membrana es un material rígido, por lo general presenta una gran tendencia a quebrarse. Sin embargo, si es flexible, se puede extraer del molde de manera sencilla. En el caso de las membranas estudiadas, estas características de flexibilidad o rigidez dependen claramente

del entorno. Así, cuando la membrana se deja estabilizar con las condiciones del entorno durante un período de tiempo mínimo (2 horas aproximadamente), el material es maleable y se facilita el desmolde y el manejo para estudios sucesivos. Por el contrario, cuando la membrana se seca de manera exhaustiva, su naturaleza es rígida y quebradiza, dificultándose tanto el desmolde como la manipulación posterior. Estas diferencias podrían asociarse, teniendo en cuenta la naturaleza higroscópica del polímero, a la absorción de humedad presente en la atmósfera a la que se expone la membrana.²⁶ En la literatura se establece que la humidificación de ciertos polímeros, especialmente aquellos higroscópicos, a través de la difusión de las moléculas de agua a través de la estructura polimérica puede resultar en cambios significativos de propiedades mecánicas y termomecánicas.^{27,28} En este sentido, el efecto más importante sobre las propiedades mecánicas es el efecto plastificante del agua que conlleva un cambio en propiedades tales como reblandecimiento o elasticidad. Este efecto de plastificación puede atribuirse tanto al debilitamiento de los puentes de hidrógeno entre cadenas como a que la rigidez de la cadena disminuye notablemente, ocasionada por los impedimentos estéricos que producen dichos enlaces de hidrógeno.²⁹

Por lo general, la difusión de la humedad se caracteriza por un aumento en la masa del material después de la exposición a un ambiente húmedo. En este sentido, el método más común para evaluar los procesos de absorción en compuestos poliméricos es el registro de datos de ganancia de peso en función del tiempo. El análisis de absorción de humedad se realizó de acuerdo con la norma estándar ASTM D570-98 mediante la Ecuación 5.4 donde M es el porcentaje de absorción de humedad, M_t es la masa absorbida después de un tiempo determinado (gramos), y M_i es la masa inicial en condiciones de completa ausencia de humedad (gramos).³⁰

$$M (\%) = \frac{M_t - M_i}{M_i} \cdot 100$$

Ecuación 5.4. Norma estándar para determinar la absorción de humedad.

²⁶ Emri, I.; Pavsek, V. On the influence of moisture on the mechanical properties of polymers. *Materials Forum* **1992**, *16*, 123-131.

²⁷ Banjo, A. D.; Agrawal, V.; Auad, M. L.; Celestine, A.-D. N. Moisture-induced changes in the mechanical behavior of 3D printed polymers. *Composites Part C: Open Access* **2022**, *7*, 100243.

²⁸ Shen, C.-H.; Springer, G. S. Moisture Absorption and Desorption of Composite Materials. *Journal of Composite Materials* **1976**, *10* (1), 2-20.

²⁹ Peraña, J.M; Caracterización mecánica de Polímeros: propiedades mecanodinámicas, A Coruña: Universidade, 1997, p. 191-213.

³⁰ ASTM D570-98: Standard Test Method for Water Absorption of Plastics, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2018.

Este procedimiento se realizó para las diferentes composiciones de membranas poliméricas en un entorno de humedad relativa controlada para evaluar el efecto en la absorción del agua. En el estudio, se seleccionó la sal saturada de NH_4Cl que corresponde aproximadamente al 80 % de humedad relativa (RH). Con el fin de poder evaluar el efecto proporcionado por la sustitución de la amina empleada en la aminólisis de la sal de imidazolio de la tiolactona, se preparó otra composición adicional con amina de carácter hidrofóbico como la dodecilamina. La composición de la membrana **M-6** se resume en la Figura 5.22, donde se empleó una mezcla de aminas al 50 % en proporción molar de la dodecilamina como amina hidrofóbica y 50 % de **A-3** como entrecruzante.

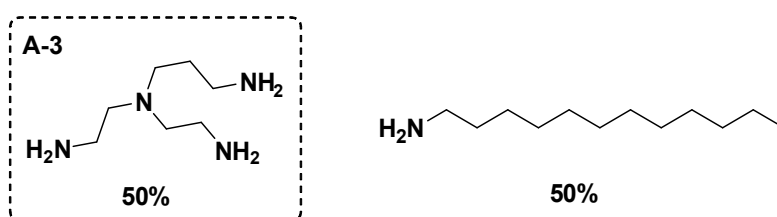


Figura 5.22. Composición de la membrana **M-6**.

La Figura 5.23 muestra la evolución de la absorción de humedad según la Ecuación 5.4 en función del tiempo para las distintas membranas poliméricas durante un período de exposición de 24 horas.

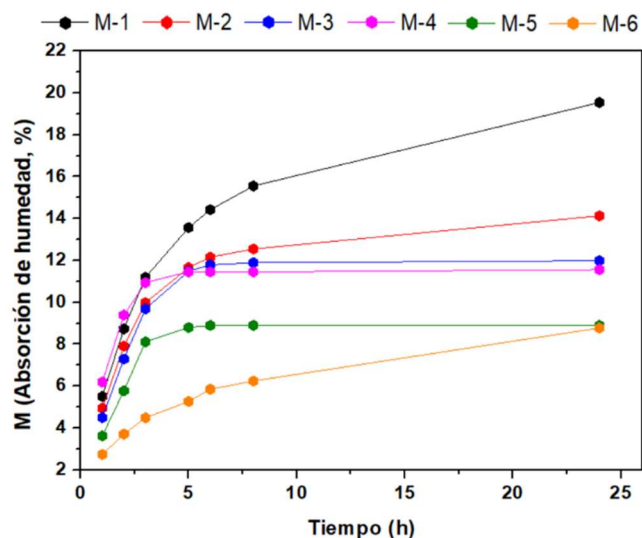


Figura 5.23. Estudio de absorción de humedad para las membranas poliméricas a 80% RH (sol. saturada de NH_4Cl).

Como puede observarse, para todas las membranas, el contenido de agua aumentó con el tiempo de exposición hasta alcanzar un valor de equilibrio, el cual se puede definir como el contenido de agua en el equilibrio. La polaridad y el volumen libre son principalmente dos

posibles factores que pueden controlar el contenido de agua en el equilibrio. El factor de la polaridad viene asociado a la naturaleza de los grupos funcionales introducidos en la estructura polimérica durante la aminólisis. Como puede observarse en la Figura 5.23, existen diferencias en el grado de absorción entre las membranas **M-1** y **M-2** (> 13 %) respecto de la membrana **M-6** (< 8 %). Este efecto se debe a la presencia de grupos amino e hidróxilo en estas membranas que no solo aumentan el carácter polar del polímero, sino que también pueden favorecer la formación de puentes de hidrógeno entre estos grupos y las moléculas de agua absorbidas. Por el contrario, la presencia de la dodecilamina proporciona un carácter menos polar que disminuye su compatibilidad con el agua y, por lo tanto, el porcentaje de agua absorbida en la membrana. Por otro lado, el volumen libre se ve afectado por la estructura del monómero y la densidad de reticulación en los polímeros. En este sentido, a medida que cambia el empaquetamiento y aumenta el entrecruzamiento desde polímeros lineales a polímeros reticulados (**M-1/M-2**<**M-3**<**M-4**<**M-5**) se observa un decrecimiento en la capacidad absorbente del material polimérico, ya que se reduce el espacio libre para las moléculas de agua. De este modo, el aumento del nivel de reticulación resulta en una menor capacidad de absorción.

5.6.4 Estudio higroscópico de captación en humedad controlada

Una vez establecido el carácter higroscópico de las membranas, el siguiente estudio se centró en la absorción de humedad empleando diferentes entornos de humedad relativa controlada para determinar el comportamiento higroscópico y su capacidad para absorber humedad del medio circundante. El empleo de soluciones saturadas de diferentes sales permite generar de manera sencilla valores de humedad relativa controlada que van desde aproximadamente 3 % RH hasta 98 % RH.³¹ En nuestro caso, se emplearon tres medios de humedad controlada y conocida (Tabla 5.5) que se expusieron a membranas de 1 cm x 1 cm empleando la composición **M-5** de la Tabla 5.3.

Tabla 5.5. Humedad relativa de soluciones saturadas de sales

| Tipo de sal | RH (% , 25°C) |
|--------------------------------|---------------|
| K ₂ CO ₃ | 43 |
| NaBr | 58 |
| NH ₄ Cl | 79 |

³¹ Greenspan, L.; Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. *J. Res. Nat. Bur. Stand.-A Physics and Chemistry* **1977**, *81*, 89-96.

La espectroscopia FT-IR-ATR se utilizó para analizar la absorción de agua y proporcionar información adicional sobre la capacidad absorbente de este tipo de materiales.³² Para ello, se tomaron espectros de las membranas en función del tiempo de exposición de la membrana en contacto con atmósferas de humedad controlada (Tabla 5.5) que proporciona de modo cualitativo como se produce la hidratación de este polímero.

La Figura 5.24 muestra una ampliación del espectro de FT-IR-ATR del polímero secado de forma exhaustiva para el rango de 3800-2500 cm^{-1} . En el espectro se puede observar un perfil complejo donde varias bandas se solapan. Pese a la complejidad de estas bandas, se puede distinguir a mayor frecuencia (3400 cm^{-1}) un hombro ancho que se puede asociar a la banda correspondiente al -NH-. Además, se observan C-H aromáticos de catión de imidazolio. Así, las bandas de vibración a mayor número de onda (3240 cm^{-1}) corresponden a los enlaces C₄-H y C₅-H, mientras que las bandas a un número menor (3070 cm^{-1}) corresponden al enlace C₂-H del imidazolio. Finalmente, la señal a 2930 cm^{-1} se puede asociar al estiramiento antisimétrico de los CH alifáticos.^{33,34}

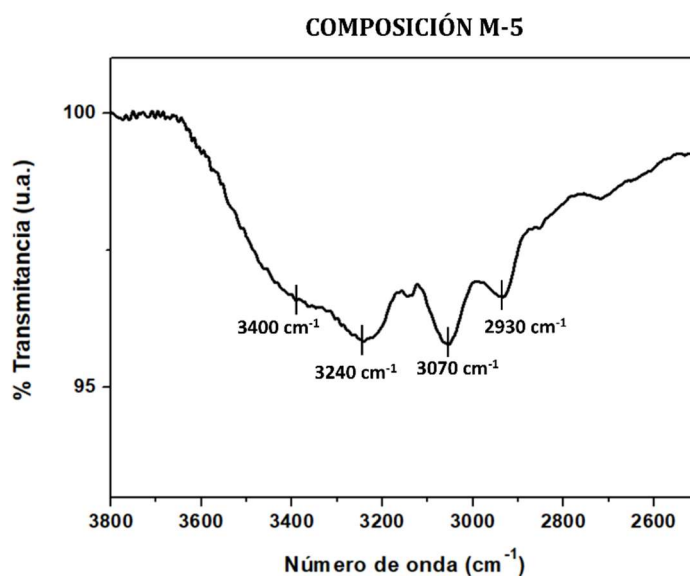


Figura 5.24. Espectro IR de la membrana **M-5** en la región de 3800–2500 cm^{-1} .

³² Bridelli, M. Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the Study of Hydrated Biological Macromolecules. 2017; p 22.

³³ Kudo, S.; Nakashima, S. Water adsorption with relative humidity changes for keratin and collagen as studied by infrared (IR) micro-spectroscopy. *Skin Research and Technology* **2019**, 25 (3), 258-269.

³⁴ Lagaron, J. M.; Gimenez, E.; Catala, R.; Gavara, R. Mechanisms of Moisture Sorption in Barrier Polymers Used in Food Packaging: Amorphous Polyamide vs. High-Barrier Ethylene-Vinyl Alcohol Copolymer Studied by Vibrational Spectroscopy. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2003**, 204 (4), 704-713.

Como se observa en la Figura 5.25, las bandas características del espectro aumentan en intensidad a medida que aumenta el porcentaje de humedad relativa. El aumento de la humedad promueve la inserción de moléculas de agua y la formación de nuevos enlaces de hidrógeno. De este modo, la intensidad de las bandas de absorción difiere dependiendo del cambio en el momento dipolar de los átomos que participan en el enlace de hidrógeno intermolecular.³⁵

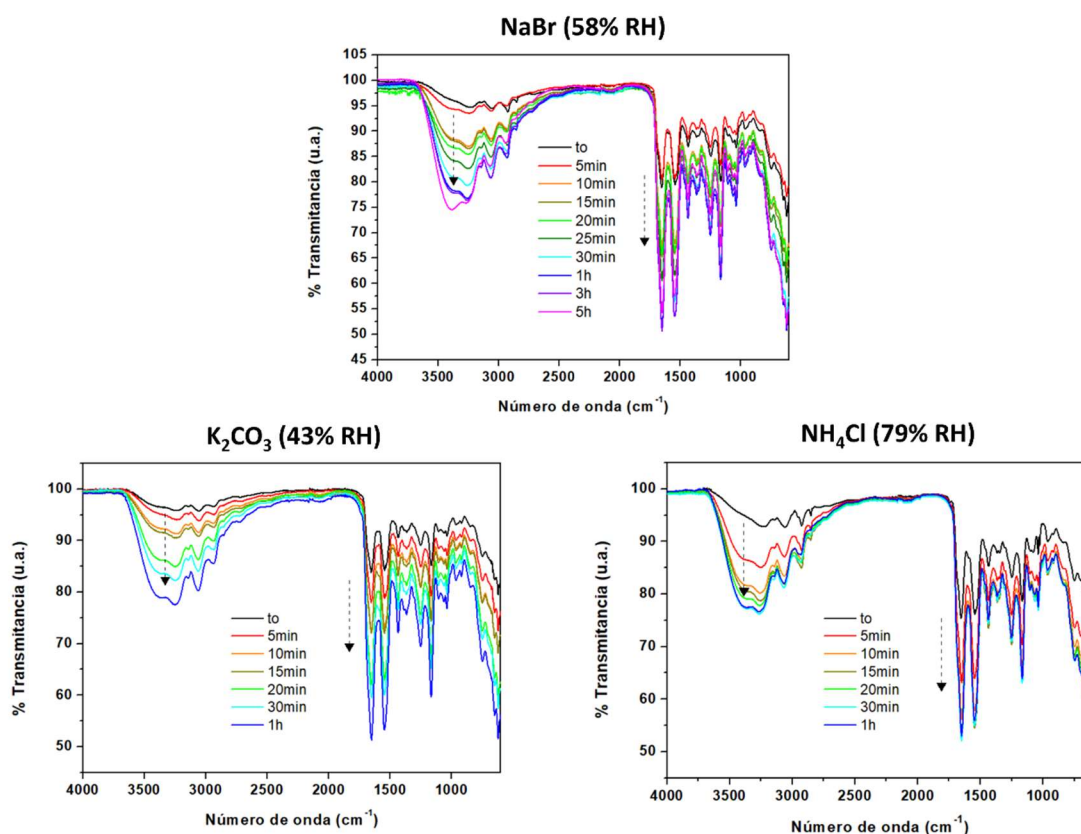


Figura 5.25. Cambios espectrales de IR asociados a la humedad relativa (RH, %) con el tiempo.

En todos los casos, a medida que se produce la hidratación de la membrana, se produce la aparición de una banda ancha y creciente que se sitúa entre 3200-3600 cm^{-1} .³⁶ La posición e intensidad de estas bandas son muy sensibles al entorno y la asociación del agua a través de puentes de hidrógeno. Así, estas bandas denominadas ν_3 y ν_1 en el vapor de agua absorben, respectivamente, a 3756 cm^{-1} y 3657 cm^{-1} . Desplazándose a un número de onda más bajo cuando el agua interactúa con el medio (p. ej. agua disuelta en un disolvente o

³⁵ Issa, Y. M.; Abdel-Maksoud, G.; Ibrahim, M.; Magdy, M. A combination of analytical methods to evaluate the effect of humidity aging on the painting materials of icon models. *Vibrational Spectroscopy* **2020**, *107*, 103010.

³⁶ Célino, A.; Gonçalves, O.; Jacquemin, F.; Fréour, S. Qualitative and quantitative assessment of water sorption in natural fibres using ATR-FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *101*, 163-170.

absorbido en un polímero) produciendo una banda ancha con un máximo en *ca.* 3300 cm^{-1} que indica la presencia de agregados de agua u otros tipos de asociación de agua mediante puentes de hidrógeno.³⁷ Por otro lado, el incremento del área de las bandas en la región de $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ puede atribuirse a la contribución del modo de flexión H-O-H de las moléculas de agua que muestra solapamiento con el estiramiento del carbonilo (C=O) del grupo amida centrado a 1690 cm^{-1} .³⁸

Por otro lado, se puede observar que el grado de hidratación muestra una cinética que depende del grado de humedad relativa. Como se ilustra en la Figura 5.26, este efecto se observa si se comparan los espectros de IR al mismo tiempo para diferentes niveles de humedad. El cambio de intensidad de las señales es mayor a medida que aumenta el grado de humedad relativa y sigue una cinética de hidratación más rápida como se ilustra en tiempos de 10 y 30 minutos.

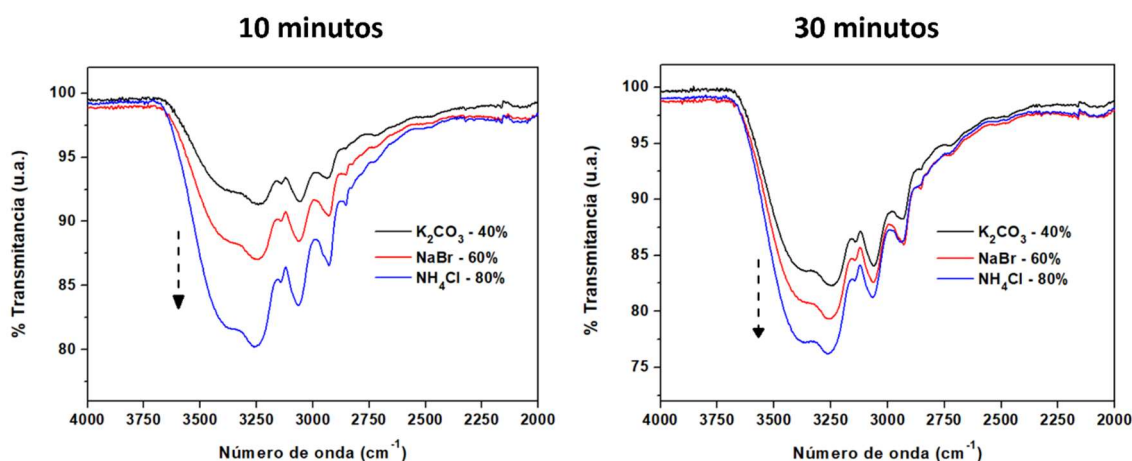


Figura 5.26. Comparación de cambios espectrales IR para diferentes humedades relativas a 10 y 30 minutos.

5.6.5 Estudio de las propiedades mecánicas por absorción de humedad

Como ha quedado claro, las membranas poliméricas presentan un carácter higroscópico y, como resultado de esta naturaleza, pueden hidratarse. Esta hidratación afecta a sus propiedades mecánicas. Esta sección investiga las propiedades mecánicas de estas membranas para comprender el comportamiento mecánico en función del grado de hidratación. Las propiedades mecánicas de un material determinan el comportamiento de

³⁷ Cammarata, L.; Kazarian, S. G.; Salter, P. A.; Welton, T. Molecular states of water in room temperature ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2001**, 3 (23), 5192-5200.

³⁸ Velazquez, G.; Herrera-Gómez, A.; Martín-Polo, M. O. Identification of bound water through infrared spectroscopy in methylcellulose. *Journal of Food Engineering* **2003**, 59 (1), 79-84.

estos bajo la acción de fuerzas externas continuas o discontinuas, estáticas, dinámicas o cíclicas que se ejercen sobre ellos. Es decir, las propiedades mecánicas son las propiedades que posee un material relacionadas con su capacidad de transmitir y resistir fuerzas o deformaciones. En este sentido, es importante destacar que las propiedades mecánicas de los materiales se definen en función de la composición química y estructura interna del material a evaluar. El ensayo de tracción se puede considerar, entre todas las pruebas mecánicas que se puede realizar en un material, como el tipo de ensayo para establecer el comportamiento mecánico de un material dado, ya que estos son simples, relativamente baratos y totalmente estandarizados.

Para estos ensayos se utilizan trozos de material llamados "probetas" o "muestras" como se ilustra en la Figura 5.27a. Una probeta del material es un trozo de material con dimensiones normalizadas para realizar un cierto ensayo (p. ej. ensayo de tracción). Estas dimensiones normalizadas son la longitud de la probeta (L_0) y el área de su sección transversal (S_0 : $a \times b$, a : espesor y b : anchura). En este ensayo se somete al material a una fuerza de tracción, es decir, se le aplica una fuerza o varias fuerzas externas que van a tratar de estirar el material. De hecho, durante el ensayo el material se estira, aplicando sobre él cada vez más fuerza, hasta llegar a su rotura.

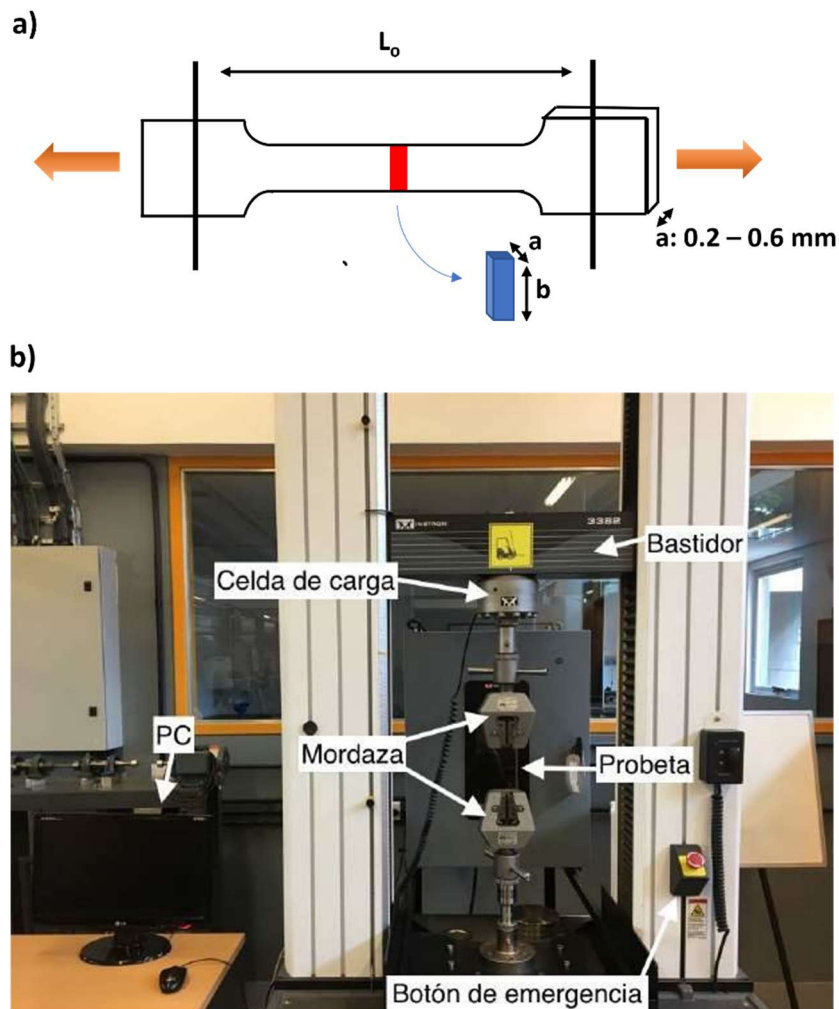


Figura 5.27. (a) Forma y dimensiones de probeta utilizada en el ensayo de tracción y (b) Máquina utilizada en el ensayo de tracción.

Como se ilustra en la Figura 5.27b, la probeta se coloca y se agarra por sus extremos entre dos accesorios llamados "agarres" o "mordazas" que sujetan la probeta en la máquina del ensayo en posición vertical. Posteriormente, se aplica una fuerza exterior por uno de los extremos de la probeta a una velocidad lenta y constante. Según se aplica más fuerza sobre la probeta, la probeta llegará un momento que empezará a estirarse, disminuyendo su sección y aumentando su longitud. En este proceso se sigue aplicando cada vez más fuerza externa hasta que llegue un momento que la probeta rompa.

En nuestro caso, los ensayos estáticos de tracción se hicieron bajo las especificaciones de la norma ASTM D3039³⁹ en un equipo de ensayo, al fin de determinar el valor del módulo elástico (E), la resistencia a la tracción (σ_R) y la deformación a rotura (ϵ_R) para cada material.

³⁹ D. Astm, "3039," Standard test method for tensile properties of polymer matrix composite materials, p. 10, 2000.

La realización del ensayo conlleva la representación de un diagrama de fuerza-alargamiento como se representa en la Figura 5.28a. Los puntos 1 y 2 muestran la correlación entre la fuerza aplicada y el alargamiento producido en la probeta, en el punto 3 se aprecia que disminuye la sección de la probeta y, finalmente, el punto 4 corresponde al momento en que la probeta rompe. Dicho diagrama se transforma en un diagrama de tensión-deformación unitaria a partir de la Ecuación 5.5 y la Ecuación 5.6, donde σ_e = Tensión, F = fuerza aplicada, S_o = área de la sección, ε = deformación unitaria, L = longitud de la probeta en un momento determinado, L_o = longitud inicial de la probeta.

$$\sigma_e \left(Pa \text{ o } \frac{N}{m^2} \right) = \frac{F (N)}{S_o (m^2)}$$

Ecuación 5.5. Fórmula para calcular la tensión.

$$\varepsilon = \frac{L - L_o (m)}{L_o (m)}$$

Ecuación 5.6. Fórmula para calcular la deformación unitaria.

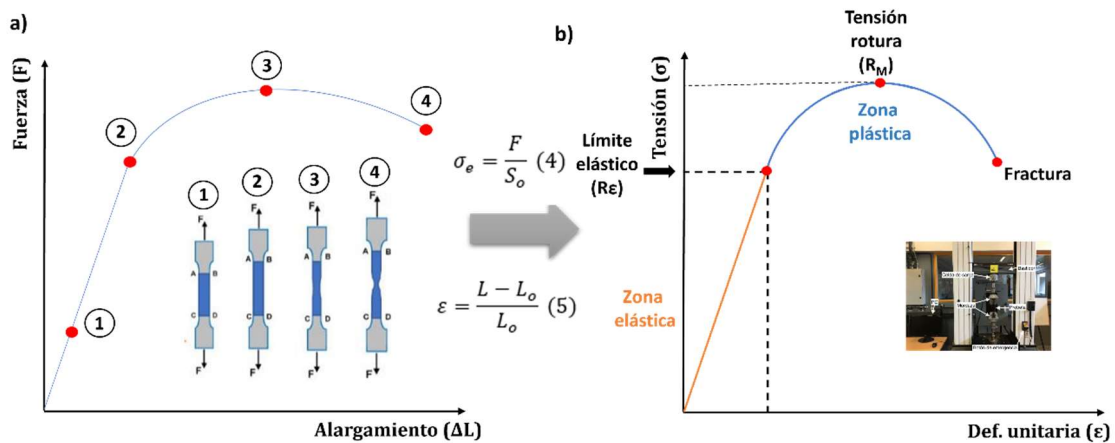


Figura 5.28. (a) Diagrama de fuerza-alargamiento y (b) Diagrama de tensión-deformación unitaria. En el gráfico tensión-deformación unitaria (Figura 5.28b) se pueden observar dos regiones diferenciadas: zona elástica (lineal) y zona plástica (curva). La zona elástica (línea naranja) corresponde a la zona en que la relación entre la tensión y la deformación es lineal, es decir hay una proporción entre la tensión aplicada y la deformación producida en el material. En dicha zona, el material recupera su forma inicial cuando se elimina la carga aplicada. En esta zona del ensayo se cumple la Ley de Hooke como se indica en la Ecuación 5.7.

$$\sigma_e = E \cdot \varepsilon$$

Ecuación 5.7. Fórmula correspondiente a la Ley de Hooke.

La constante de proporcionalidad se define como el módulo de young (E) y corresponde a la pendiente de la recta en la zona elástica. Dicho comportamiento solo se cumple hasta el límite elástico (R_ϵ), el cual representa la tensión máxima que un material elástico puede soportar sin sufrir deformaciones permanentes al ser descargado de la fuerza a la que se le somete. Por otro lado, la zona plástica (línea azul) corresponde a la región donde se producen deformaciones permanentes y no existe proporcionalidad entre la tensión aplicada y el alargamiento producido. En esta zona se puede identificar la tensión de rotura o resistencia a la tracción (σ_R o R_M , Ecuación 5.8) que se define como la tensión máxima que soporta el material. Finalmente, la elongación a rotura se puede calcular a partir de la Ecuación 5.9, donde L_f = longitud en el momento de la fractura.

$$\sigma_R = \frac{F_{max}}{S_o}$$

Ecuación 5.8. Fórmula para calcular la resistencia a la tracción.

$$e_R = \frac{L_f - L_o(m)}{L_o(m)} \cdot 100$$

Ecuación 5.9. Fórmula para calcular la elongación a rotura.

De este modo, el comportamiento de los materiales se estudió mediante el ensayo de tracción en diferentes grados de humedad para 3 réplicas de cada muestra. En la Figura 5.29 se representan los resultados en relación con el valor del módulo elástico (E), la resistencia a la tracción (σ_R) y la deformación a rotura (e_R) según el grado de humedad para seis condiciones: membrana completamente seca (0%) y membranas expuestas a una atmósfera de humedad controlada de sales saturadas de LiCl (11%), K_2CO_3 (43%), NaBr (60%), NH_4Cl (80%) y K_2SO_4 (98%).

El módulo de elasticidad o módulo de Young (E) indica la rigidez de un material. En este sentido, cuanto más rígido es un material mayor es su módulo de elasticidad. La Figura 5.29a muestra la disminución del módulo de elasticidad a medida que aumenta el grado de hidratación de la membrana. De este modo, la membrana polimérica pierde rigidez y adquiere un comportamiento de elastómero. Por otro lado, la resistencia a la tracción (Figura 5.29b) muestra una tendencia similar, ya que su valor disminuye a medida que aumenta el grado de humedad. El material polimérico es más resistente y frágil a menor grado de humedad, mientras que se vuelve menos resistente y más dúctil a mayor grado de humedad. Cabe destacar que se aprecia un valor superior para el 11 % de humedad en comparación con el material en ausencia de humedad. Esto se debe a la presencia de

imperfecciones o puntos donde se focaliza la fuerza aplicada y conllevan una rotura más temprana o tardía en materiales altamente frágiles afectando al valor experimental. Finalmente, la elongación a rotura (Figura 5.29c) muestra un aumento de valor a medida que aumenta la absorción de humedad, ya que el cambio de comportamiento frágil a dúctil supone una mayor deformación plástica. Sin embargo, el límite se observa en un entorno del 60 % de humedad debido a que un mayor grado de humedad supone una pérdida en la consistencia del material y rompe a menor alargamiento. En resumen, se puede concluir que la absorción de agua tiene una fuerte influencia sobre el comportamiento y las propiedades mecánicas de las membranas poliméricas.

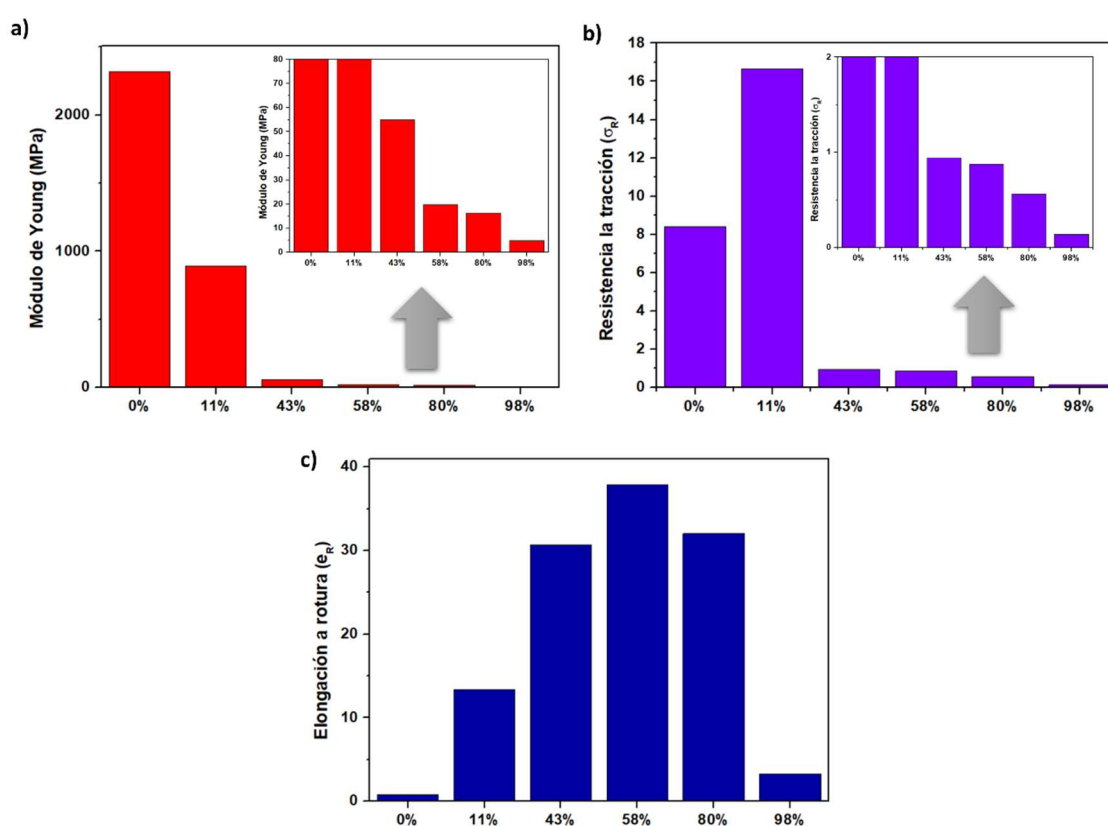


Figura 5.29. Representación gráfica de los parámetros. (a) Módulo de Young, (b) Resistencia a la tracción y (c) Elongación a rotura.

5.7 Control de humedad en la industria alimentaria

La influencia de la absorción de humedad en los sistemas de envasado de alimentos es de gran importancia para preservar su calidad, ya que se trata de una de las principales razones por las que se produce su deterioro y degradación. La prevención en el estado de conservación es necesaria para regular los niveles de humedad en las áreas de exposición y

almacenamiento.⁴⁰ Así, por ejemplo, el control de la humedad para mantener los productos frescos y reducir el desperdicio de alimentos es un factor clave en la industria alimentaria. En este contexto, la capacidad de controlar y mantener una humedad alta (90-100 % RH) a baja temperatura es clave para maximizar la vida de almacenamiento, ya que se minimiza la pérdida de agua y la degradación celular.⁴¹

De este modo, los sistemas sensibles a la humedad se pueden construir a través de muchas estrategias que normalmente miden las propiedades ópticas o eléctricas dependientes de la humedad. Entre estos tipos de sistemas, la ventaja principal de los sistemas colorimétricos de humedad se asocia a la fácil detección visual asociada al cambio de color exhibido sin requerir instrumental especial o fuentes externas de energía.⁴² Por esto, los sistemas colorimétricos se consideran de gran interés, ya que el cambio de color se puede estimar como respuesta a la variación de humedad y su posible aplicación en la vida diaria.

5.7.1 Inmovilización de sonda colorimétrica

Los sistemas colorimétricos de humedad están basados principalmente en el uso de sales inorgánicas, indicadores de pH o colorantes orgánicos, los cuales muestran una transición crómica en función de la humedad relativa.⁴³ En este apartado, se describe el desarrollo de un sistema sensible a la humedad, el cual está basado en la inmovilización de una sonda colorimétrica o indicador de pH en la membrana polimérica preparada a partir del precursor del monómero derivado de tiolactona.

Inicialmente, se evaluó la selección adecuada de la sonda colorimétrica para la inmovilización atendiendo al viraje colorimétrico, ya que dicho cambio de color debe ser sensible al grado de humedad. Para ello, se llevó a cabo un estudio de pH durante la apertura del monómero en presencia de las tres aminas utilizadas de forma independiente para evaluar la dependencia del pH respecto de cada una de ellas. Como se refleja en la Tabla 5.6, la 3-dimetilaminopropilamina proporciona un medio más básico en comparación con las otras aminas y, como consecuencia, se puede esperar una membrana polimérica más básica

⁴⁰ Weston, M.; Geng, S.; Chandrawati, R. Food Sensors: Challenges and Opportunities. *Advanced Materials Technologies* **2021**, *6* (5), 2001242.

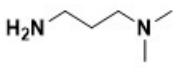
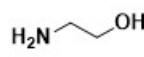
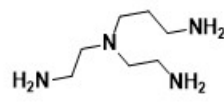
⁴¹ Gast, K. L. B. Storage conditions: Fruits and Vegetables. (accessed June 23, 2020). <https://extension.umaine.edu/publications/4135e/>

⁴² Momtaz, M.; Chen, J. High-Performance Colorimetric Humidity Sensors Based on Konjac Glucomannan. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2020**, *12* (48), 54104-54116.

⁴³ Fernández-Ramos, M. D.; Ordóñez, Y. F.; Capitán-Vallvey, L. F.; Vargas-Sansalvador, I. M. P. d.; Ballesta-Claver, J. Optical humidity sensor using methylene blue immobilized on a hydrophilic polymer. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *220*, 528-533.

cuando sea mayor la proporción de esta amina. Del mismo modo, se midió el pH de la apertura del anillo de tiolactona para la composición **M-5**, el cual presentó un valor superior a 9.

Tabla 5.6. Cálculo de pH para la aminólisis después de 24 horas de reacción.

| | | | | |
|-------------------|---|---|--|------------|
| Referencia |  |  |  | M-5 |
| pH | 9.70 | 8.80 | 8.90 | 9.20 |

Una vez conocido el rango de pH, se propuso el rojo de cresol (Figura 5.30) como sonda colorimétrica debido a que presenta un viraje colorimétrico (de amarillo a morado) dentro de un rango de valores de pH cercano al valor de pH para la disolución del monómero **6**.

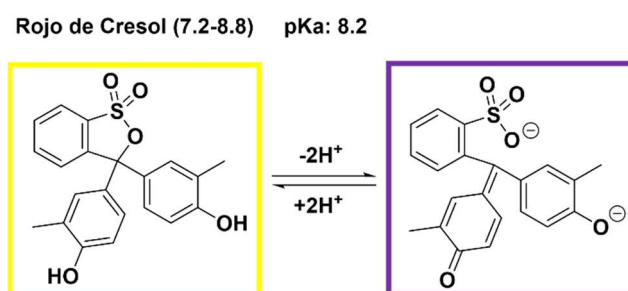


Figura 5.30. Estructuras y cambios de color del rojo de cresol a diferentes valores de pH.

A partir de estos resultados, se llevaron a cabo las pruebas de inmovilización del rojo de cresol para evaluar el cambio de respuesta colorimétrica en diferentes entornos de humedad relativa controlada. Como se ilustra en la Figura 5.31, el procedimiento de inmovilización consistió en la siguiente metodología:

- I. Disolver 2 mg de rojo de cresol en 10 mL de MeOH ($0.2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- II. Posteriormente, sumergir una membrana de la composición seleccionada de un tamaño de 1 cm x 1cm durante 5 minutos en la disolución de la sonda colorimétrica para producir la impregnación.
- III. Finalmente, extraer la membrana impregnada y secar durante 24 horas en una estufa a 50°C.

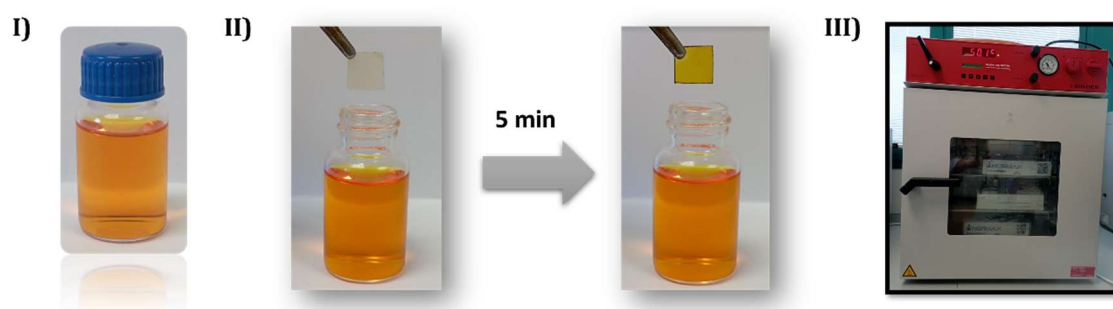


Figura 5.31. Metodología de inmovilización de sonda colorimétrica en la membrana polimérica.

En una primera aproximación, se evaluó el cambio de color de la membrana polimérica teñida de composición **M-5**. Para ello, se observó visualmente por comparación el resultado para la membrana completamente seca (0 % RH) y la membrana en condiciones de un alto grado de humedad relativa controlada (80 % RH). Como se observa en la Figura 5.32, después de 24 horas, se produce un cambio de color de amarillo a morado. A la vista de los resultados, se puede decir que el rojo de cresol podría ser una sonda potencial para profundizar en el estudio respecto de la respuesta colorimétrica, ya que se aprecia un efecto notable de la humedad en el cambio de color.

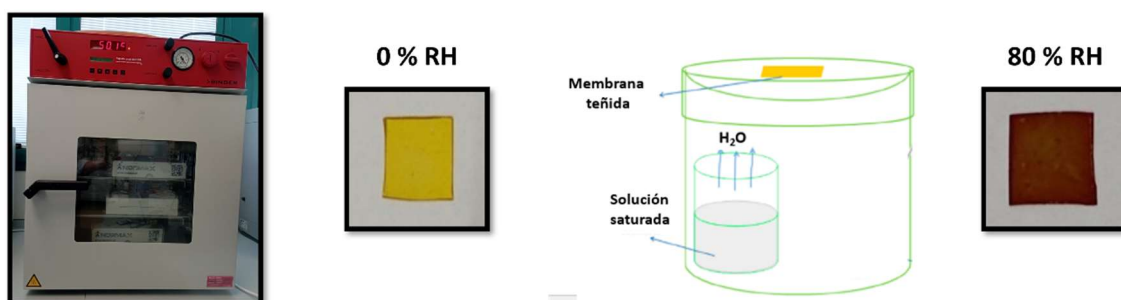


Figura 5.32. Respuesta colorimétrica de la membrana teñida en ausencia y alto grado de RH (%).

En este sistema, la capa de polímero hidrofílico se hincha en un ambiente de mayor humedad y se encoge en un ambiente de baja humedad. Como se muestra en la Figura 5.33, el mecanismo de detección de humedad se basa en el cambio inducido por el vapor de agua en la capa de polímero, lo que conduce al cambio de color correspondiente asociado a un cambio básico de pH en el propio material polimérico debido a la absorción de moléculas de agua.⁴⁴

⁴⁴ Banisadr, S.; Oyefusi, A.; Chen, J. A Versatile Strategy for Transparent Stimuli-Responsive Interference Coloration. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2019**, *11* (7), 7415-7422.

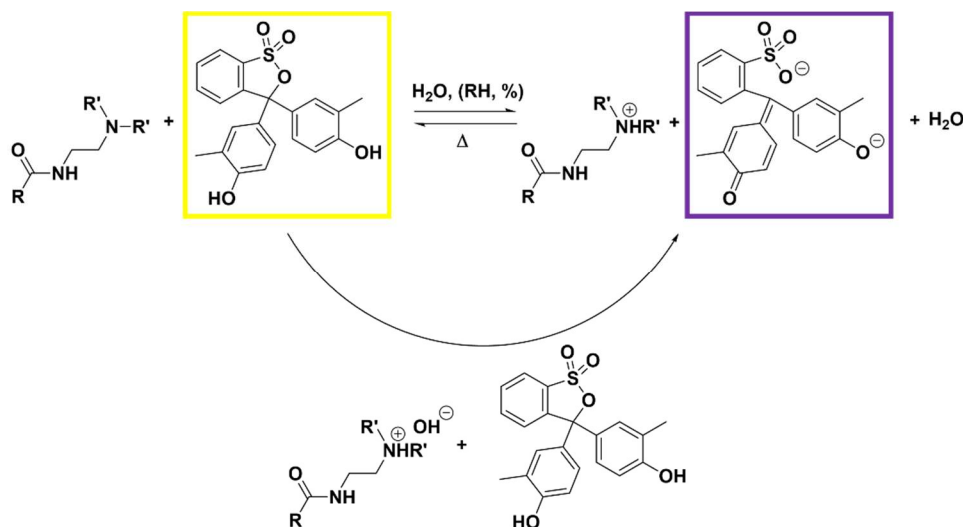


Figura 5.33. Mecanismo de interacción con agua y cambio colorimétrico del rojo de cresol.

5.7.2 Estudio de respuesta colorimétrica

El siguiente estudio se realizó para investigar la respuesta de estos sistemas bajo un ambiente de humedad controlada a diferentes valores constantes de humedad. En este contexto, se utilizaron soluciones saturadas de diferentes sales para generar un amplio rango de valores de humedad relativa entre 10 y 100 %. Las sales utilizadas y los valores de humedad estimados se han seleccionado según la bibliografía³¹ y se detallan en la Tabla 5.7.

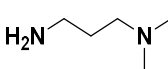
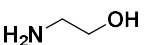
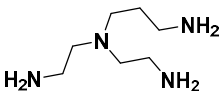
Tabla 5.7. Humedad relativa de soluciones saturadas de sales.

| Tipo de sal | RH (% , 25°C) |
|--------------------------------|---------------|
| LiCl | 11 |
| K ₂ CO ₃ | 43 |
| NaBr | 58 |
| NH ₄ Cl | 79 |
| K ₂ SO ₄ | 98 |

A partir de los resultados de las pruebas de solubilidad, se prepararon 4 tipos de membranas con 50% de grado de reticulación y la composición se varió en relación con la proporción de 3-dimetilaminopropilamina y etanolamina. El objetivo es estudiar el efecto del grupo terminal en la respuesta colorimétrica y en la cinética asociada al cambio de color, ya que se puede esperar una influencia en el pH en función de la composición de la

membrana polimérica. En la Tabla 5.8 se detalla la composición de las membranas preparadas para el estudio colorimétrico.

Tabla 5.8. Proporción de aminas en membranas poliméricas con 50% de entrecruzamiento.

| Referencia |  |  |  |
|------------|---|---|---|
| T-1 | 50 % | - | 50 % |
| T-2 | 37.5 % | 12.5 % | 50 % |
| T-3 | 25 % | 25 % | 50 % |
| T-4 | 12.5 % | 37.5 % | 50 % |

El cambio de color de las membranas teñidas en función del tiempo se siguió mediante imágenes fotográficas a diferentes tiempos establecidos y predeterminados previamente. En este estudio, se analizó desde un estado inicial (t_0) que representa la ausencia completa de humedad, hasta la evolución del sistema a 1h, 2h, 5h y 24 horas. En la Figura 5.34, se muestra la variación en la respuesta de la sonda colorimétrica en función del tiempo y de la humedad relativa controlada a la que se expuso la membrana de composición **T-2** (las figuras S.5.1, S.5.2 y S.5.3 del capítulo VII correspondiente a la parte experimental representan las imágenes fotográficas correspondientes a las membranas T-1, T-3 y T-4, respectivamente). Para la humedad relativa del 11 % no se aprecia cambio de color en el período estudiado hasta las 24 horas y se puede decir que a este bajo grado de humedad no se produce la transición colorimétrica. Por otro lado, la tendencia general muestra que el cambio de color es más rápido a mayor humedad relativa y que esta variación se produce en menor tiempo. Así, por ejemplo, estas diferencias en el comportamiento se pueden observar en la comparación de las membranas expuestas a 43 y 98 %, respectivamente. Del mismo modo, la evolución del color en los diferentes sistemas no alcanza su estado estacionario hasta las 24 horas, ya que se aprecian diferencias o cambios respecto de las imágenes correspondientes a 5 horas.

Composición T-2

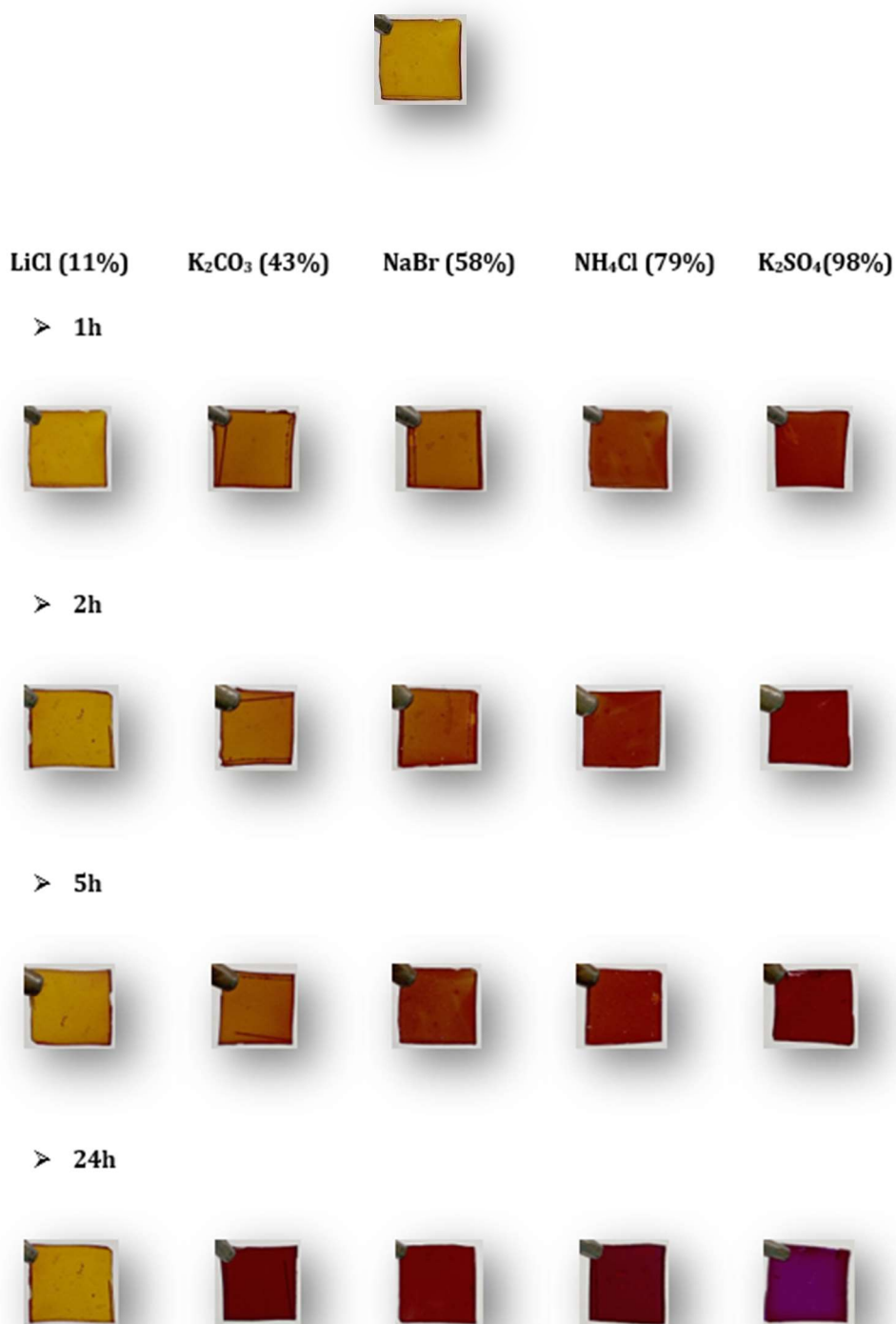


Figura 5.34. Respuesta colorimétrica de membrana de composición T-2 en diferentes RH (%).
 Por otro lado, la composición de la membrana diseñada o, lo que es lo mismo, el efecto del grupo funcional introducido en la aminólisis presenta una influencia en la respuesta colorimétrica y la cinética del sistema con el tiempo. Respecto a esto, la comparación de la

respuesta colorimétrica para las diferentes membranas se puede examinar y contrastar para el intervalo de 5 horas de exposición como se observa en la Figura 5.35.

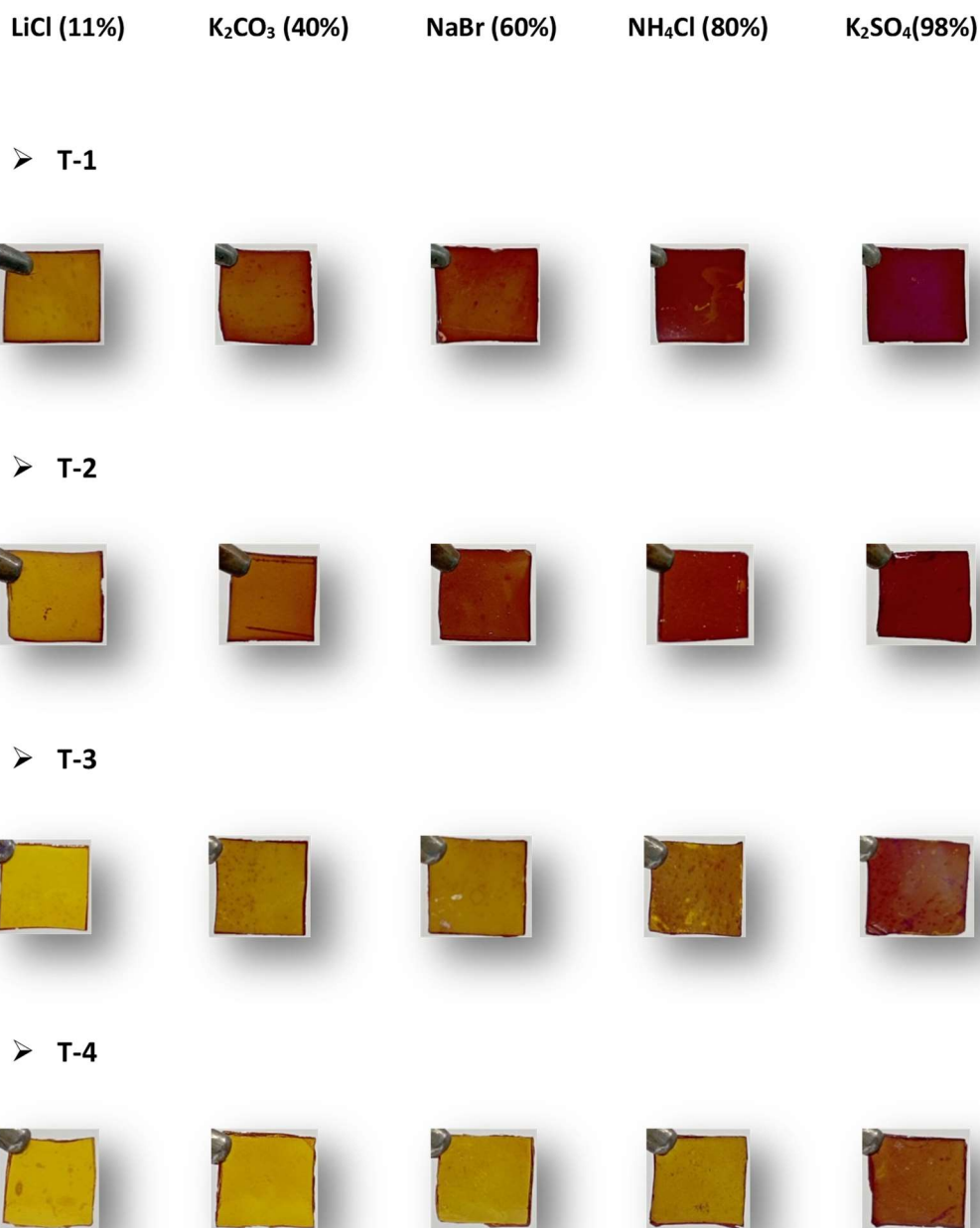


Figura 5.35. Comparación de la respuesta de las membranas teñidas a las 5 horas.

A partir de las imágenes fotográficas, se puede observar que existen diferencias notables en la respuesta colorimétrica para el intervalo de humedades entre el 43 % y el 79 % dependiendo de la composición de la membrana polimérica. En dicho intervalo, las membranas **T-1** y **T-2** muestran un cambio de color apreciable mediante detección visual con respecto a las condiciones iniciales, mientras que las membranas **T-3** y **T-4** no

presentan un cambio de color evidente indicando que la sonda se encuentra en su forma protonada. No obstante, para estas dos últimas composiciones sí se puede apreciar un cambio gradual de color para la humedad relativa de 98 %. En este sentido, el análisis de estos resultados es una evidencia de que el pH de la membrana polimérica influye en el cambio gradual del color con el tiempo según la humedad relativa considerada en el estudio. Este efecto puede explicarse en relación con el estudio del pH de la aminólisis detallado en la Tabla 5.6, ya que la 3-dimetilaminopropilamina presenta una naturaleza más básica que la etanolamina. En consecuencia, una mayor proporción en la composición de la 3-dimetilaminopropilamina comporta valores de pH más altos y, como resultado, una mayor proximidad a la zona de viraje de la sonda utilizada. Esta tendencia en el cambio del color según la composición y el grado de humedad relativa controlada se puede observar también al intervalo de 24 horas como se ilustra en la Figura 5.36.

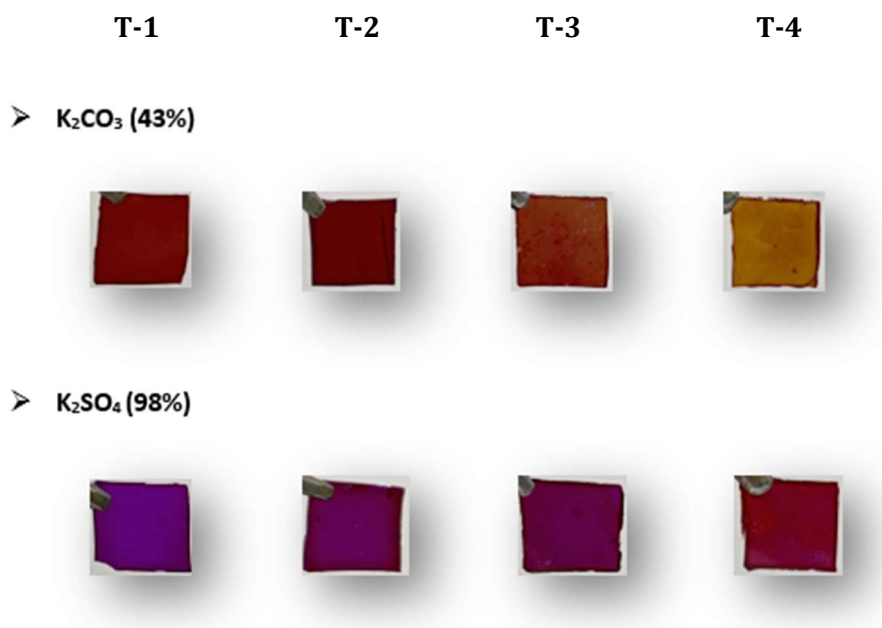


Figura 5.36. Comparación de la respuesta de las membranas teñidas a las 24 horas.

5.7.3 Análisis cromático por espectroscopia de UV-visible

La respuesta colorimétrica de las membranas se estudió mediante espectroscopia de absorción UV-visible. El estudio se realizó en las mismas condiciones de humedad relativa controlada y la monitorización se llevó a cabo en los mismos intervalos de tiempo. El rojo de cresol es un indicador orgánico para valoración ácido-base que vira de su forma ácida (amarilla, pH: 7.1) a su forma básica (púrpura, pH: 8.8). Como se ilustra en la Figura 5.37, la forma ácida presenta una banda de absorción con el máximo centrado a 433 nm y la forma básica se caracteriza por una banda de absorción con el máximo centrado a 573 nm.

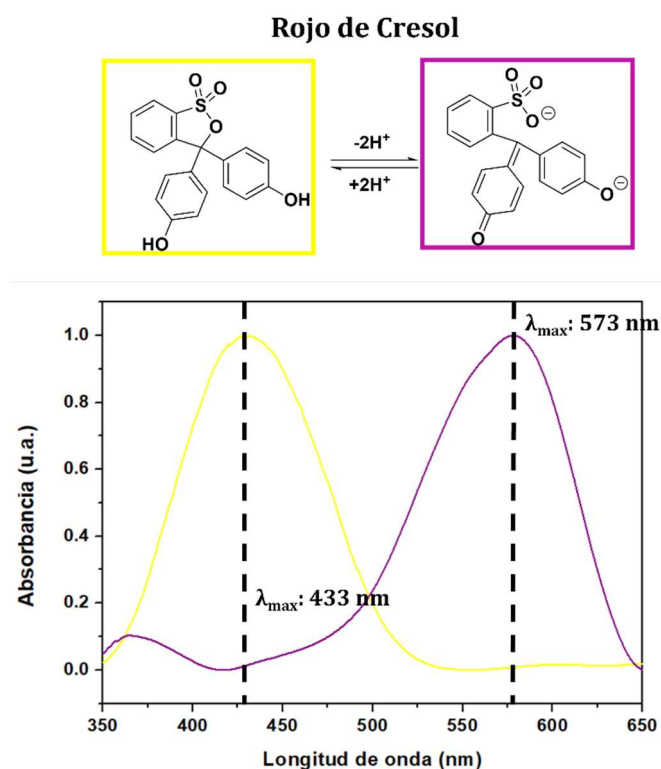


Figura 5.37. Espectros de absorción correspondientes al rojo de cresol: forma ácida (línea amarilla) y forma básica (línea púrpura).

En nuestro sistema, la intensidad de la señal centrada sobre 433 nm decrece gradualmente con el tiempo y se produce un desplazamiento de la banda hacia longitudes de onda mayores. Por otro lado, la intensidad de la banda de absorción centrada a 573 nm aumenta gradualmente a medida que se produce la absorción de humedad en la membrana. Este fenómeno viene determinado por el aumento de pH de la membrana polimérica y el cambio de color de la sonda colorimétrica que vira de su forma ácida a su forma básica. De este modo, los cambios espectrales de absorción se registraron para evaluar el tiempo de exposición, el efecto de cada humedad relativa controlada y el efecto de la composición de la membrana.

- *Tiempo de exposición*

La espectroscopia UV-visible es una alternativa para visualizar y comprobar la transición cromática en términos de absorción de la radiación. En condiciones iniciales, la membrana en ausencia de humedad presenta una única banda de absorción correspondiente a la forma protonada del indicador para las membranas estudiadas, tal y como se indica en la Figura 5.38.

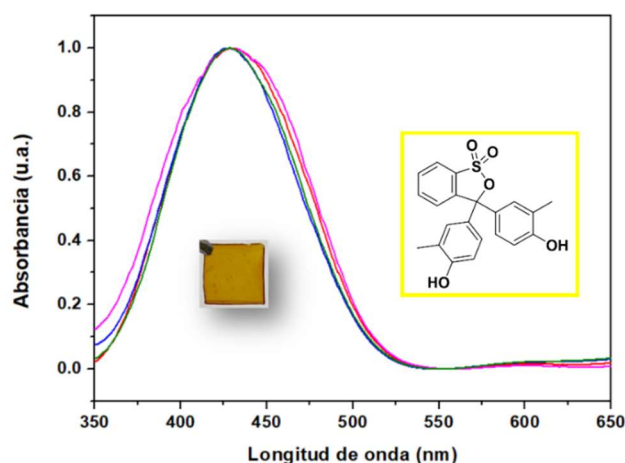


Figura 5.38. Espectro de absorción y color en condiciones iniciales de ausencia de humedad.

Por otro lado, la superposición de los espectros muestra los cambios en las bandas espectrales a medida que aumenta el tiempo de exposición a la humedad relativa de estudio como se observa en la Figura 5.39 para la composición **T-2**. (las Figuras S.5.4, S.5.5 y S.5.6 de la parte experimental del capítulo VII corresponden a las membranas T-1, T-3 y T-4, respectivamente).

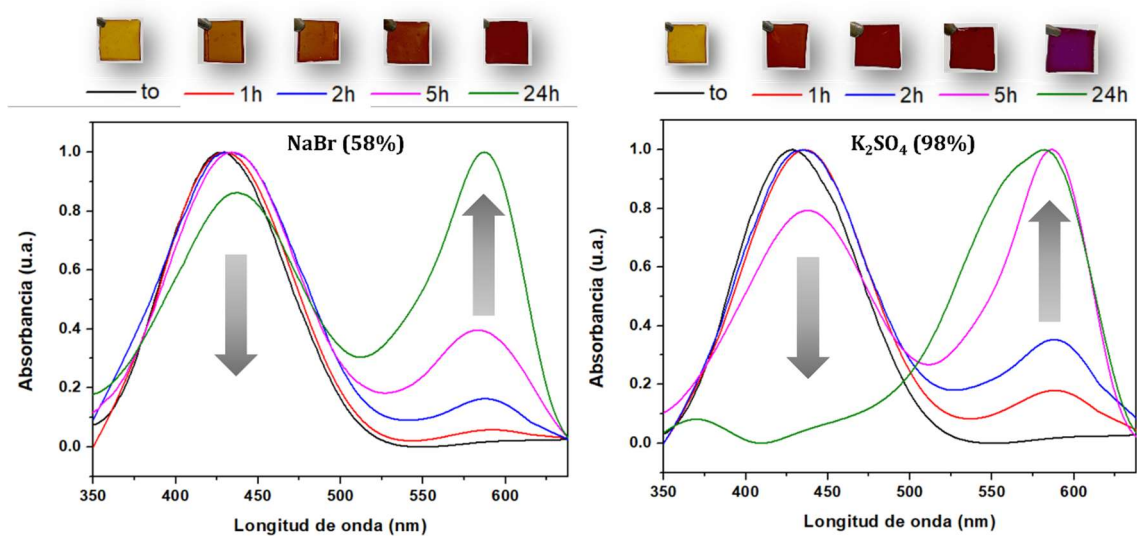


Figura 5.39. Cambios en las curvas espectrales asociados al efecto de la humedad para la membrana **T-2** en entorno de 58 % (izquierda) y 98 % (derecha).

De este modo, la aparición de una nueva banda de absorción correspondiente a la base conjugada viene acompañada de la disminución de la banda de menor longitud de onda. Como se ha detallado en el apartado anterior, esta ganancia higroscópica por efecto de la humedad se refleja con un cambio de color de amarillo a púrpura.

- *Efecto de humedad relativa controlada*

El grado de humedad relativa muestra diferencias en los espectros de absorción respecto de la cinética o velocidad del cambio de color y la respuesta de las membranas cuando se alcanza el equilibrio. Por lo que respecta a la cinética, la transición de color se produce más rápidamente cuando el grado de humedad relativa controlada es mayor como se ilustra en la Figura 5.40 para la composición **T-2**. (las Figuras S.5.7, S.5.8 y S.5.9 de la parte experimental del capítulo VII corresponden a las membranas **T-1**, **T-3** y **T-4**, respectivamente).

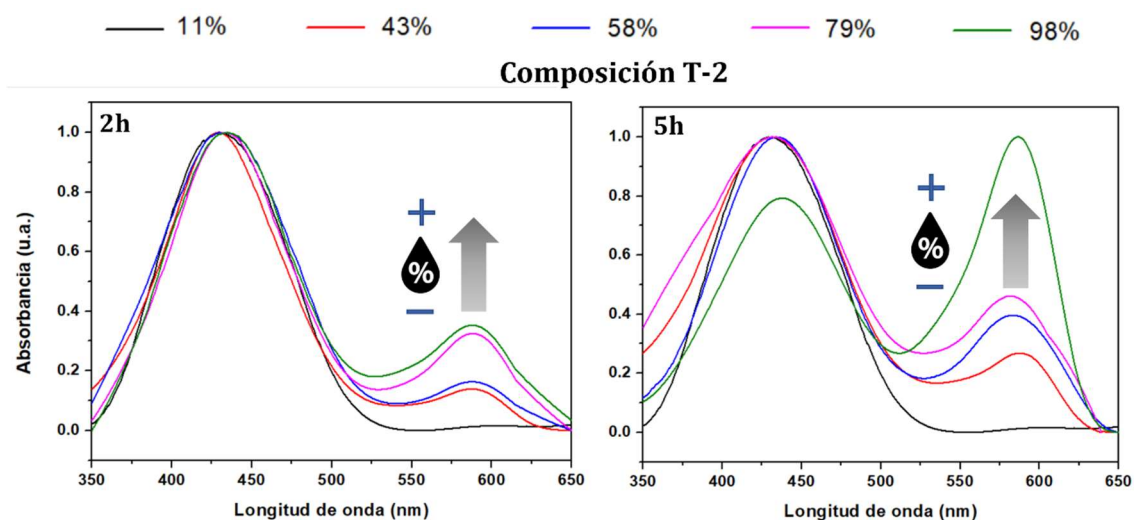


Figura 5.40. Efecto de la humedad relativa controlada en la cinética de cambio del espectro de absorción para la composición **T-2**.

En cuanto a la respuesta en el equilibrio, la Figura 5.41 del sistema a las 24 horas muestra que a altas humedades (> 79 %) la transición de bandas es completa y se produce la completa desaparición de la banda asociada a la forma protonada, mientras que en valores intermedios de humedad (40-60 %) el sistema muestra un espectro intermedio con coexistencia de las curvas espectrales correspondientes a ambas formas. Por el contrario, un entorno de baja humedad no comporta ninguna transición en el sistema. De este modo, se puede establecer un patrón espectral para determinar el grado de humedad relativa.

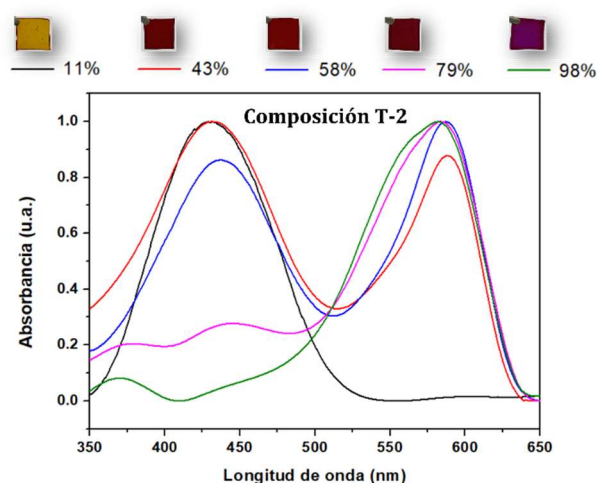


Figura 5.41. Efecto de la humedad relativa controlada en el espectro de absorción al estado en el equilibrio de la membrana de composición **T-2**.

- *Efecto de composición*

La composición de la membrana polimérica es otro factor que influye en la cinética del cambio de color. La menor o mayor basicidad de la membrana polimérica condiciona la transición, ya que la proximidad respecto del viraje de la sonda colorimétrica es dependiente del valor de pH. De este modo, la mayor basicidad de la membrana requiere un menor porcentaje de humedad controlada y la transición de la forma ácida a la forma básica presenta una cinética más rápida en el tiempo, tal y como se observa en la Figura 5.42.

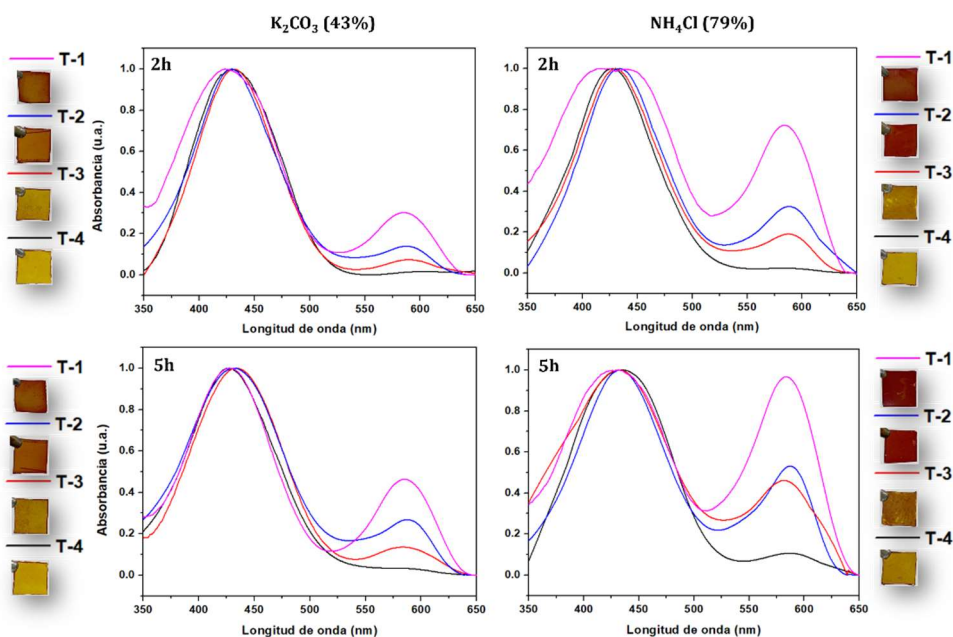


Figura 5.42. Efecto de la composición de la membrana en la cinética de los cambios de las curvas de absorción. Ejemplos en 43 % (izquierda) y 79 % (derecha).

Por otro lado, la respuesta en el equilibrio a las 24 horas también depende de la composición de la membrana polimérica, ya que se observa la misma tendencia que se ha comentado previamente. De este modo, la forma final de la curva de absorción depende de la composición si se considera una humedad relativa controlada de forma independiente. Por ejemplo, la composición **T-1** (más básica) muestra un viraje superior en una atmósfera de menor humedad (43 %, línea rosa) respecto de la composición **T-4** (menos básica) en una atmósfera de mayor humedad (79%, línea negra) si se observan a simple vista los espectros de absorción de la Figura 5.43.

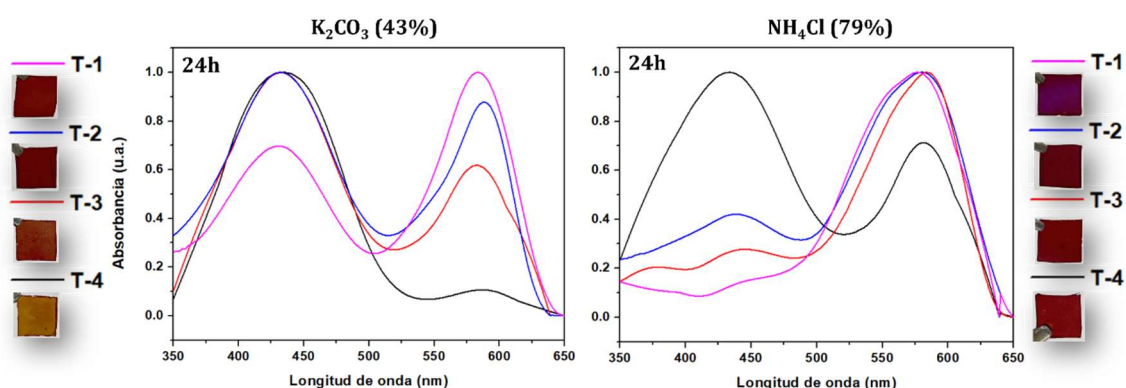


Figura 5.43. Efecto de la composición de la membrana en los cambios de las curvas de absorción dependientes de la humedad relativa controlada. Ejemplos en 43 % (izquierda) y 79 % (derecha).

5.7.4 Distancia Euclidiana. Análisis del color por RGB

Para cuantificar y visualizar la respuesta colorimétrica de las membranas, la intensidad de las componentes del color RGB proporciona una medida del cambio cromático en función de los niveles de humedad relativa controlada. En este contexto, las imágenes fotográficas, en las mismas humedades relativas controladas y en los mismos intervalos de tiempo, se analizaron mediante la aplicación JavaScript y el análisis para seguir la evolución del cambio de color se calculó mediante la distancia euclidiana (ΔRGB) a partir de la Ecuación 5.10:

$$\Delta RGB = \sqrt{(R_t - R_{t_0})^2 + (G_t - G_{t_0})^2 + (B_t - B_{t_0})^2}$$

Ecuación 5.10. Cálculo de la distancia euclidiana a partir de las componentes RGB.

En la Ecuación 5.10, R, G y B representan las intensidades de color promedio del rojo, verde y azul, respectivamente. Por otro lado, los subíndices “ t_0 ” y “ t ” indican las condiciones iniciales y a diferentes tiempos, respectivamente. La Figura 5.44 representa la distancia euclidiana calculada para diferentes humedades relativas controladas y la evolución en los intervalos de tiempo estudiados para las composiciones **T-1** y **T-4** (las Figuras S.5.10 y

S.5.11 del capítulo VII de la parte experimental corresponden a las membranas T-2 y T-3, respectivamente).

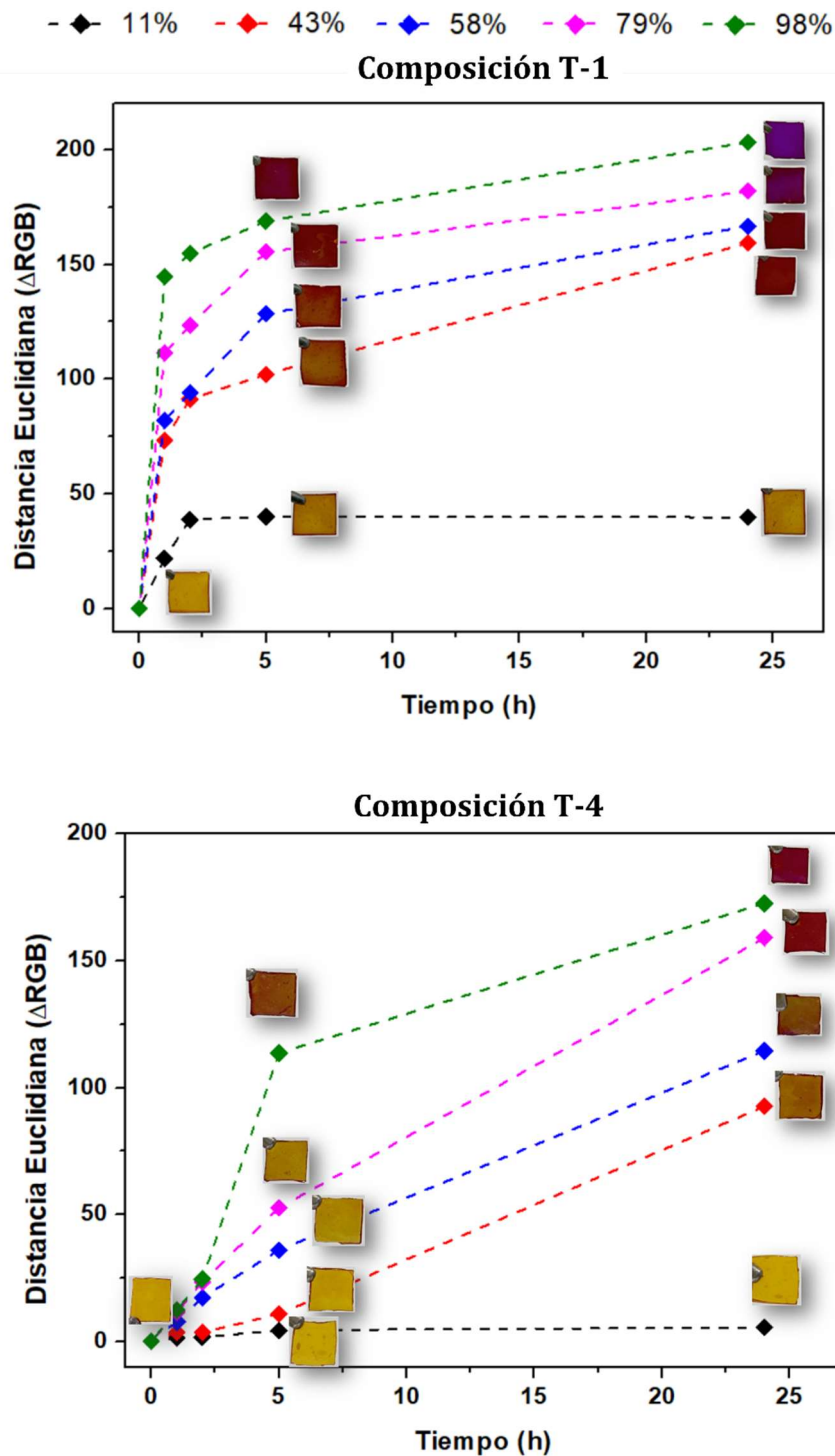


Figura 5.44. Análisis de las componentes del color RGB en diferentes RH (%) para membranas de composición T-1 y T-4.

La representación gráfica muestra que a medida que la humedad relativa es mayor, el valor de la distancia euclidiana aumenta más rápidamente o, lo que es lo mismo, en menor tiempo.

Esta tendencia observada se expresa como un cambio de color más rápido como se ha reportado en el apartado anterior. Por otro lado, la correlación de las imágenes fotográficas y los valores de ΔRGB muestra que el cambio de color es visible al ojo humano cuando la distancia euclidiana presenta valores iguales o superiores a 100. Por otro lado, se puede observar que la composición de la membrana tiene un efecto relevante tanto en la cinética cromática asociada a la absorción de humedad como en el color final obtenido dependiendo de la humedad controlada estudiada, ya que los valores de ΔRGB muestran diferencias cuando el sistema alcanza el equilibrio. Este efecto se ilustra en la Figura 5.45 con mayor claridad si la comparación de las membranas se hace independientemente para cada humedad relativa controlada. En la Figura 5.45, se muestran los resultados de las membranas estudiadas al 11 %, 58 % y 98 % de humedad relativa controlada (la Figura S.5.12 de la parte experimental del capítulo VII corresponde a humedades controladas de 43 % y 79%). La tendencia del sistema muestra que la membrana más básica o con mayor proporción de 3-dimetilaminopropilamina presenta una cinética de cambio de color más rápida o valores más grandes de distancia euclidiana. Por el contrario, el aumento de la proporción de etanolamina conlleva un comportamiento cinético más lento. Por otro lado, las diferentes membranas no muestran cambio de color en un entorno de baja humedad (11 %), ya que los valores de ΔRGB no son superiores a 50 y el cambio se observa a partir de valores superiores a 100.

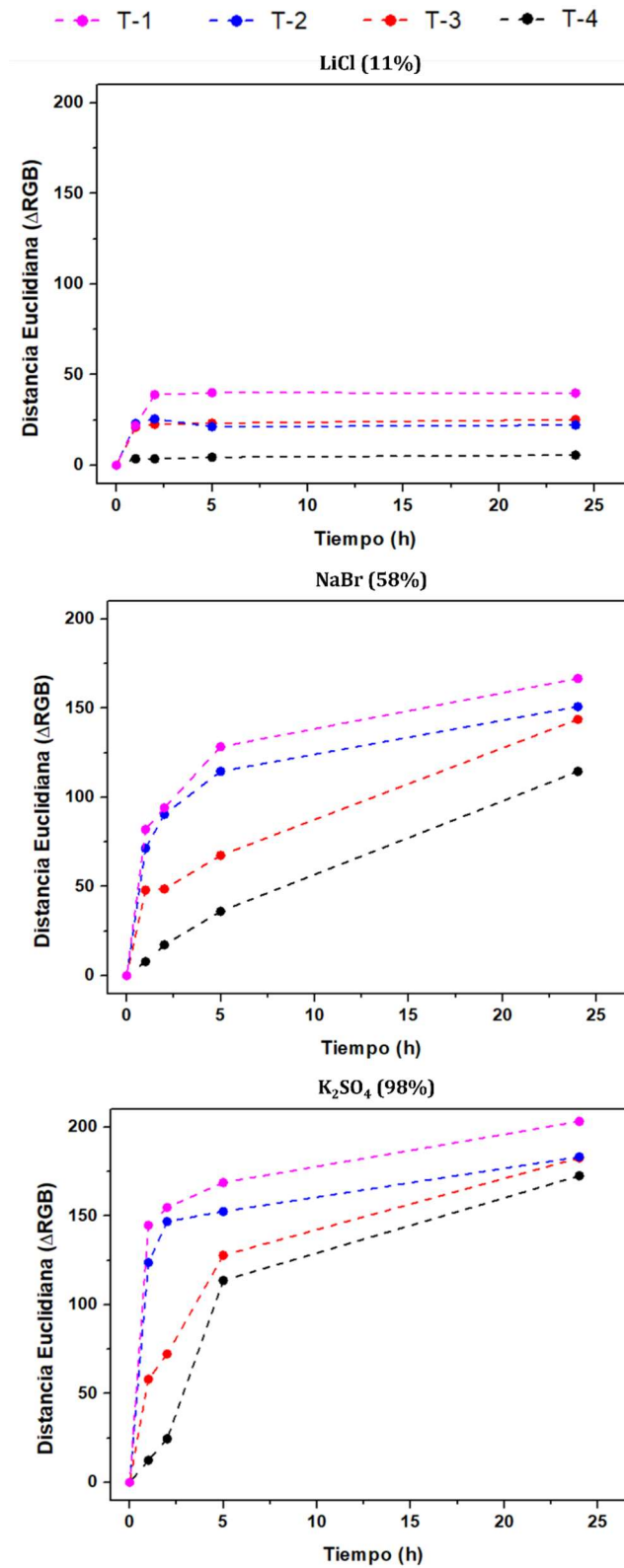


Figura 5.45. Análisis RGB en diferentes RH (%) para membranas de composición variada.

5.7.5 Inmovilización de otras sondas colorimétricas

A partir de los resultados obtenidos para el rojo de cresol, se observó que mediante la modificación de la composición se puede modular el pH de la membrana polimérica. En este sentido, la composición de la membrana se optimizó con el fin de poder inmovilizar otras sondas colorimétricas. Respecto al estudio de pH y bajo la evaluación de algunas sondas con un viraje colorimétrica en el rango de pH de trabajo, se inmovilizó el azul de bromotimol como se ilustra en la Figura 5.46.

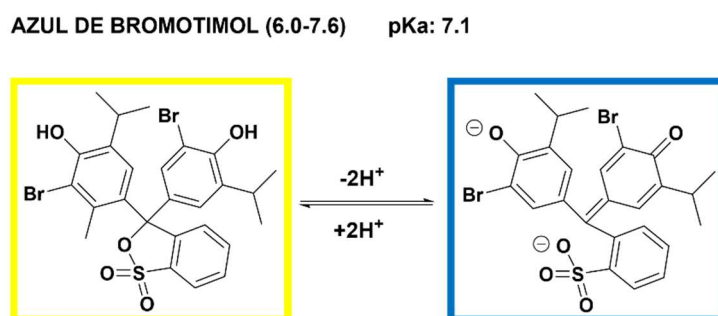


Figura 5.46. Formas químicas del azul de bromotimol. Forma ácida (amarilla) y forma básica (azul).

La composición de la membrana polimérica se optimizó mediante cambios en las proporciones de las tres aminas primarias (Tabla 5.9), ya que el viraje de la nueva sonda colorimétrica se encuentra en un rango de pH inferior en comparación con el rojo de cresol y se requiere un pH menos básico para inmovilizar la sonda de interés en su forma ácida. Este cambio se debe a una reducción del grado de reticulación desde 50 % a 35 % y una mayor proporción de la etanolamina, la cual es la amina menos básica.

Tabla 5.9. Composición de la membrana polimérica optimizada.

| Referencia | <chem>CNCCCN</chem> | <chem>NCCO</chem> | <chem>NCCNCCN</chem> |
|------------|---------------------|-------------------|----------------------|
| T-5 | 10% | 55% | 35% |

Para la inmovilización de la sonda colorimétrica se siguió la metodología descrita en el apartado 5.7.1. El estudio de respuesta a la humedad se realizó en las mismas humedades relativas controladas indicadas en el apartado 5.7.2 para evaluar el rango entre 10 % y 100 %. La cinética del cambio de color de las membranas teñidas se siguió mediante imágenes fotográficas a 1h, 2h, 5h y 24 horas. Como se ilustra en la Figura 5.47, se muestra el resultado

del cambio de color con el tiempo en función de la humedad relativa controlada para la membrana de composición **T-5**.

Composición T-5

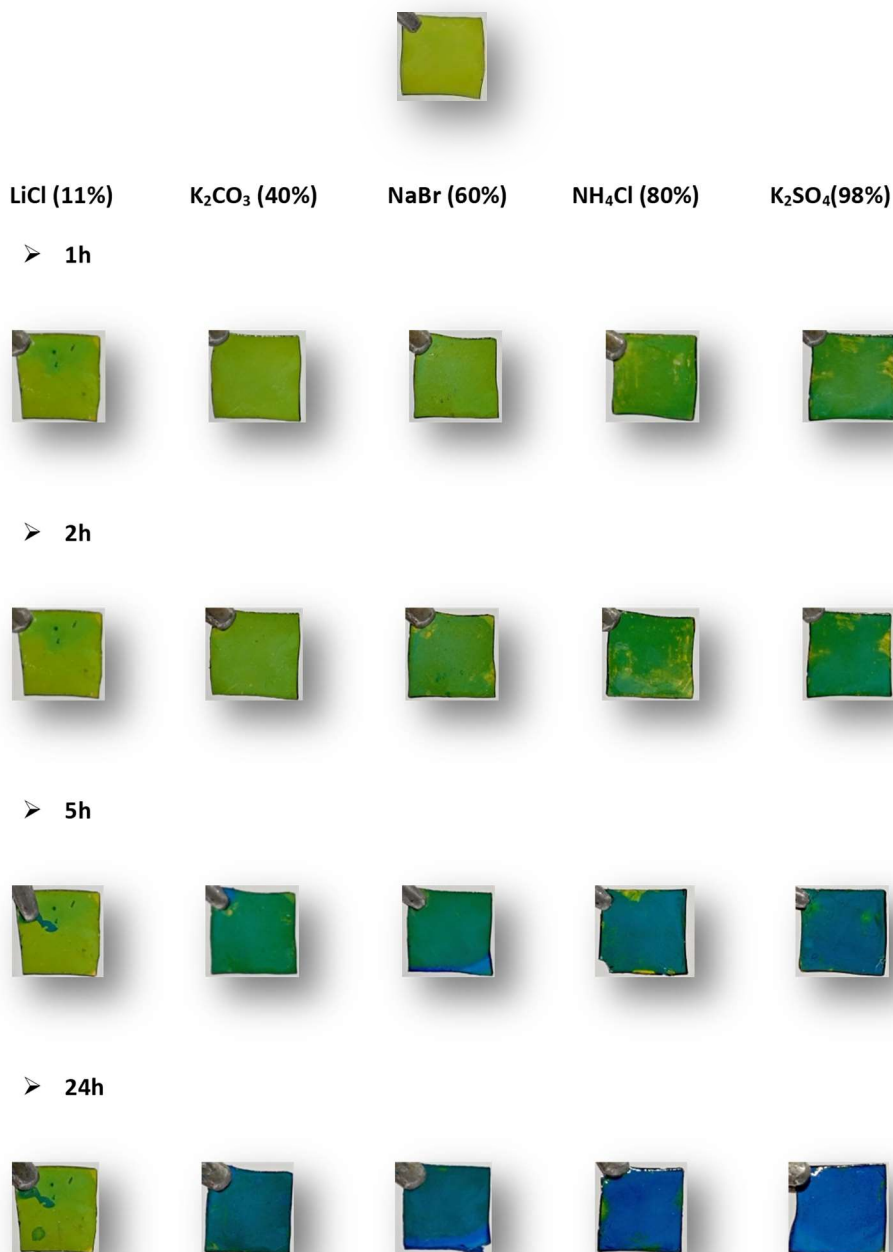


Figura 5.47. Respuesta colorimétrica de membrana de composición **T-5** en diferentes RH (%).

Como se observó en el estudio con la sonda de rojo de cresol, la tendencia general muestra que el cambio de color es más rápido a mayor humedad relativa controlada y se produce en menor tiempo. Las diferencias en el comportamiento se pueden observar desde baja

humedad (11 %) donde no hay cambio, a transiciones colorimétricas de mayor contraste a medida que aumenta la humedad. Del mismo modo, la evolución del color en los diferentes sistemas no alcanza su estado estacionario hasta las 24 horas, ya que se aprecian diferencias o cambios respecto de las imágenes correspondientes a 5 horas.

5.7.6 Análisis de transición cromática por RGB y UV-Visible

La respuesta colorimétrica de las membranas se puede analizar a partir de la intensidad de las componentes del color RGB y los cambios en las curvas de absorción mediante espectroscopia de absorción UV-visible como en las membranas con rojo de cresol como sonda colorimétrica.

El estudio de UV-visible se realizó para evaluar la aparición y desaparición de las bandas características de la sonda colorimétrica. El azul de bromotimol es otro indicador orgánico para valoración ácido-base que vira de su forma ácida (amarilla, pH:6.0) a su forma básica (azul, pH:7.6). Como se ilustra en la Figura 5.48, la membrana en condiciones iniciales (ausencia de humedad) presenta principalmente la forma ácida con una banda de absorción con el máximo centrado a 426 nm. Sin embargo, la composición de la membrana presenta un pH que conlleva la presencia de parte de la forma básica, ya que se aprecia una pequeña banda característica con un pico de absorción con el máximo centrado a 627 nm. De este modo, el análisis por espectroscopia nos proporciona más información que la propia observación visual del color de la membrana.

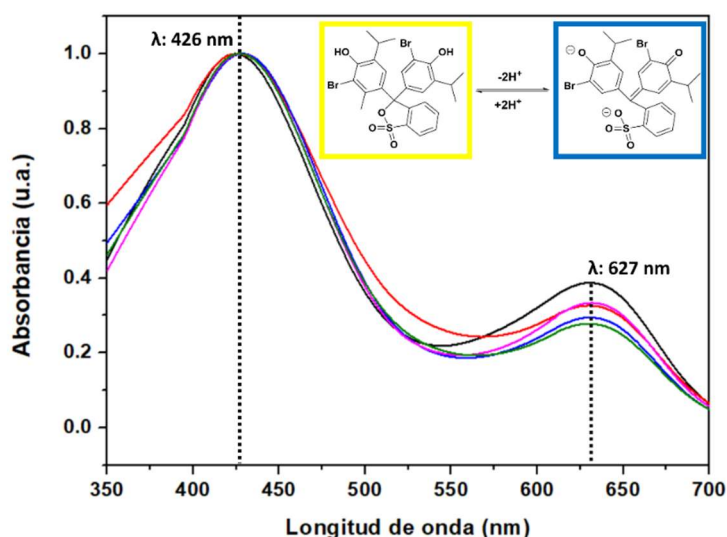


Figura 5.48. Espectro de absorción y color en condiciones iniciales de ausencia de humedad.

Los cambios en el espectro de absorción se producen más rápidamente cuando el grado de humedad relativa controlada es mayor. En la Figura 5.49 se observa la desaparición de la primera banda y la aparición de la banda correspondiente a la forma básica de color azul. (la Figura S.5.13 de la parte experimental del capítulo VII corresponde a humedades controladas de 11 %, 58 % y 98 %).

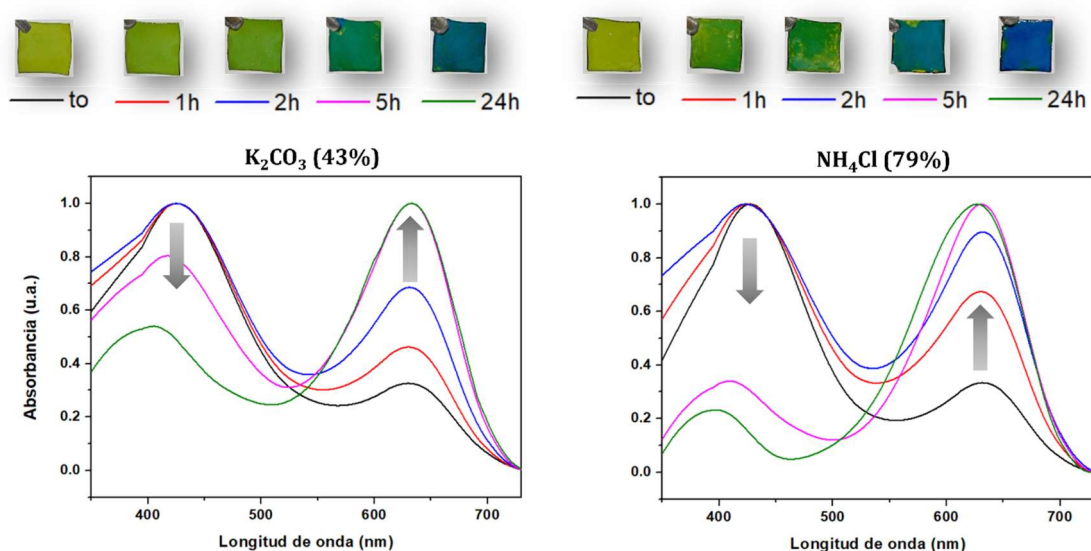


Figura 5.49. Efecto de la humedad relativa controlada en la cinética de cambio del espectro de absorción para la composición **T-5**.

Por otro lado, el análisis de la distancia euclidiana se muestra en la Figura 5.50. Los valores correspondientes a dicho parámetro aumentan con el tiempo a medida que el sistema es expuesto a un entorno con un mínimo grado de humedad relativa (> 43%). Estos cambios están relacionados con el cambio de color asociado a la ganancia de agua y los valores de ΔRGB muestra que el contraste de color es completamente apreciable y detectable visualmente cuando la distancia euclidiana presenta valores iguales o superiores a 100.

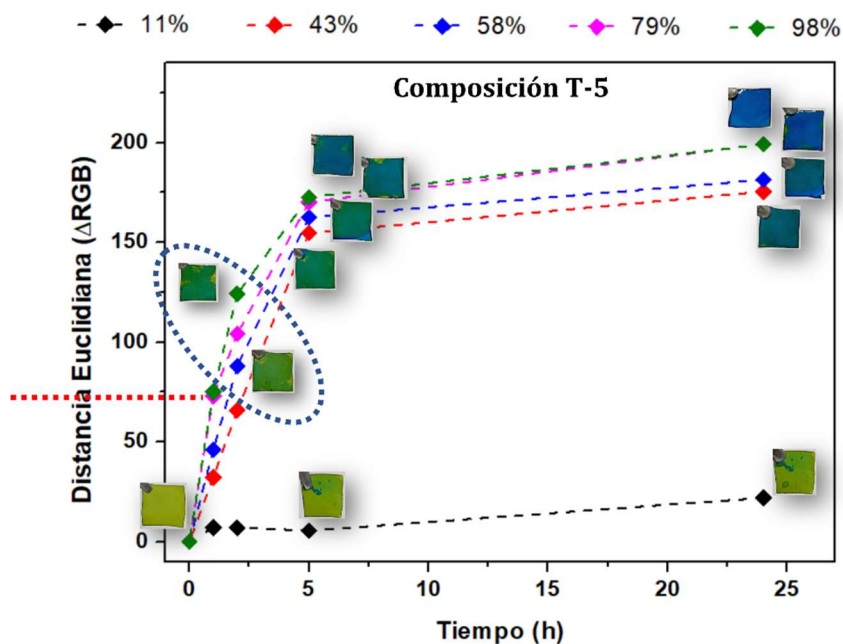


Figura 5.50. Análisis de las componentes del color RGB en diferentes RH (%) para composición **T-5**. Los resultados experimentales demuestran el desarrollo de sistemas colorimétricos sensibles a la humedad. Además, la modulación de parámetros como la composición o la selección de la sonda colorimétrica permite crear códigos colorimétricos asociados a diferentes niveles de humedad con el objetivo de tener una respuesta visual, la cual podría permitir detectar el tiempo de exposición a una humedad relativa controlada mediante el seguimiento de la evolución del cambio de color. Así, por ejemplo, si se toman la composición **T-1** y **T-4** con el rojo de cresol, y la composición **T-5** con el azul de bromotimol, se podría diseñar un código mediante la combinación de tres sistemas colorimétricos como se ilustra en la Figura 5.51 para humedades controladas del 43 % y 79%. Así, para 24 horas de exposición a una humedad de 43% tendríamos un código rojo, naranja, turquesa y para 79% de humedad violeta, rojo y azul. Este código de colores se podría ajustar en función de las sondas y la composición de las membranas.

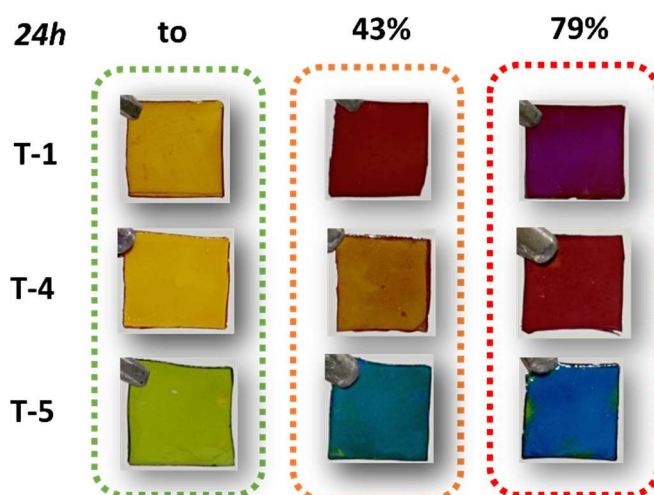


Figura 5.51. Evolución de un código colorimétrico con el tiempo a dos humedades controladas. Ejemplos en condiciones iniciales (izquierda), 43 % (medio) y 79 % (derecha).

5.7.7 Conclusiones

Por último, se recogen y presentan las principales conclusiones extraídas del presente capítulo.

- Se ha llevado a cabo la preparación de un monómero de naturaleza iónica de tipo AB' con doble grado de funcionalización, definido por un anillo de tiolactona (A) y un grupo vinilo (B'), para su posterior utilización en procesos de polimerización tiol-eno.
- Se ha seguido y estudiado la apertura del anillo de tiolactona mediante aminólisis mediante diferentes técnicas espectroscópicas tanto cuantitativamente (RMN) como cualitativamente (FT-IR-ATR y Raman).
- Se ha monitoreado y estudiado cualitativamente la eficiencia de la fotopolimerización tipo tiol-eno del monómero mediante diferentes técnicas espectroscópicas como RMN, FT-IR-ATR y Raman.
- Se ha estudiado y evaluado cinéticamente la naturaleza higroscópica o capacidad de absorción de agua de las membranas poliméricas mediante espectroscopia FT-IR-ATR, además de la evolución de las señales características asignables al polímero y al agua absorbida.

- Se ha demostrado y estudiado la naturaleza higroscópica y la influencia de la composición de las membranas poliméricas en el grado de absorción mediante un análisis de absorción de humedad en peso.
- Se ha abordado la optimización de la metodología en una reacción “one-pot” para el diseño y síntesis de líquidos iónicos poliméricos con diferente composición, funcionalidad y grado de reticulación.
- Se ha determinado la influencia del grado de absorción de agua en el comportamiento mecánico de las membranas poliméricas debido a su naturaleza higroscópica.
- Se ha desarrollado un material inteligente de respuesta colorimétrica sensible a la humedad, el cual está basado en la inmovilización por interacción iónica de dos tipos de sondas colorimétricas sensible al pH.
- Se demuestra que la cinética de la respuesta colorimétrica del material inteligente depende tanto de la composición de la membrana polimérica como del grado de humedad relativa del entorno.
- Se ha empleado un modelo matemático basado en las componentes RGB del color y la espectroscopia UV-visible para evaluar la respuesta colorimétrica del sistema inteligente sensible a la humedad.
- Se ha demostrado el desarrollo de un sistema inteligente colorimétrico de preparación sencilla que podría tener potencial aplicación para la monitorización *in situ* y control de la humedad en tiempo real.

CAPÍTULO VI

Sistemas colorimétricos basados en ILs soportados sobre materiales avanzados

6 **Capítulo VI. Sistemas colorimétricos basados en ILS soportados sobre materiales avanzados**

Este capítulo describe el desarrollo de materiales avanzados obtenidos mediante impresión 3D, los cuales se modificaron para modular su comportamiento como líquidos iónicos soportados (SILs). El diseño exitoso de materiales avanzados basados en compuestos moleculares es muy complejo, ya que requiere la creación y adaptación de geometrías macroscópicas complejas. Sin embargo, esto último se facilita con el uso de la impresión 3D.

En este contexto, se prepararon polímeros mediante la optimización de la formulación de monómeros para poder diseñar geometrías definidas mediante la impresión 3D. Posteriormente, se estudió la post-modificación de dichos materiales poliméricos con unidades de líquido iónico. Finalmente, se investigó el potencial de estos materiales avanzados modificados para la inmovilización de sondas sensibles al cambio de pH y se evaluó su respuesta colorimétrica frente a aminos biogénicas generadas en los procesos de descomposición de alimentos.

6.1 **Futuro de la impresión 3D en la seguridad alimentaria**

El control de la calidad de los alimentos es de suma importancia para la seguridad y la salud humana. En este contexto, el objetivo actual de la industria alimentaria está orientado al desarrollo de envasado inteligente que sea capaz de monitorizar todos los factores que afectan la calidad de los alimentos. Los consumidores expresan el deseo de poder ver el historial y estado de los alimentos y, generalmente, prefieren un indicador visual basado en cambios colorimétricos.¹ La función principal del envasado inteligente es la comunicación, ya que facilita el flujo de información e informa al consumidor sobre el estado de un producto de una manera sencilla. Sin embargo, el envasado inteligente es actualmente inasequible para la industria alimentaria debido al elevado coste de los métodos convencionales de fabricación y la disponibilidad limitada de materiales inocuos para producir los componentes inteligentes.²

Por otro lado, las técnicas convencionales de análisis de alimentos resultan incompatibles con la monitorización *in situ*, ya que requieren preparación compleja de muestra,

¹ Aday, M.; Yener, U. Assessing consumers' adoption of active and intelligent packaging. *British Food Journal* **2015**, *117*, 157-177.

² Tracey, C. T.; Predeina, A. L.; Krivoshapkina, E. F.; Kumacheva, E. A 3D printing approach to intelligent food packaging. *Trends in Food Science & Technology* **2022**, *127*, 87-98.

instrumentación específica y personal especializado. Desde este punto de vista, ha crecido la importancia de desarrollar métodos de análisis sencillos, rápidos, sensibles, económicos y que sean portátiles para monitorizar en tiempo real.³

Recientemente, la fabricación aditiva (AM, por sus siglas en inglés), más comúnmente conocida como la impresión tridimensional (3D), se ha convertido en una solución prometedora y versátil para la fabricación de sistemas inteligentes a partir de materiales considerados seguros y aptos para alimentos por parte de agencias reguladoras reconocidas internacionalmente.² La introducción de sensores, indicadores y etiquetas impresos en 3D resultará útil para minimizar el desperdicio de alimentos mediante la monitorización de los siguientes parámetros:

- Crecimiento de patógenos
- Cambios en la atmósfera interna modificada
- Cambios de temperatura

De este modo, los métodos de impresión 3D surgen como una tecnología alternativa, viable y emergente para la fabricación y diseño de componentes avanzados que se pueden integrar en el envasado inteligente. A modo de ejemplo y como se ilustra en la Figura 6.1, las características ventajosas de las técnicas de impresión 3D tales como la versatilidad, la simplicidad, la reproducibilidad y el costo relativamente bajo han permitido su aplicación en el diseño de indicadores o sensores portátiles para la detección de diversos contaminantes alimentarios inducidos por su deterioro,^{4,5} por la presencia de alérgenos⁶ o por adulteraciones.⁷

³ dos Santos, D. M.; Cardoso, R. M.; Migliorini, F. L.; Facure, M. H. M.; Mercante, L. A.; Mattoso, L. H. C.; Correa, D. S. Advances in 3D printed sensors for food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2022**, *154*, 116672.

⁴ Yang, X.; Sun, J.; Cui, F.; Ji, J.; Wang, L.; Zhang, Y.; Sun, X. An eco-friendly sensor based on CQD@MIPs for detection of N-acylated homoserine lactones and its 3D printing applications. *Talanta* **2020**, *219*, 121343.

⁵ Li, S.; Jiang, Y.; Zhou, Y.; Li, R.; Jiang, Y.; Alomgir Hossen, M.; Dai, J.; Qin, W.; Liu, Y. Facile fabrication of sandwich-like anthocyanin/chitosan/lemongrass essential oil films via 3D printing for intelligent evaluation of pork freshness. *Food Chemistry* **2022**, *370*, 131082.

⁶ Jiang, D.; Sheng, K.; Jiang, H.; Wang, L. A biomimetic “intestinal microvillus” cell sensor based on 3D bioprinting for the detection of wheat allergen gliadin. *Bioelectrochemistry* **2021**, *142*, 107919.

⁷ Rocha, R. G.; Stefano, J. S.; Cardoso, R. M.; Zambiasi, P. J.; Bonacin, J. A.; Richter, E. M.; Munoz, R. A. A. Electrochemical synthesis of Prussian blue from iron impurities in 3D-printed graphene electrodes: Amperometric sensing platform for hydrogen peroxide. *Talanta* **2020**, *219*, 121289.

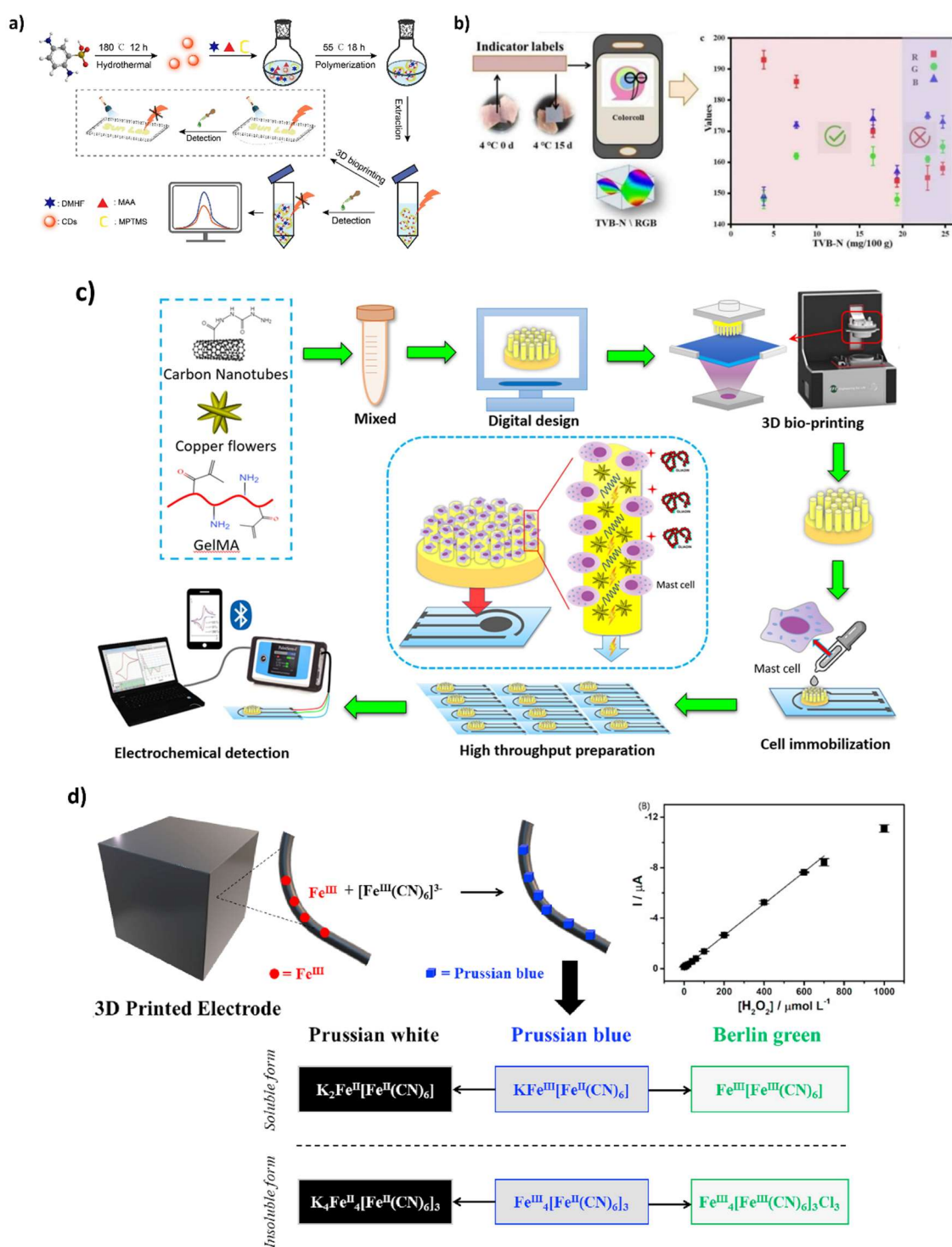


Figura 6.1. (a) Representación esquemática del sensor para detección de acil-homoserina lactonas, (b) representación esquemática del enfoque para la evaluación de la calidad de la carne de cerdo utilizando una cámara de teléfono inteligente y los correspondientes resultados de TVBN y RGB, (c) Diagrama de la preparación y detección electroquímica de gliadina y (d) Impresión 3D basada en la reacción del Azul de Prusia con H₂O₂ (tomados de ref. 4, 5, 6 y 7, respectivamente).

6.2 Impresión 3D: Definición y conceptos

El diseño exitoso de materiales avanzados y dispositivos funcionales basados en compuestos moleculares es altamente complejo, ya que a menudo requiere integración a través de diferentes escalas que van desde la escala molecular (funciones activas) hasta la escala macroscópica, que incluye los materiales de soporte y geometrías macroscópicas complejas necesarias para una aplicación dada.⁸ La impresión 3D, propuesta por Hideo Kodama en 1981,⁹ es un proceso utilizado para fabricar estructuras funcionales personalizadas con geometría y diseño controlables a partir de modelos digitales.¹⁰ Esta tecnología surge como un proceso de fabricación revolucionario al permitir la integración de funcionalidad/diseño de manera sencilla y a medida, la cual puede resultar inviable mediante técnicas tradicionales.

Los procesos de impresión 3D se pueden clasificar en siete categorías según la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM):^{11,12} inyección de aglutinante (BJ), deposición directa de energía (DED), extrusión del material (ME), inyección del material (MJ), fusión de lecho de polvo (PBF), laminación en hojas (SL) y fotopolimerización (VP). Todas las siglas hacen referencia a la terminología en inglés. Por otro lado, compuestos de diferente naturaleza química tales como polímeros, metales, biomateriales o materiales cerámicos pueden ser utilizados entre otros.^{13,14}

En este trabajo, se presenta el desarrollo de materiales avanzados obtenidos mediante fotopolimerización (ver Figura 6.2) con el uso de tintas de impresión que reaccionan mediante el empleo de luz ultravioleta (UV). En la fotopolimerización, para la preparación de tintas se emplean tanto monómeros como agentes entrecruzantes, los cuales se polimerizan en presencia de fotoiniciadores y aditivos como estabilizantes o disolventes. En esta técnica, la plataforma, donde se va a generar la estructura 3D, está en contacto con el

⁸ Wales, D. J.; Cao, Q.; Kastner, K.; Karjalainen, E.; Newton, G. N.; Sans, V. 3D-Printable Photochromic Molecular Materials for Reversible Information Storage. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (26), 1800159.

⁹ Kodama, H. Automatic method for fabricating a three-dimensional plastic model with photohardening polymer. *Rev. Sci. Instrum.*, **1981**, *52* (11), 1770-1773.

¹⁰ Ambrosi, A.; Pumera, M. 3D-Printing Technologies for Electrochemical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (10), 2740-2755.

¹¹ Saleh Alghamdi, S.; John, S.; Roy Choudhury, N.; Dutta, N. K. Additive Manufacturing of Polymer Materials: Progress, Promise and Challenges. *Polymers* **2021**, *13* (5), 753.

¹² ISO/ASTM52900-15, Standard Terminology for Additive Manufacturing – General Principles – Terminology, West Conshohocken, PA, 2015.

¹³ Lee, J.-Y.; An, J.; Chua, C. K. Fundamentals and Applications of 3D Printing for Novel Materials. *Appl. Mater. Today*. **2017**, *7*, 120-133.

¹⁴ Williams, C. B.; Mistree, F.; Rosen, D. W. A Functional Classification Framework for the Conceptual Design of Additive Manufacturing Technologies. *J. Mech. Des* **2011**, *133* (12), 1-11.

baño donde se encuentran los componentes en fase líquida. La reacción de polimerización es inducida fotoquímicamente por la irradiación de un LED que produce la generación de una capa de material sólido polimerizado. El láser, moviéndose sobre la superficie del líquido, induce la polimerización capa a capa siguiendo el diseño del modelo digital de acuerdo con el diseño predeterminado. A medida que se polimeriza/solidifica cada capa, la plataforma sobre la que se está construyendo el modelo se mueve hacia arriba para permitir la formación de nuevas capas.¹⁵ Este apilamiento controlado de capas requiere tanto una buena adherencia entre las capas sucesivas como que el grado de entrecruzamiento esté optimizado, de manera que la estructura polimerizada no se disuelva en la tinta monomérica. Además, las propiedades mecánicas del material en proceso de diseño han de ser adecuadas para mantener la estructura diseñada bajo las condiciones de trabajo. Bajo esta perspectiva, los métodos de impresión 3D han permitido el desarrollo y diseño de materiales avanzados con estructuras 3D complejas. Además, la precisión y rendimiento de esta técnica ha mejorado significativamente logrando minimizar notablemente la cantidad de materia prima utilizada para la obtención del producto final.¹⁶

¹⁵ Abdalla, A.; Patel, B. A. 3D-printed electrochemical sensors: A new horizon for measurement of biomolecules. *Current Opinion in Electrochemistry* **2020**, *20*, 78-81.

¹⁶ Díaz-Marta, A. S.; Tubío, C. R.; Carbajales, C.; Fernández, C.; Escalante, L.; Sotelo, E.; Guitián, F.; Barrio, V. L.; Gil, A.; Coelho, A. Three-Dimensional Printing in Catalysis: Combining 3D Heterogeneous Copper and Palladium Catalysts for Multicatalytic Multicomponent Reactions. *ACS Catal.* **2018**, *8* (1), 392-404.

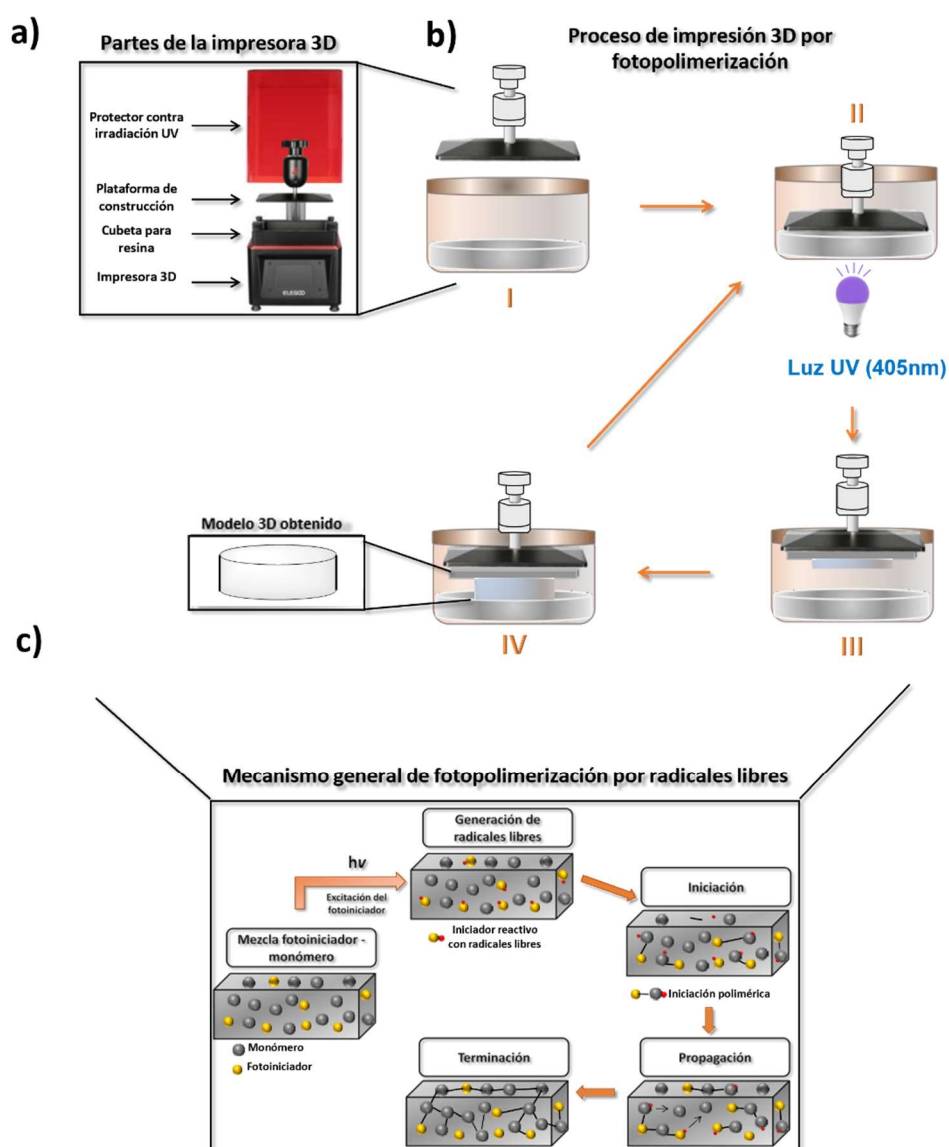


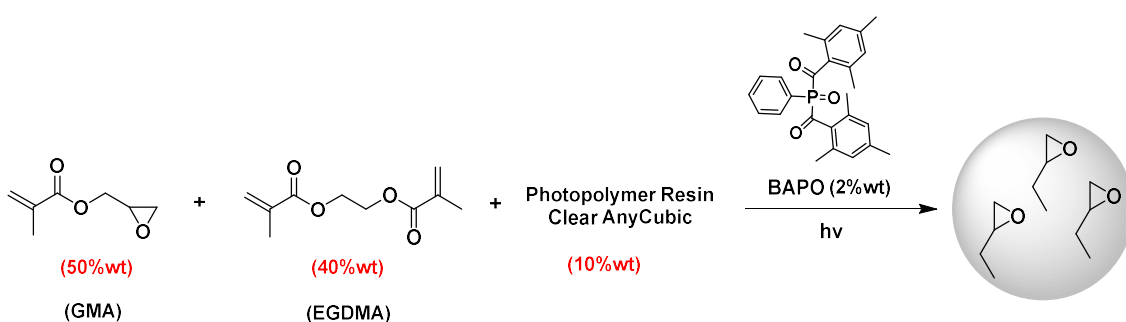
Figura 6.2. (a) Componentes principales de la impresora 3D. (b) Representación esquemática del proceso de impresión 3D por fotopolimerización. (I) Los reactivos utilizados en la preparación de la mezcla monomérica líquida se cargan en la cubeta. (II) La placa se sumerge en la disolución para comenzar el ciclo de impresión, LED (405 nm) irradia la disolución e inicia la reacción fotoquímica para formar la capa de polímero en la placa de construcción. (III) La placa se eleva para terminar de generar la capa polimérica. (IV) El ciclo vuelve a iniciar, sumergiéndose la placa en la disolución y creando una nueva capa, y así continuamente hasta obtener el modelo 3D programado. (c) Mecanismo general de fotopolimerización por radicales libres (modificado de ref. 13).

6.2.1 Optimización de la formulación para diseño de impresión 3D

En la búsqueda de una metodología directa y sencilla para la preparación de dispositivos poliméricos 3D funcionalizados, se propuso el monómero comercial metacrilato de glicidilo (GMA) como un componente elemental para la formulación de mezclas monoméricas funcionales. El GMA copolimeriza con muchos monómeros convencionales y ofrece un

medio económico para introducir grupos funcionales reactivos en matrices poliméricas. Esto facilita el diseño y fabricación de estructuras 3D complejas con presencia en su superficie de grupos funcionales para diferentes aplicaciones. La presencia del grupo epóxido permite el desarrollo de diferentes estrategias para la post-modificación en condiciones controladas de estas estructuras 3D.

En primer lugar, se llevaron a cabo estudios preliminares con el fin de determinar una formulación adecuada que permitiera el desarrollo de una tinta basada en el GMA.¹⁷ Para ello, se estudió la polimerización de diferentes mezclas de monómeros funcionales con GMA en presencia de BAPO como fotocatalizador. La polimerización se llevó a cabo en moldes en forma de disco (diámetro: 3.3 cm, volumen: 1 mL) y por acción de una fuente de irradiación de 365 nm. Por otro lado, las diferentes mezclas polimerizadas en forma de disco se expusieron a diferentes disolventes orgánicos para evaluar su grado de hinchamiento y estabilidad. A partir de los diferentes estudios de polimerización y estabilidad, la formulación optimizada para la impresión 3D fue una mezcla de 50 % w/w de GMA, 40 % w/w de dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) como agente entrecruzante y 10 % w/w de la resina comercial adecuada para la impresora utilizada, tal y como se ilustra en el Esquema 6.1. Es importante destacar que la presencia de un entrecruzante adicional (en este caso, EGDMA) comporta una mejora en la estabilidad mecánica del disco por lo que respecta al hinchamiento en disolvente.



Esquema 6.1. Formulación del material polimérico para impresión 3D

De este modo, la impresión 3D se llevó a cabo con la formulación optimizada. En vista de la futura aplicabilidad que será expuesta en el apartado posterior, el diseño geométrico seleccionado es la preparación de un disco de 10 mm de diámetro y de un espesor de 1.5 mm con la presencia de un orificio. El diseño seleccionado fue creado mediante la utilización

¹⁷ Valverde Barquero, D. A. Materiales poliméricos multifuncionales basados en líquidos iónicos. Estrategias para el desarrollo de aplicaciones avanzadas en Química Sostenible en la UNED de Costa Rica. PhD Thesis, Castellón de la Plana, España, 2021.

del software “AutoCad”. En la Figura 6.3 se observa el modelo digital creado junto con la plantilla creada para la impresión simultánea de 32 discos. Los parámetros de impresión se establecieron con un tiempo de exposición de 60 segundos por capa, irradiación de luz UV integrada a 405 nm y espesor de capa de 50 μm .

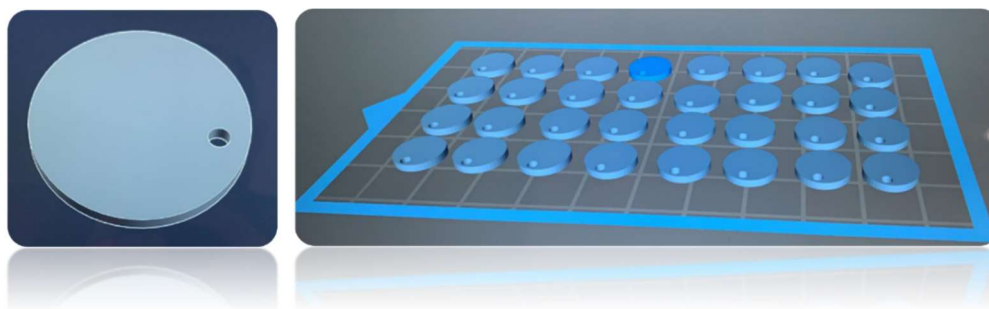


Figura 6.3. Diseño del modelo y plantilla diseñada por software para impresión 3D.

Una vez finalizado el proceso de impresión, se extrajo la placa metálica y se separaron los discos impresos con una espátula cuidadosamente para evitar su fractura. Los discos se lavaron con isopropanol para eliminar los restos de monómero no polimerizados y se secaron en la estufa a 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Tal y como se observa en la Figura 6.4, los discos obtenidos son transparentes.



Figura 6.4. Discos poliméricos impresos en 3D

6.2.2 Síntesis de SILs (Líquidos Iónicos Soportados)

El siguiente reto fue funcionalizar estos materiales con unidades de líquido iónico. En la literatura, se han reportado diferentes aproximaciones para conseguir integrar los líquidos iónicos en estructuras poliméricas 3D. Estas aproximaciones permiten combinar las propiedades únicas de los líquidos iónicos con las propiedades intrínsecas de los polímeros como estabilidad mecánica, procesabilidad o fácil funcionalización.¹⁸ En este contexto, una

¹⁸ Nulwala, H.; Mirjafari, A.; Zhou, X. Ionic liquids and poly(ionic liquid)s for 3D printing – A focused mini-review. *European Polymer Journal* **2018**, *108*, 390-398.

de las metodologías más empleadas para la formación de redes poliméricas 3D basadas en ILs se basa en la polimerización de monómeros de líquido iónico con otros comonómeros como agentes entrecruzantes. Así, tal y como se ilustra en la Figura 6.5 (a-c), se ha reportado la copolimerización de monómeros de líquido iónico de fosfonio¹⁹ y imidazolio²⁰ con diacrilatos, así como monómeros de ILs basados en epóxidos cicloalifáticos.²¹ Una segunda estrategia, se basa en la deposición y polimerización de un precursor de IL seguido de la post-funcionalización para generar el líquido iónico soportado, tal y como reportaron Karjalainen y colaboradores (Figura 6.5d).²² La modulación de las propiedades de estos materiales 3D basados en ILs se puede lograr seleccionando aniones, cationes, cadenas laterales y grupos funcionales adicionales.

Estas metodologías solventan algunas de las desventajas más comúnmente asociadas con la aplicación de ILs en diferentes procesos como coste elevado, separación compleja o aspectos toxicológicos entre otros, obteniéndose materiales que mantienen las características principales de los ILs (estabilidad, polaridad altamente modulable, etc.)

¹⁹ Schultz, A. R.; Lambert, P. M.; Chartrain, N. A.; Ruohoniemi, D. M.; Zhang, Z.; Jangu, C.; Zhang, M.; Williams, C. B.; Long, T. E. 3D Printing Phosphonium Ionic Liquid Networks with Mask Projection Microstereolithography. *ACS Macro Letters* **2014**, *3* (11), 1205-1209.

²⁰ Wales, D. J.; Cao, Q.; Kastner, K.; Karjalainen, E.; Newton, G. N.; Sans, V. 3D-Printable Photochromic Molecular Materials for Reversible Information Storage. *Advanced Materials* **2018**, *30* (26), 1800159.

²¹ Radchenko, A. V.; Duchet-Rumeau, J.; Gérard, J.-F.; Baudoux, J.; Livi, S. Cycloaliphatic epoxidized ionic liquids as new versatile monomers for the development of shape memory PIL networks by 3D printing. *Polymer Chemistry* **2020**, *11* (34), 5475-5483.

²² Karjalainen, E.; Wales, D. J.; Gunasekera, D. H. A. T.; Dupont, J.; Licence, P.; Wildman, R. D.; Sans, V. Tunable Ionic Control of Polymeric Films for Inkjet Based 3D Printing. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2018**, *6* (3), 3984-3991.

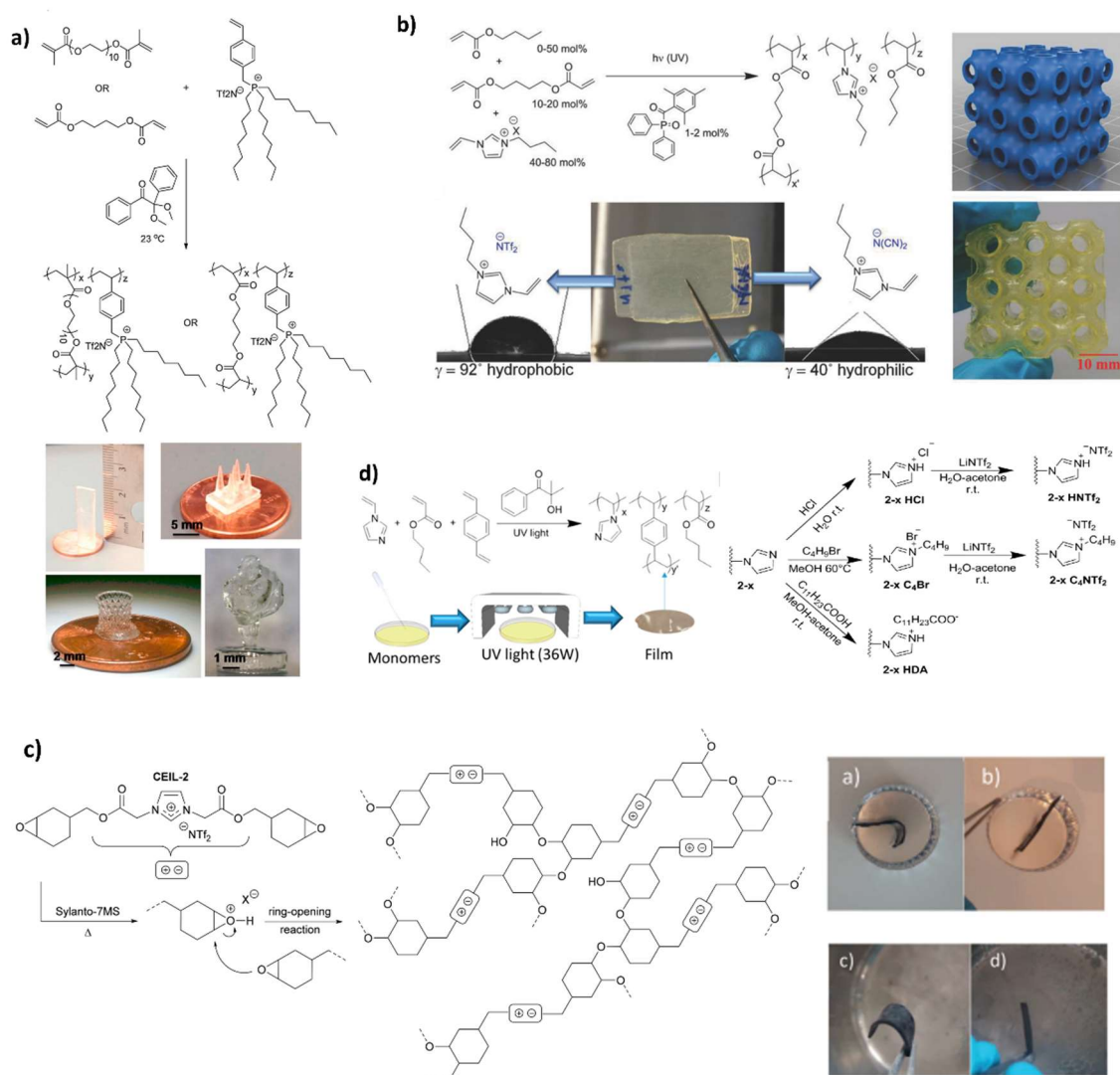
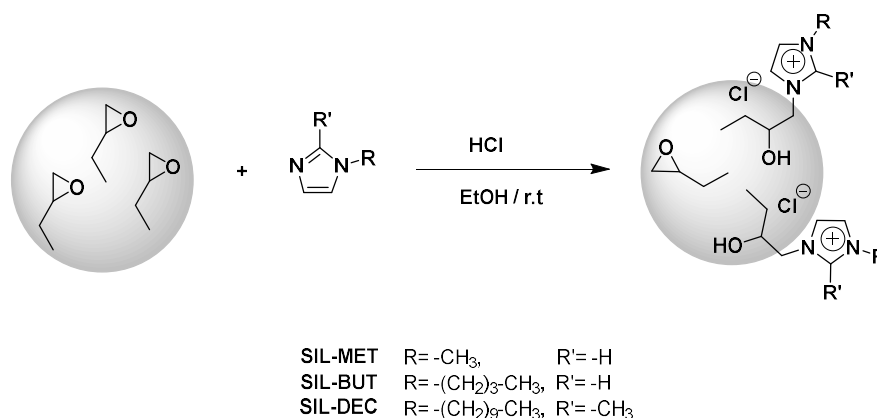


Figura 6.5. (a) Síntesis de Poli(PEGDMA-co-TOPTf₂N) y Poli(BDA-co-TOPTf₂N) y diseños 3D impresos, (b) Composiciones de la formulación de impresión 3D que contienen monómeros de ILs y diseños 3D, (c) Mecanismo de polimerización y respuesta de deformación antes (a y c) y después (b y d) de calentar a 90 °C en un baño de agua. y (d) Metodología de polimerización de monómeros y derivatización de las membranas. (tomados de ref. 19, 20, 21 y 22, respectivamente).

En nuestro caso, la estrategia elegida se basa en la post-modificación de los materiales poliméricos obtenidos mediante la impresión 3D. Una vez obtenidas las estructuras 3D, los discos en nuestro caso, funcionalizadas con grupos epóxidos, su modificación consiste en la apertura nucleofílica del anillo de epóxido en presencia de sales de cloruro de imidazol con diferente cadena alifática, tal y como se ilustra en el Esquema 6.2. Este sencillo método permite la introducción simple de una gran variedad de restos con estructura de ILs, en

nuestro caso, sales de imidazolio.²³ Así, la modificación se realizó con metil-, butil- y 1-decil-2-metil-imidazol para la obtención de **SIL-MET**, **SIL-BUT** y **SIL-DEC**, respectivamente.



Esquema 6.2. Condiciones de apertura del epóxido para discos superficialmente modificados.

6.2.2.1 Caracterización de SILs mediante FT-IR-ATR y Raman

La modificación se monitorizó fácilmente mediante la espectroscopia de FT-IR-ATR. La Figura 6.6 muestra los espectros del polímero antes y después de la funcionalización química. El primer signo de una modificación exitosa es la aparición de la banda asociada con el estiramiento del grupo hidroxilo (-OH) a 3273 cm⁻¹, indicativo de la apertura del epóxido (Figura 6.6a). La apertura del anillo de epóxido también se confirma por la desaparición casi completa de la banda a 905 cm⁻¹ asociada al estiramiento C-O en el epóxido (Figura 6.6b). Los espectros también muestran la presencia de nuevas bandas relacionadas con la presencia de grupos imidazolio en 3146 y 3111 cm⁻¹ asignadas al estiramiento C₂-H (componente de baja frecuencia) y estiramiento C_{4,5}-H (componente de alta frecuencia) junto con señales a 1584 cm⁻¹ y 1551 cm⁻¹ (estiramiento del anillo C=N), 907 cm⁻¹ (estiramiento del anillo C-C) y 700, 659 y 624 cm⁻¹ (vibraciones del anillo fuera del plano) (Figura 6.6c).²⁴

²³ Zhu, T.; Bi, W.; Row, K. H. A New Ionic Liquids-Based Monolithic Column for Determination of Caffeine and Theophylline. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *118* (6), 3425–3430.

²⁴ Paschoal, V. H.; Faria, L. F. O.; Ribeiro, M. C. C. Vibrational Spectroscopy of Ionic Liquids. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (10), 7053–7112.

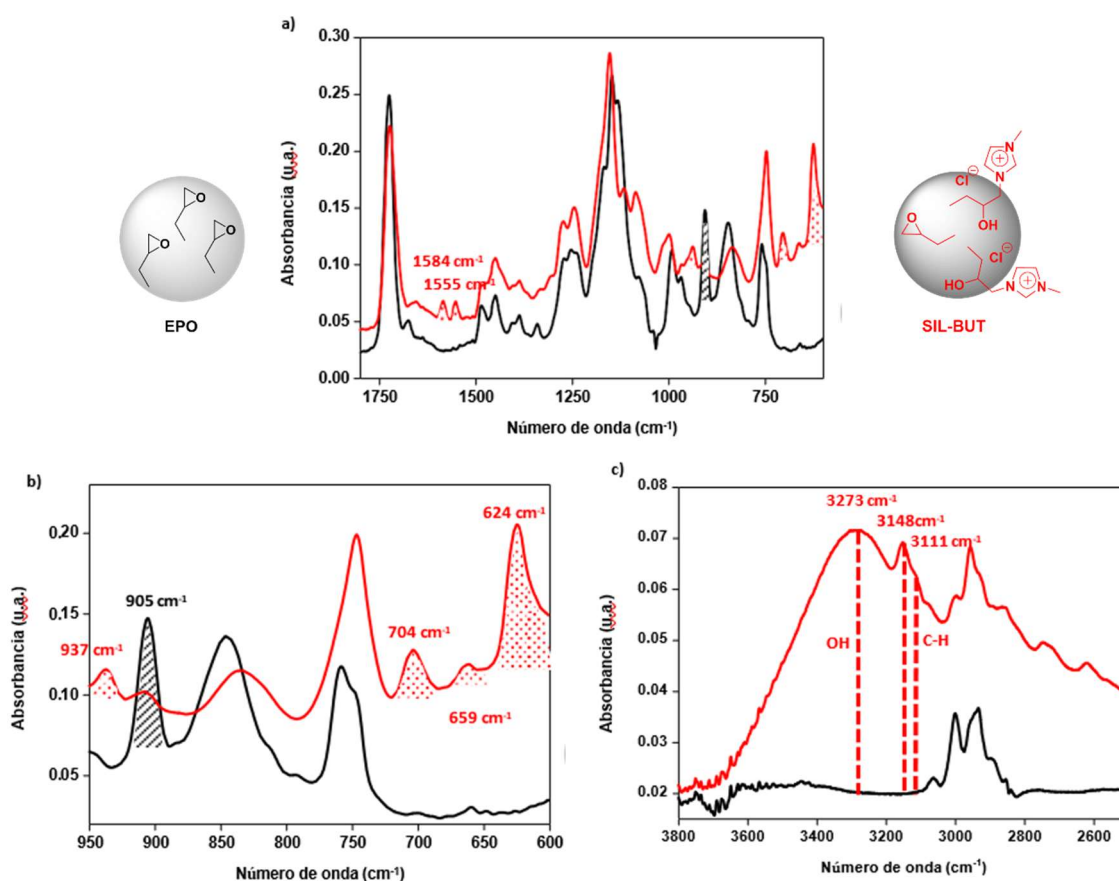


Figura 6.6. FT-IR-ATR del EPO modificado con metilimidazol. (a) Región 1800-600 cm^{-1} , (b) Región de 3800-2500 cm^{-1} y (c) Región de 950-600 cm^{-1} . Negro: EPO. Rojo: SIL-MET.

Cabe señalar que la profundidad de penetración en la muestra para los experimentos FT-IR-ATR suele estar entre 0.5 y 2 μm , con el valor exacto determinado por la longitud de onda de la luz, el ángulo de incidencia y los índices de refracción del cristal ATR y el medio que se está analizando.²⁵ Así, los datos obtenidos de la espectroscopia ATR solo proporcionan información sobre la modificación de la superficie de los discos tratados.

Para identificar la extensión de la modificación tanto de la superficie como de las capas internas, se realizó análisis de microscopía confocal Raman de las muestras. Esta técnica permite mapear la composición del polímero con una profundidad de penetración de 200 μm aproximadamente. La Figura 6.7 muestra el mapeo obtenido para el disco **EPO** y el material SIL preparado a partir de la modificación con butilimidazol (**SIL-BUT**) utilizando diferentes penetraciones para la luz láser incidente. El análisis de Raman del disco **EPO** revela la presencia de un solo componente en toda la profundidad evaluada, el cual corresponde al grupo funcional epóxido. Este componente principal, como era de esperar,

²⁵ Mirabella, F. M. *Internal Reflection Spectroscopy: Theory and Applications*; Marcel Dekker: New York, 1993.

corresponde al monómero GMA, con bandas a 1729 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$) característicos del grupo éster de los monómeros acrílicos y a 1261 cm^{-1} y 911 cm^{-1} asignables a los grupos epóxido (estiramiento asimétrico y simétrico, respectivamente). Sin embargo, el mapeo de **SIL-BUT** muestra claramente la presencia de dos componentes diferentes y espacialmente separados (Figura 6.7).

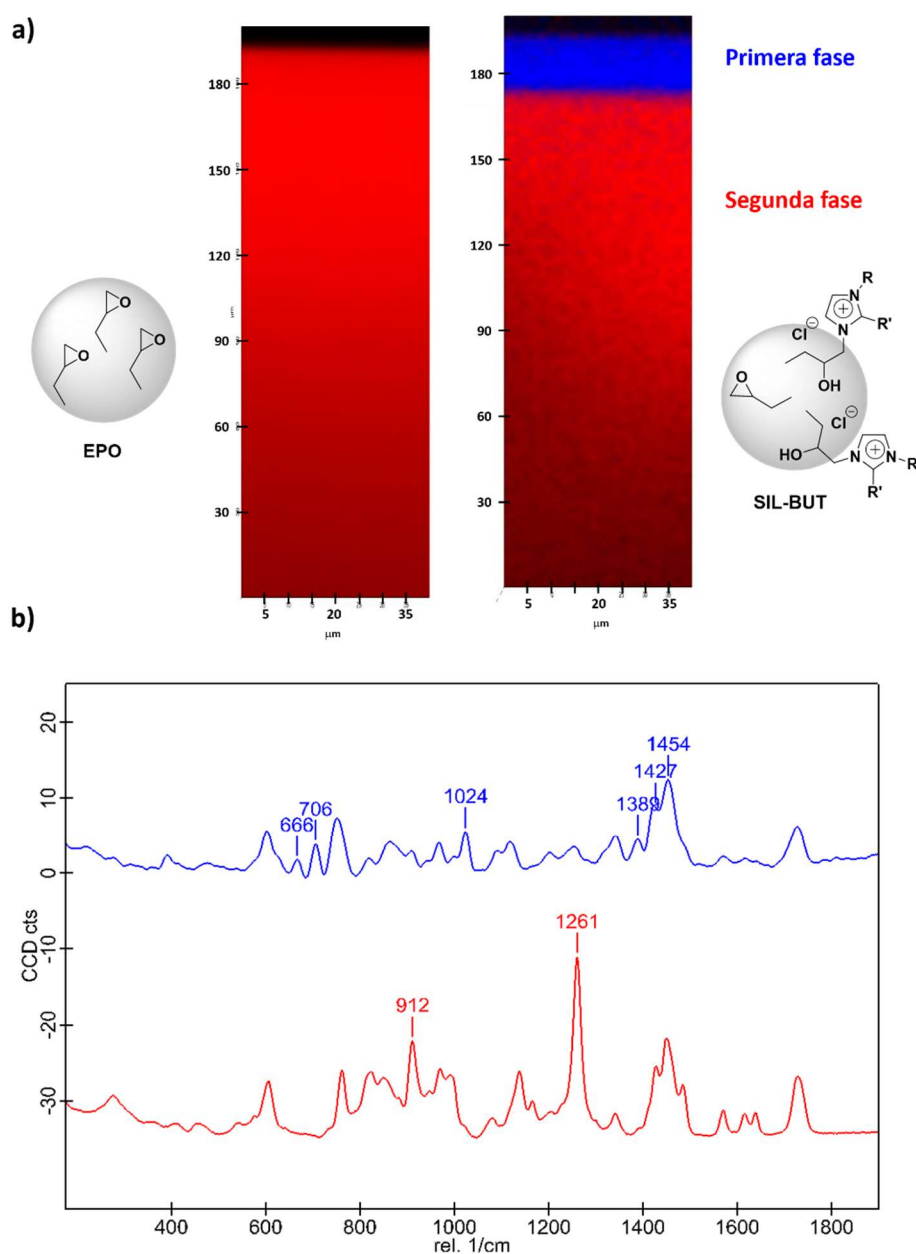


Figura 6.7. Estudio de microscopía confocal Raman de discos **EPO** y **SIL-BUT** (longitud de onda de excitación: 532 nm , potencia del láser: $2,9\text{ mW}$, aumento objetivo: $50\times$). (a) Mapeo para la profundidad inicial de $200\text{ }\mu\text{m}$ del disco: la región negra corresponde al aire, la región azul corresponde a la modificación superficial con unidades de imidazolio, la región roja corresponde a la región epoxi sin modificar y (b) Espectros Raman correspondientes a las regiones azul (superior) y roja (inferior).

El análisis de los espectros para la primera fase, que se encuentra en una fina capa superficial de 10 μm de profundidad aproximadamente, revela: i) una fuerte disminución de la intensidad de los bandas asignables al anillo epóxido a 1261 cm^{-1} y 911 cm^{-1} , ii) la aparición de nuevas bandas a 1025 cm^{-1} (C-H, en flexión plana), 707 cm^{-1} y 667 cm^{-1} (C-C, vibraciones anulares fuera del plano) asignables a la sustitución de imidazolio, y iii) un cambio significativo en la región de 1500-1300 cm^{-1} donde aparecen las bandas de estiramiento del enlace C=C y C=N del imidazolio, especialmente la aparición de una banda a 1389 cm^{-1} . Esto indica que en la primera capa se ha producido la apertura de los grupos epoxi del anillo con el derivado de imidazol. La segunda fase coincide con la fase encontrada para la resina **EPO**. Por lo tanto, bajo las condiciones experimentales ensayadas, se logró una modificación superficial de aproximadamente 10 μm de profundidad, lo que también explica la baja carga de unidades de imidazolio encontrada por análisis elemental (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Valores de carga unitaria de imidazolio calculada por análisis elemental

| Entrada | SILLP | Carga de IL [mmol g ⁻¹] | R | R' |
|---------|----------------|--|---|-----------------|
| 1 | EPO | - | - | - |
| 2 | SIL-MET | 0.076 | CH ₃ | H |
| 3 | SIL-BUT | 0.088 | CH ₃ (CH ₂) ₃ | H |
| 4 | SIL-DEC | 0.071 | CH ₃ (CH ₂) ₉ | CH ₃ |

6.3 Tipos de sensores basados en impresión 3D

En general, los sensores impresos en 3D se pueden clasificar aproximadamente en tres tipos principales: sensores físicos, biosensores y sensores químicos.²⁶ Los sensores físicos se utilizan para detectar cambios asociados a efectos físicos y luego convertirlos en una señal eléctrica para un procesamiento fácil y monitorización. Los biosensores hacen uso de elementos de reconocimiento como enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos o células enteras para detectar y monitorizar el mecanismo biológico. Finalmente, los sensores químicos se basan en reacciones químicas combinadas con mecanismos de transducción para evaluar la

²⁶ Ni, Y.; Ji, R.; Long, K.; Bu, T.; Chen, K.; Zhuang, S. A review of 3D-printed sensors. *Applied Spectroscopy Reviews* **2017**, 52 (7), 623-652.

respuesta. En este sentido, los sensores químicos impresos en 3D se pueden aplicar para detectar la presencia y concentración de líquidos y gases, así como variaciones de pH. En relación con la tecnología de impresión 3D utilizada en la detección de pH, la variación de pH puede detectarse mediante métodos ópticos^{27,28} o electroquímicos.²⁹ El objetivo de este trabajo se centra en el desarrollo de un sensor (en este contexto, indicador) basado en impresión 3D para la detección de las aminas volátiles mediante la variación de pH utilizando sondas colorimétricas. En este sentido, el prototipo de envasado inteligente consiste en un indicador visual basado en cambios colorimétricos con el fin de monitorizar y comunicar el estado de los alimentos según se indica en el apartado 6.1.

6.3.1 Material inteligente 3D – Inmovilización de sonda colorimétrica

La aplicación de colorantes o sondas sensibles al pH ofrece la posibilidad de monitorizar de forma continua y cualitativa el pH mediante una observación visual de un cambio de color. La mayoría de ellos se preparan mediante la inmovilización en una matriz sólida orgánica u inorgánica bien mediante atrapamiento físico³⁰ o por la creación de una unión covalente.^{31,32} Ambos casos presentan ciertas limitaciones. Así, los materiales inteligentes obtenidos mediante el atrapamiento físico sufren por la lixiviación del colorante o sonda del soporte a la solución. Por otro lado, si bien los materiales inteligentes obtenidos por inmovilización del colorante mediante una unión covalente al soporte minimizan el lixiviado, en general, requieren procedimientos de preparación relativamente complejos, tediosos y de un mayor coste. En este contexto, la inmovilización de sondas colorimétricas basadas en indicadores de pH mediante intercambio aniónico o interacciones de carácter iónico supone una

²⁷ Hossain, M. A.; Canning, J.; Ast, S.; Rutledge, P.; Li Yen, T.; Jamalipour, A. Lab-in-a-Phone: Smartphone-Based Portable Fluorometer for pH Measurements of Environmental Water. *IEEE Sensors Journal* **2014**, *15*, 5095- 5102.

²⁸ Yafia, M.; Ahmadi, A.; Hoorfar, M.; Najjaran, H. Ultra-Portable Smartphone Controlled Integrated Digital Microfluidic System in a 3D-Printed Modular Assembly. *Micromachines* **2015**, *6* (9), 1289-1305.

²⁹ Ambrosi, A.; Moo, J. G. S.; Pumera, M. Helical 3D-Printed Metal Electrodes as Custom-Shaped 3D Platform for Electrochemical Devices. *Advanced Functional Materials* **2016**, *26* (5), 698-703.

³⁰ Kermis, H. R.; Kostov, Y.; Harms, P.; Rao, G. Dual Excitation Ratiometric Fluorescent pH Sensor for Noninvasive Bioprocess Monitoring: Development and Application. *Biotechnology Progress* **2002**, *18* (5), 1047-1053.

³¹ Leng, W.; Zhou, S.; You, B.; Wu, L. Formation of Sulfonated Aromatic Ketone Chromophores within Styrene–Acrylic Acid Copolymers and Their pH-Responsive Color Change. *Langmuir* **2010**, *26* (23), 17836-17839.

³² De Smet, L.; Vancoillie, G.; Minshall, P.; Lava, K.; Steyaert, I.; Schoolaert, E.; Van De Walle, E.; Dubruel, P.; De Clerck, K.; Hoogenboom, R. Plasma dye coating as straightforward and widely applicable procedure for dye immobilization on polymeric materials.

alternativa que reúne una preparación sencilla por simple intercambio iónico con una reducción del lixiviado (Figura 6.8).³³

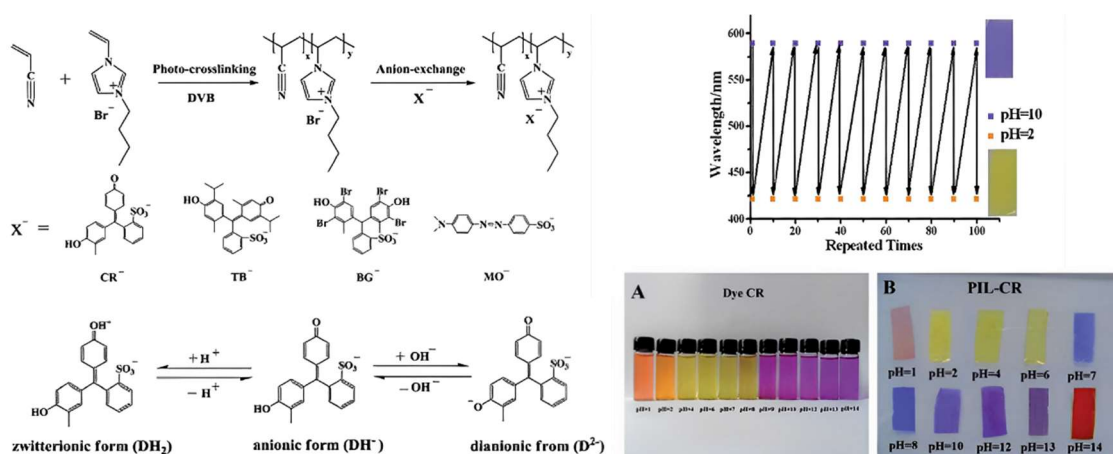


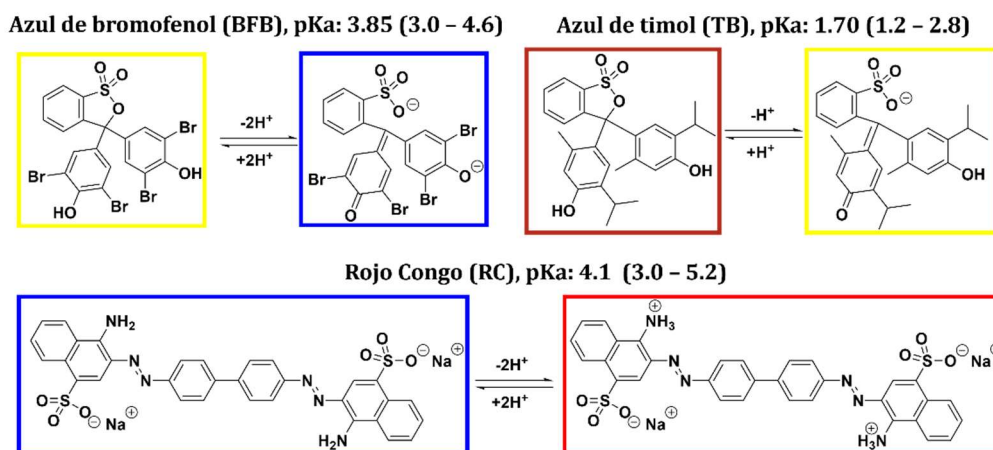
Figura 6.8. Estrategia de polimerización e intercambio aniónico de indicadores de pH y evaluación de la respuesta en diferentes pH y evaluación de la reversibilidad del sistema (tomado de ref. 33).

De este modo, los colorantes aniónicos sensibles al pH, como rojo cresol (CR), naranja de metilo (MO) y azul de bromotimol (TB) han sido empleados para esta aplicación.^{34,35} El estudio de inmovilización se llevó a cabo con colorantes aniónicos sulfonados que soportan su carga negativa en un amplio rango de pH. El Esquema 6.3 muestra la estructura de los tres indicadores de pH evaluados para la inmovilización en los SILs preparados. Se trata del azul de bromofenol (BFB), azul de timol (TB) y rojo congo (RC), respectivamente.

³³ Guo, J.; Qiu, L.; Deng, Z.; Yan, F. Plastic reusable pH indicator strips: preparation via anion-exchange of poly(ionic liquids) with anionic dyes. *Polymer Chemistry* **2013**, 4 (5), 1309-1312.

³⁴ Varjani, S.; Rakholiya, P.; Shindhal, T.; Shah, A. V.; Ngo, H. H. Trends in dye industry effluent treatment and recovery of value added products. *Journal of Water Process Engineering* **2021**, 39, 101734.

³⁵ Zhang, Q.; Zhang, S.; Liu, S.; Ma, X.; Lu, L.; Deng, Y. Ionic liquid-modified dyes and their sensing performance toward acids in aqueous and non-aqueous solutions. *Analyst* **2011**, 136 (7), 1302-1304.



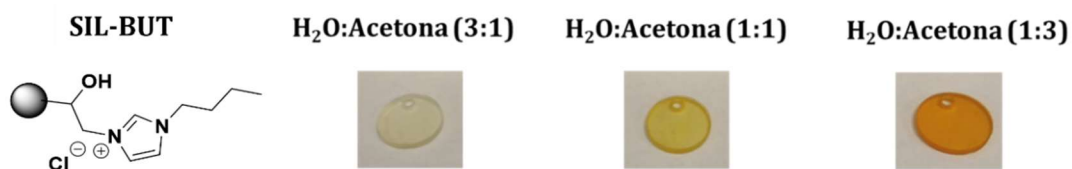
Esquema 6.3. Estructuras y colores asociados a las diferentes sondas colorimétricas sensibles al pH.

6.3.1.1 Optimización de las condiciones de inmovilización

Para llevar a cabo la inmovilización y debido a la baja solubilidad de las sondas en disoluciones acuosas u orgánicas, se optó por evaluar mezclas de agua y disolvente orgánico (acetona). De este modo, la inmovilización se evaluó para una concentración definida de la sonda seleccionada en las siguientes mezclas:

- H₂O: Acetona (3:1)
- H₂O: Acetona (1:1)
- H₂O: Acetona (1:3)

Las primeras pruebas se realizaron con el azul de timol (**TB**) en presencia de discos modificados con butilimidazol (**SIL-BUT**), obteniéndose los resultados reflejados en la Figura 6.9.

Figura 6.9. Inmovilización de **TB** en disco **SIL-BUT** en diferentes condiciones

De las imágenes se puede concluir que un mayor contenido de disolvente orgánico favorece una inmovilización más eficiente de la sonda y, como resultado, la sonda queda impregnada en su forma básica de color amarillo. Estos resultados iniciales mostraron que la elección del disolvente es crítica para optimizar la inmovilización de la sonda colorimétrica. Con el fin de racionalizar este efecto, se realizó un estudio de tensión superficial de los diferentes

disolventes en función de la naturaleza del material empleado. Dicho estudio consistió en depositar una gota de la mezcla estudiada sobre el polímero modificado y después calcular el ángulo de contacto que se genera. El ángulo de contacto mide el ángulo que forma un líquido al entrar en contacto con un sólido. El valor del ángulo de contacto será mayor cuando menor sea la compatibilidad del material con el disolvente evaluado. En la Figura 6.10, se representa un resumen de los valores obtenidos para el ángulo de contacto, empleando tanto discos sin modificar (**EPO**) como modificados con imidazoles de cadena alifática corta (**SIL-MET**) y larga (**SIL-DEC**).

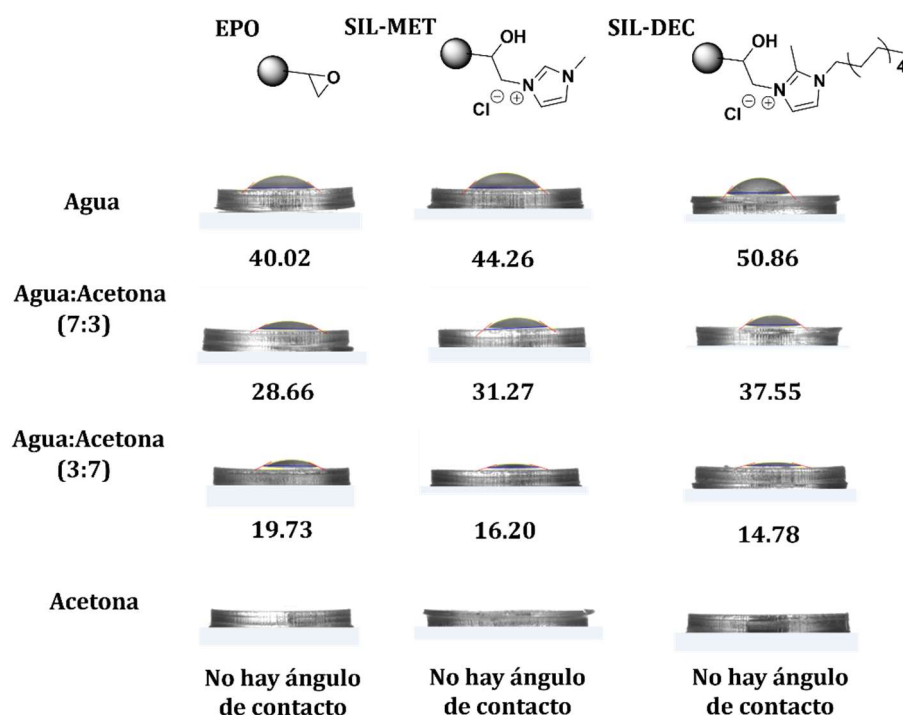


Figura 6.10. Estudio de tensión superficial por medida del ángulo de contacto (valores del ángulo de contacto en grados).

En primer lugar, como se puede apreciar claramente en la Figura 6.10, la variación de los valores observados confirma que la modificación superficial de los discos ha tenido lugar. Así, por ejemplo, si nos fijamos en los valores de la primera serie con agua para los discos modificados con los imidazoles se produce un aumento del ángulo de contacto con agua (WCA, por sus siglas en inglés), que indica un aumento de la hidrofobicidad. Este aumento es mayor para el imidazolio con una cadena alquílica mayor (42.26° para $-\text{CH}_3$ vs 50.86° para $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$). Por otro lado, se puede apreciar claramente que un aumento de la proporción de agua conlleva un aumento del valor del ángulo de contacto. Este aumento indica que los materiales presentan una carácter más hidrofóbico y menos compatible con el agua o mezclas ricas en agua. Así por ejemplo, **SIL-DEC** presenta una mayor hidrofobicidad

respecto de fases con mayor contenido acuoso debido a la introducción de cadenas alquílicas más largas, mientras que la tendencia cambia cuando aumenta la proporción de fase orgánica en la mezcla agua:acetona (3:7), la cual presenta el menor valor de ángulo de contacto. Estos resultados no solo confirman la modificación de la superficie, sino también que la naturaleza del *N*-alquil-imidazol puede usarse para modular la hidrofiliidad/hidrofobicidad de la superficie.

Estos resultados explican los resultados experimentales obtenidos para las pruebas de inmovilización de **TB** en el disco **SIL-BUT** (Figura 6.9) donde se observa una mayor coloración con mezclas ricas en acetona.

En vista de la importancia del disolvente empleado para la inmovilización, se evaluó la inmovilización de **BFB** en los discos modificados **SIL-MET**, **SIL-BUT** y **SIL-DEC** en las condiciones que se consideraban más óptimas según los resultados del estudio de tensión superficial (agua:acetona, 3:7). En la Figura 6.11, se puede observar cómo los discos modificados con imidazoles de diferente cadena alifática quedaron impregnados de la sonda colorimétrica mencionada. Por otro lado, la sonda quedó impregnada en su forma básica de color azul oscuro como se observó en **TB**.

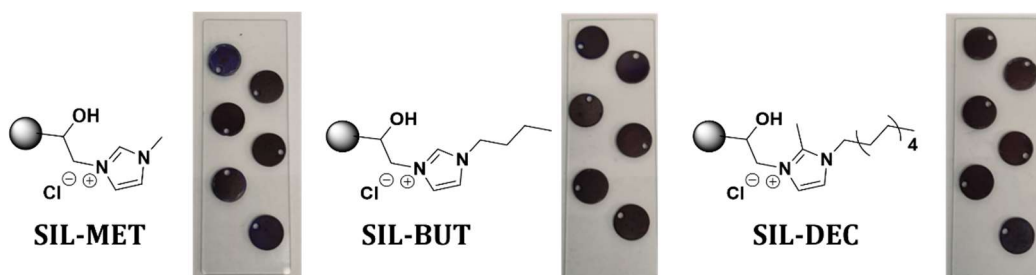


Figura 6.11. Discos 3D con diferente modificación teñidos de azul de bromofenol (**BFB**).

6.3.1.2 Acidificación de la sonda colorimétrica inmovilizada en SILs

Los resultados obtenidos para la inmovilización del **TB** sugieren el carácter ligeramente básico de los discos modificados con los imidazoles. Así pues, se quiere obtener la sonda colorimétrica en su forma química protonada para que se produzca el viraje deseado y que pueda ser empleada en el proceso de sensibilidad respecto del analito de interés (p. ej. aminas volátiles) evaluado en el apartado posterior. Para ello, se evaluaron diferentes condiciones para establecer las condiciones óptimas para acidificar la sonda colorimétrica impregnada en los SILs.

Las primeras pruebas se realizaron con el azul de bromofenol (**BFB**) y las condiciones iniciales fueron disoluciones acuosas ácidas. Los resultados de las primeras pruebas se muestran en la Figura 6.12 donde la acidificación de la sonda se llevó a cabo alternativamente con HCl concentrado y con una disolución acuosa de HCl 5M.

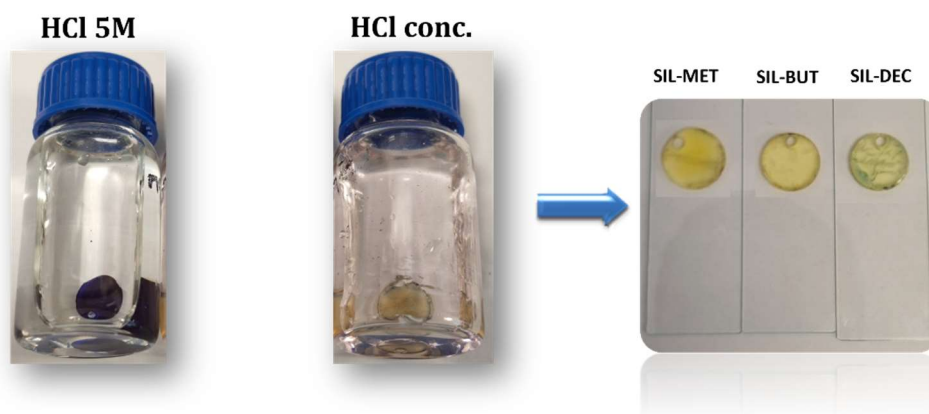


Figura 6.12. Pruebas de acidificación en disoluciones de HCl de diferente concentración y SILs
 Tal y como se observa en la Figura 6.12, la sonda colorimétrica no cambió de color con HCl 5 M después de 24 horas, mientras que con HCl concentrado condujo a la pérdida de color en el disco y se deterioró o degradó el SIL debido a la corrosión producida por esta sustancia química. Este resultado podría explicarse según el mismo fenómeno observado para la etapa de inmovilización donde la compatibilidad interfacial superficie-disolvente es un elemento clave. En este sentido, las siguientes pruebas de acidificación se llevaron a cabo empleando mezclas de una disolución acuosa de HCl de concentración conocida y acetona. Las siguientes mezclas fueron empleadas en la acidificación de la sonda (**BFB**) inmovilizada en discos modificados con butilimidazol (**SIL-BUT**):

- **A:** HCl 1M: Acetona (7:3)
- **B:** HCl 1M: Acetona (1:1)
- **C:** HCl 1M: Acetona (3:7)
- **D:** HCl 0.1M: Acetona (3:7)

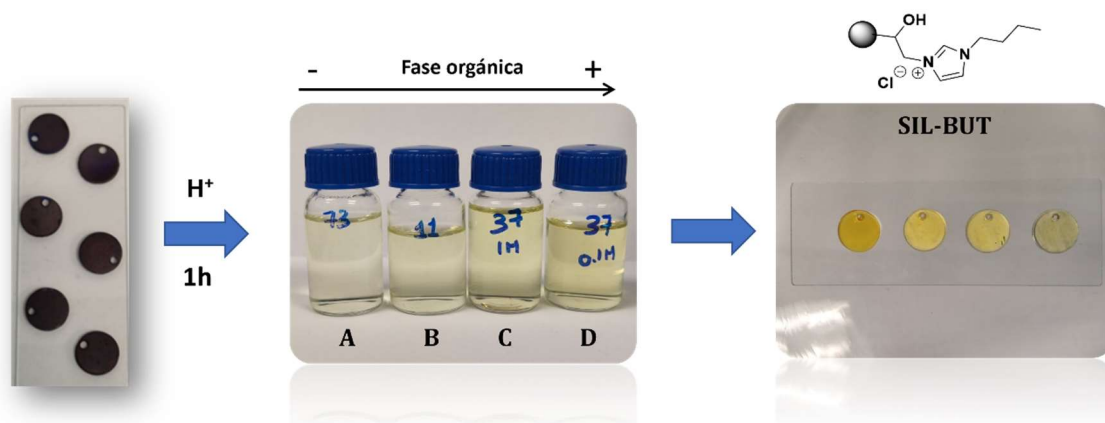
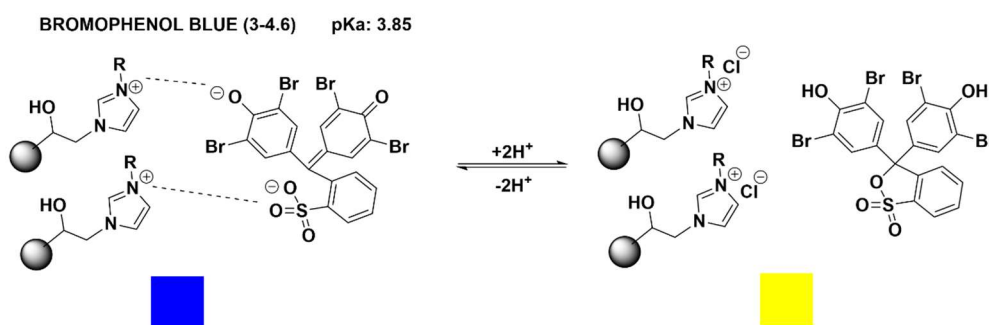


Figura 6.13. 3D-SILs impregnados con **BFB** y acidificados en diferentes condiciones

Los resultados obtenidos se muestran de forma resumida en la Figura 6.13. En todos los casos, aún con una concentración diluida del ácido, se produce la acidificación y, por lo tanto, el viraje de la sonda colorimétrica de forma básica (azul) a su forma ácida (amarillo). Estos resultados confirman que se requiere de mezclas con cierto contenido de disolvente orgánico que facilite la interacción con la superficie para que se produzca la protonación de la sonda colorimétrica. Por otro lado, se destaca que se debe alcanzar un compromiso en el contenido de disolvente orgánico, ya que en presencia de ácido y un elevado contenido de acetona se favorece el lixiviado de la sonda desde la matriz polimérica a la fase líquida. Esto queda reflejado en una pérdida de color de los discos obtenidos después de la acidificación bajo estas condiciones y la coloración que adquiere la disolución empleada para la acidificación. Finalmente, la comparación de las condiciones **C** y **D** (Figura 6.13) muestra que la concentración de la fase acuosa influye en el proceso de acidificación. Una mayor concentración de HCl favorece una transición de color más rápida y una menor lixiviación. Por ello, diferentes ensayos se realizaron para optimizar la acidificación de la sonda en términos de tiempo y menor lixiviación. Las condiciones finales de optimización fueron HCl 2.5M: Acetona (4:1).



Esquema 6.4. Estructuras del SIL y de **BFB** involucradas en los procesos de inmovilización y acidificación.

Tal y como se detalla en el Esquema 6.4, por el color que adquiere el disco, la sonda **BFB** en el proceso de tinción se encuentra en su forma básica, que es iónica, y la inmovilización se produce por un intercambio iónico, mientras que en el proceso de acidificación de la misma, se produce la protonación de la sonda que conduce a la neutralidad en carga y, por la naturaleza orgánica y apolar de la estructura, se promueve su difusión a la fase líquida. Esta liberación de la sonda se puede explicar por un intercambio iónico con el exceso de Cl⁻ proporcionado por el HCl y por el hecho de que la sonda en su forma ácida no presenta una forma iónica. De este modo, se requiere un equilibrio entre la fase acuosa y la fase orgánica para producir la protonación sin que se produzca la liberación nuevamente. Posteriormente, se evaluó la acidificación de las sondas de azul de timol (**TB**) y rojo congo (**RC**). Los resultados de las dos etapas se muestran en la Figura 6.14. La disolución correspondiente a la sonda **TB** muestra un resultado semejante al resultado observado para **BFB**, ya que se produce la liberación de la sonda en el proceso de protonación correspondiente a la segunda etapa. Sin embargo, la sonda **RC** no muestra lixiviación en la misma etapa y se puede observar el cambio de color en el SIL sin que se produzca la liberación.

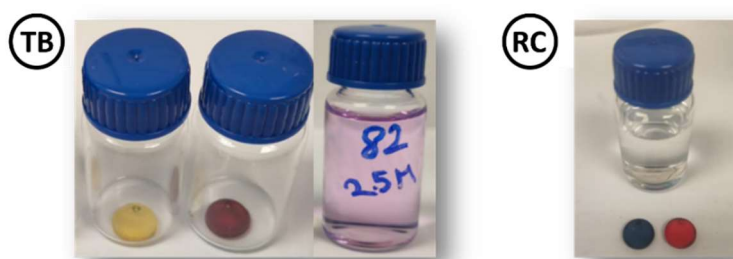
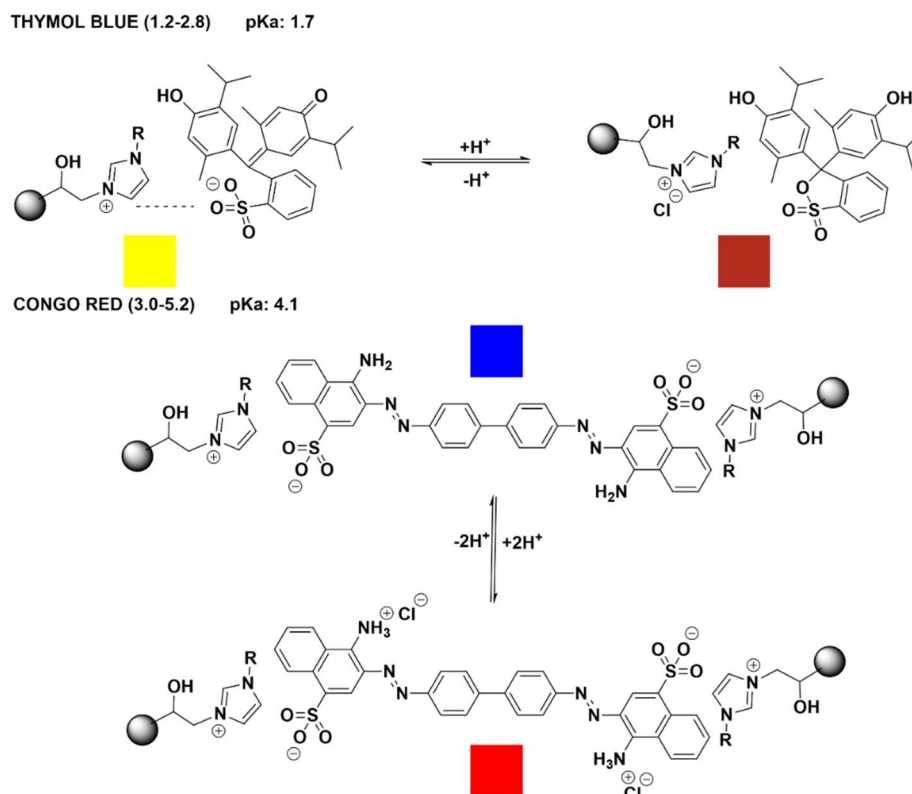


Figura 6.14. Disoluciones de HCl 2.5M: Acetona (4:1) y cambio de color de SILs para **TB** y **RC**.

Las diferencias observadas en la liberación de la sonda se pueden explicar por la interacción iónica asociada a las formas ácida y básica de sus estructuras. Tal y como se detalla en el Esquema 6.5, la sonda **TB** se impregna en su forma básica de carga aniónica y la protonación genera la especie neutra que se libera parcialmente a la disolución. Por el contrario, **RC** debido a que presenta una estructura molecular diferente tiene un comportamiento diferente respecto de **BFB** y **TB**, ya que no se produce liberación y únicamente se produce el cambio de color de la sonda quedando la misma impregnada en el material como se puede ver en la Figura 6.14. La estructura molecular de **RC** presenta cargas aniónicas en los grupos sulfonato para la forma ácida y básica, ya que la protonación se produce en las aminas generando una especie zwitteriónica. De esta manera, la interacción por carga iónica se

mantiene en cualquier valor de la escala de pH. Este fenómeno explicaría que no se produce lixiviación de la sonda cuando se aumenta el grado de acidez para que **RC** se encuentre en su forma protonada.



Esquema 6.5. Estructuras del SIL y de las sondas **TB** y **RC** involucradas en los procesos de inmovilización y acidificación.

6.3.2 Análisis y estudio de concentración de aminas volátiles

El desarrollo de materiales inteligentes está orientado a la seguridad dentro de la industria alimentaria. En el desarrollo de dichos materiales, la respuesta al analito de interés se basa en un cambio colorimétrico para determinar el positivo, el cual sea apreciable al ojo humano de manera rápida y sencilla. En este caso, nuestros sistemas están orientados a su posible aplicación en el deterioro de alimentos envasados. En este proceso se conoce que los alimentos generan aminas por la actividad microbiana³⁶ donde los aminoácidos se degradan liberando las mismas y dióxido de carbono (CO₂), tal y como se observa en la Figura 6.15. Dichas aminas por su naturaleza básica podrían ser detectadas mediante cambio de pH. Por

³⁶ Costa, M. P.; Rodrigues, B. L.; Frasao, B. S.; Conte-Junior, C. A. Chapter 2 - Biogenic Amines as Food Quality Index and Chemical Risk for Human Consumption. In *Food Quality: Balancing Health and Disease*, Holban, A. M., Grumezescu, A. M. Eds.; Academic Press, 2018; pp 75-108.

ello, se pensó en sondas colorimétricas en su forma ácida para que sean sensibles al cambio cuando se generan las aminas biogénicas.

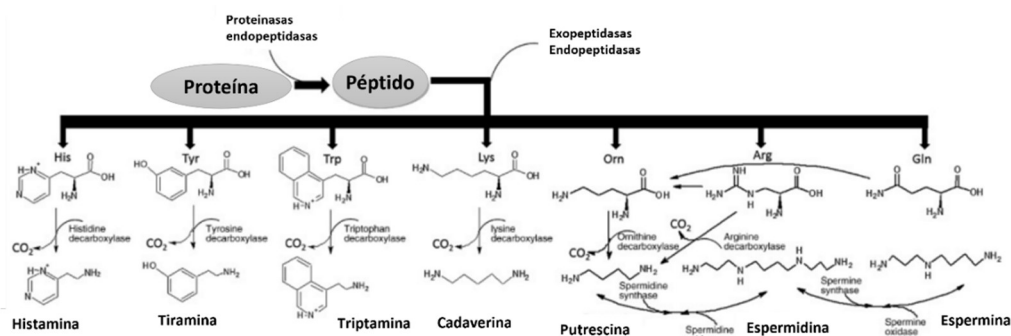


Figura 6.15. Proceso de bio-síntesis de aminas biogénicas (modificado de ref. 36).

Para evaluar la sensibilidad y el rango de concentración de los sistemas desarrollados se realizó un estudio previo a las pruebas con alimentos envasados que se pueden encontrar en el comercio. En este caso, se decidió estudiar el efecto en dos tipos de sonda: el azul de bromofenol (**BFB**) y el azul de timol (**TB**), además de evaluar el efecto de la sustitución de los imidazoles con diferente cadena alifática.

Para medir la respuesta y la sensibilidad del material inteligente se siguió la metodología descrita en la sección 4.1.9.3 del capítulo IV y reportada en la bibliografía,^{37,38} en la cual se puede estimar la concentración de amoníaco (NH_3) en fase gas como analito de referencia. La metodología consiste en generar aminas volátiles a partir de una reacción sencilla entre el cloruro de amonio (NH_4Cl) y el hidróxido de sodio (NaOH) en exceso. De esta manera, sabiendo la concentración de amonio se puede determinar la concentración de amina generada dentro de un sistema sellado de un volumen determinado, tal y como se muestra en la Figura 6.16. Este estudio nos permite hacer un seguimiento del cambio de color y estimar la concentración mínima que se puede detectar en términos de sensibilidad. El estudio se realizó a tres intervalos de concentración (1, 10 y 50 ppm de NH_3) para evaluar la sensibilidad y observar cómo cambia la respuesta del disco en función del tipo de imidazolio y del tipo de sonda colorimétrica empleados. En este caso, los discos se cubrieron parcialmente con celo para tener una referencia interna (**RI**) impermeable a los gases

³⁷ Cho, Y. B.; Jeong, S. H.; Chun, H.; Kim, Y. S. Selective colorimetric detection of dissolved ammonia in water via modified Berthelot's reaction on porous paper. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, 256, 167-175.

³⁸ Jaikang, P.; Paengnakorn, P.; Grudpan, K. Simple colorimetric ammonium assay employing well microplate with gas pervaporation and diffusion for natural indicator immobilized paper sensor via smartphone detection. *Microchemical Journal* **2020**, 152, 104283.

representando la respuesta negativa del sistema y la zona de monitorización (**RS**), la cual está expuesta a los gases para determinar la respuesta y poder observar el cambio colorimétrico (Figura 6.16).

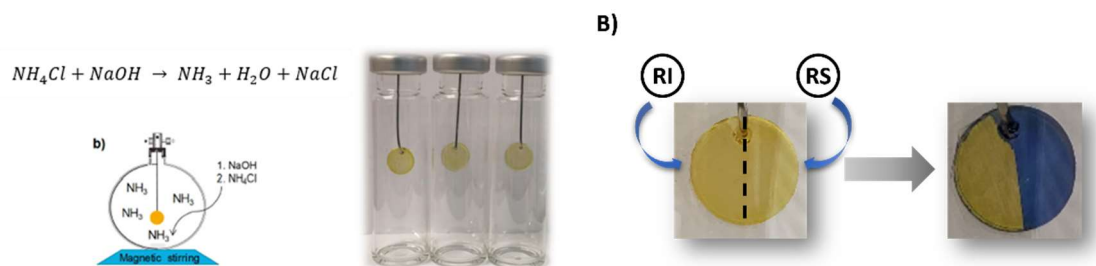


Figura 6.16. Método de generación de aminas volátiles

- Azul de bromofenol (**BFB**)

En la Figura 6.17 se muestra la respuesta de discos modificados con metilo, butilo y decilo frente a concentraciones de 10 y 50 ppm de NH_3 . **BFB** cambia de amarillo a azul cuando el pH aumenta y la respuesta es positiva debido a que se generan aminas volátiles. El cambio de color se comienza a apreciar entre 30 y 60 segundos para 50 ppm independiente del tipo de imidazolio con el que se modificó el disco. Para una concentración menor (10 ppm), esta variación se observa entre 60 y 90 segundos. Por otro lado, la saturación completa de color se alcanza a los 5 minutos aproximadamente. El efecto de la cadena alifática del imidazolio se estudia en el siguiente apartado a partir de las componentes del color.

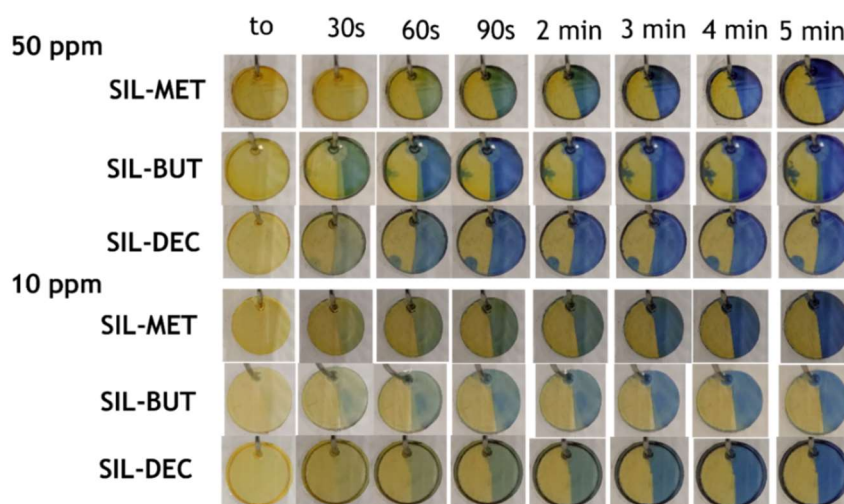


Figura 6.17. Respuesta de SILs con **BFB** expuestos a 10 y 50 ppm de NH_3 .

De la misma forma, la Figura 6.18 muestra las imágenes del cambio de color a una concentración de 1 ppm de NH_3 . Como consecuencia de generarse una concentración más

baja de aminas, los cambios se dan a tiempos más largos donde el mayor contraste entre el patrón interno (negativo) y la parte expuesta (positivo) se produce sobre 15 minutos.

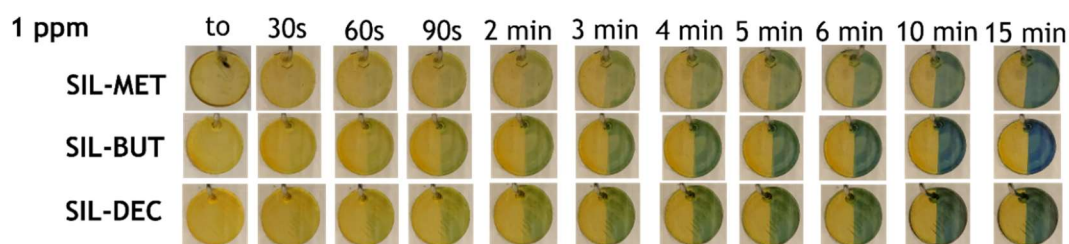


Figura 6.18. Respuesta de SILs con **BFB** expuestos a 1 ppm de NH_3 .

- Azul de timol (**TB**)

En la Figura 6.19 se muestra la respuesta de discos modificados con metilo, butilo y decilo e impregnados con **TB**. La sonda **TB** cambia de rosáceo/rojizo a amarillo cuando el pH aumenta y la respuesta es positiva si se da dicha transición cromática. El cambio de color para 50 ppm de NH_3 es evidente en 120-180 segundos donde se alcanza el contraste o la saturación completa. A 10 ppm la transición es más lenta en tiempo y progresiva con respecto al cambio de color. Finalmente, la evaluación del sistema a una concentración muy baja (1 ppm de NH_3) muestra una cinética muy lenta donde el contraste entre zonas de medida y de referencia interna se aprecia a partir de 30 minutos.

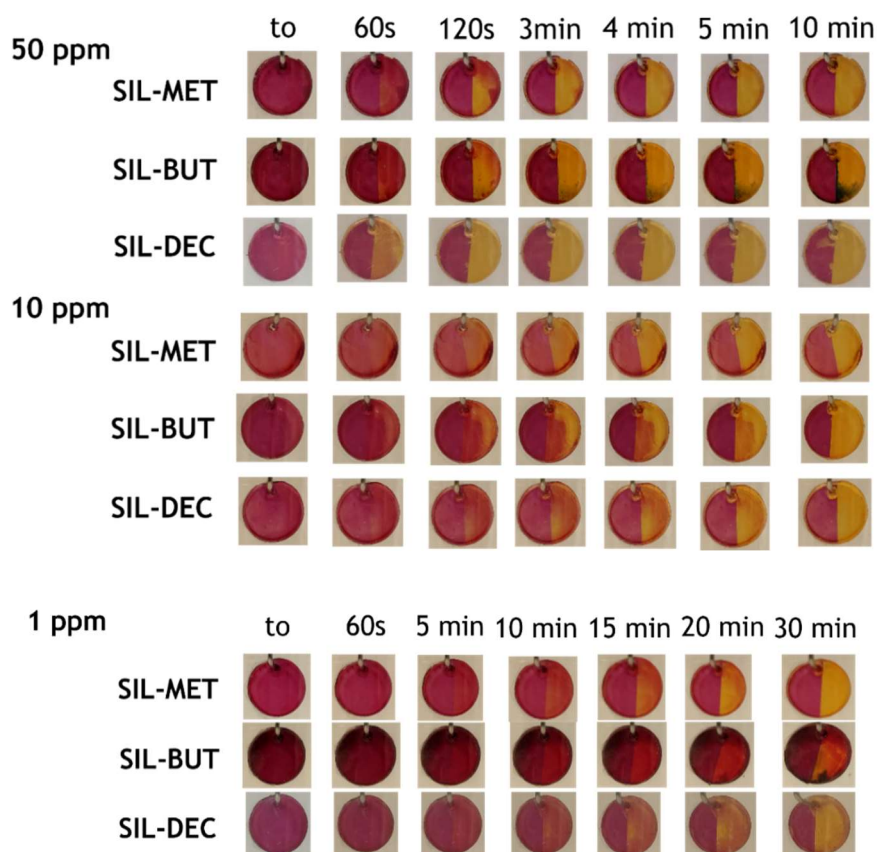


Figura 6.19. Respuesta de SILs con **TB** expuestos a 1, 10 y 50 ppm de NH_3 .

De este modo, se concluye que los discos 3D modificados son sensibles a aminas volátiles y ambas sondas colorimétricas cambian de color en presencia del analito. Además, se puede decir que los sistemas desarrollados puede detectar concentraciones de NH_3 iguales o superiores a 1 ppm.

6.3.2.1 Análisis de cambio de color – Componentes RGB

Una vez demostrado de manera cualitativa que los SILs modificados con sondas colorimétricas son sensibles a la presencia de aminas volátiles, se llevó a cabo un estudio para obtener información cuantitativa en función de la respuesta colorimétrica de los SILs con sondas inmovilizadas. Esto se realizó a partir de las componentes de la intensidad de color de manera análoga a lo presentado en los capítulos anteriores empleando el valor promedio de las componentes RGB. Este valor se estimó mediante la selección de una área representativa de cada imagen y el análisis se realizó por la misma aplicación de JavaScript.

Posteriormente, el análisis cuantitativo^{39,40} o magnitud de cambio de color se calculó a partir de la distancia euclidiana (ΔRGB) entre las intensidades RGB de la muestra y las imágenes de referencia usando la Ecuación 6.1, donde R, G y B presentan las intensidades de color promedio del rojo, verde y azul, respectivamente. Por otro lado, los subíndices “ t_0 ” y “ t ” indican las condiciones iniciales y a diferentes tiempos, respectivamente.

$$\Delta RGB = \sqrt{(R_t - R_{t_0})^2 + (G_t - G_{t_0})^2 + (B_t - B_{t_0})^2}$$

Ecuación 6.1. Fórmula del cálculo de la distancia euclidiana (ΔRGB).

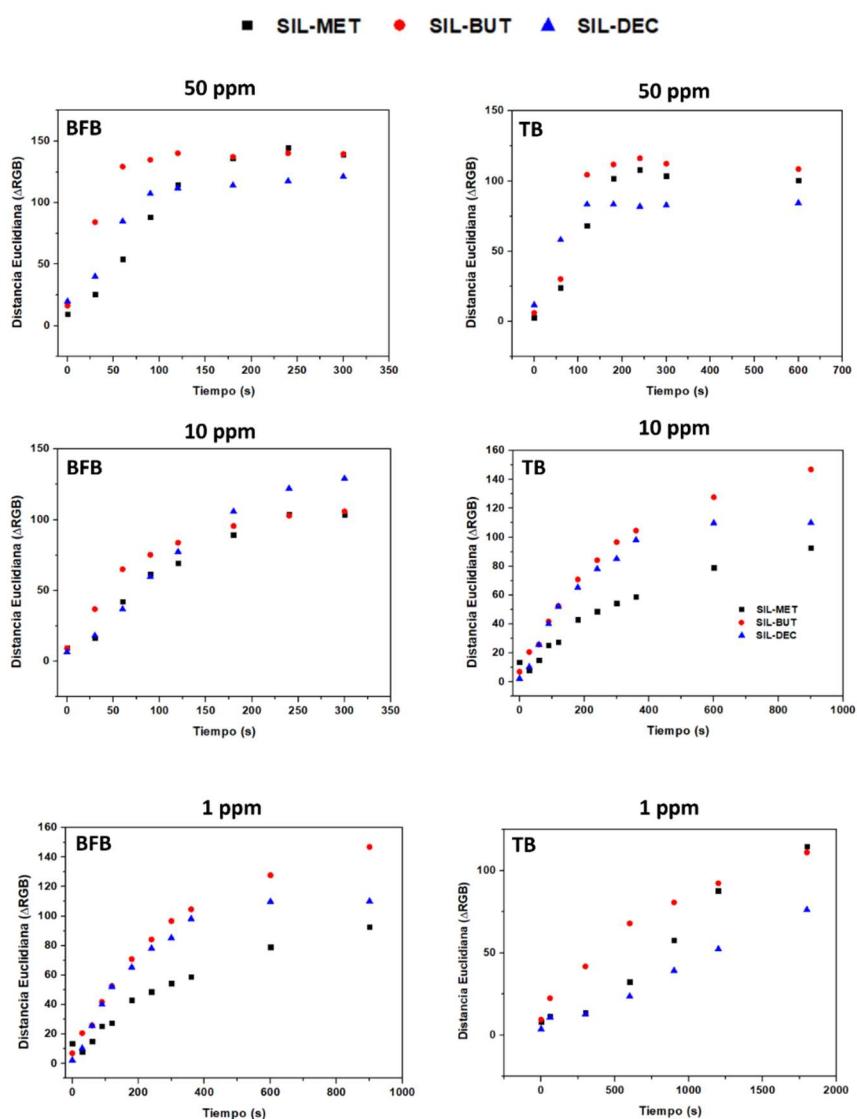


Figura 6.20. Variaciones de la distancia RGB para los SILs con las sondas **BFB** y **TB**.

³⁹ A strip array of colorimetric sensors for visualizing a concentration level of gaseous analytes with basicity. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *251*, 1089-1095.

⁴⁰ Nguyen, T.-T.; Bui, T. H.; Lee, Y.-I. Disposable Colorimetric Paper-Based Probe for the Detection of Amine-Containing Gases in Aquatic Sediments. *ACS Omega* **2019**, *4*, 12665-12670.

Tal y como se observa en la Figura 6.20 para ambas sondas colorimétricas, la velocidad del cambio de color depende de la concentración de aminos volátiles con el siguiente orden: $50 > 10 > 1$ ppm. Como cabría esperar, el cambio de color es más rápido a mayor concentración y el valor de la distancia euclidiana alcanza un plato a un menor tiempo para concentraciones más elevadas de NH_3 (50 ppm). La estabilización de este valor implica que se alcanza la saturación en el cambio de color. Por el contrario, el cambio es más lento y progresivo a menores concentraciones sin observarse la saturación de manera evidente. Por otro lado, no se observa una correlación bien definida asociada al efecto de la cadena alifática que influya en la cinética del cambio de color o difusión de las aminos volátiles al material polimérico impregnado. De este modo, no se aprecia un efecto del tipo de imidazolio y las pequeñas diferencias en los valores de distancia euclidiana se pueden atribuir a errores asociados al cálculo de los valores experimentales.

6.3.2.2 Estudio de respuesta en muestras reales de alimentos envasados

Una vez demostrado el potencial de estos sistemas para la detección colorimétrica de aminos volátiles, se procedió al estudio para evaluar la respuesta y sensibilidad del sistema en presencia de dos tipos de alimentos (bacalao y pollo). En este sentido, se estudió la respuesta con los tres tipos de imidazoles (**SIL-MET**, **SIL-BUT** y **SIL-DEC**) y tres tipos de sonda colorimétricas (**BFB**, **TB** y **RC**). De esta manera, se realizaron nueve pruebas por cada uno de los alimentos. En este caso, se seleccionaron dos productos envasados de una tienda comercial como se ilustra en la Figura 6.21.



Figura 6.21. Muestras de bacalao y pollo como productos envasados comerciales.

Para el estudio de deterioro o degradación, se pesaron 2 gramos del alimento seleccionado y se siguió la misma metodología que se realizó para el estudio de concentración. El disco se introdujo en el vial y se dispuso en la parte superior, se selló y se estudió cómo evolucionó el sistema con el tiempo realizando fotografías.

- Bacalao

En la Figura 6.22 se representa la respuesta del cambio de color para muestras de bacalao que se dejaron a temperatura ambiente y se degradaron con el tiempo debido a la actividad microbiana. Principalmente, se puede afirmar que los SILs detectan las aminas generadas en el proceso de degradación como consecuencia del resultado positivo debido al cambio de color. La transición de color para **BFB** y **TB** se puede apreciar de forma visual a las 24 horas aproximadamente. Sin embargo, **RC** requiere entre 48-72 horas para observar un cambio significativo. Por otro lado, se pueden apreciar diferencias en la cinética de cambio según el tipo de sonda y el tipo de cadena alifática del imidazol. Dicho análisis se comenta en el apartado 6.3.2.3. mediante la interpretación de las gráficas a partir de los valores de la distancia euclidiana.



Figura 6.22. Evolución del cambio de color de los SILs expuestos a muestras de bacalao.

- Pollo

Las muestras de pollo se estudiaron en los mismos intervalos de tiempo que las muestras de bacalao. Los resultados (Figura 6.23) muestran que los sistemas desarrollados son capaces de detectar las aminas generadas en la degradación del alimento a temperatura ambiente. La transición de color para **BFB** y **TB** se observa de forma visual a las 48 horas aproximadamente. Sin embargo, **RC** requiere un mayor intervalo de tiempo, a partir de 72 horas, para observar visualmente un cambio significativo de color. Estos resultados

sugieren que el pollo genera, para el mismo intervalo de tiempo, niveles inferiores de aminas biogénicas volátiles o se degrada más lentamente en comparación con el bacalao.



Figura 6.23. Evolución del cambio de color de los SILs expuestos a muestras de pollo.

Además, se puede apreciar una cinética de cambio diferente según el tipo de sonda y el tipo de cadena alifática del imidazolio empleado. Estos resultados, para el análisis de la degradación tanto del bacalao como del pollo, permiten confirmar que los discos 3D modificados con unidades de líquido iónico y una sonda colorimétrica tienen potencial para ser empleados como materiales inteligentes para monitorizar la degradación de alimentos envasados.

6.3.2.3 Análisis de cambio de color – Productos envasados

Una vez realizado el estudio cualitativo, se procedió a realizar un análisis de las componentes de color RGB para las pruebas realizadas con los productos de origen pesquero (bacalao) y cárnico (pollo). Los resultados se muestran en la Figura 6.24.

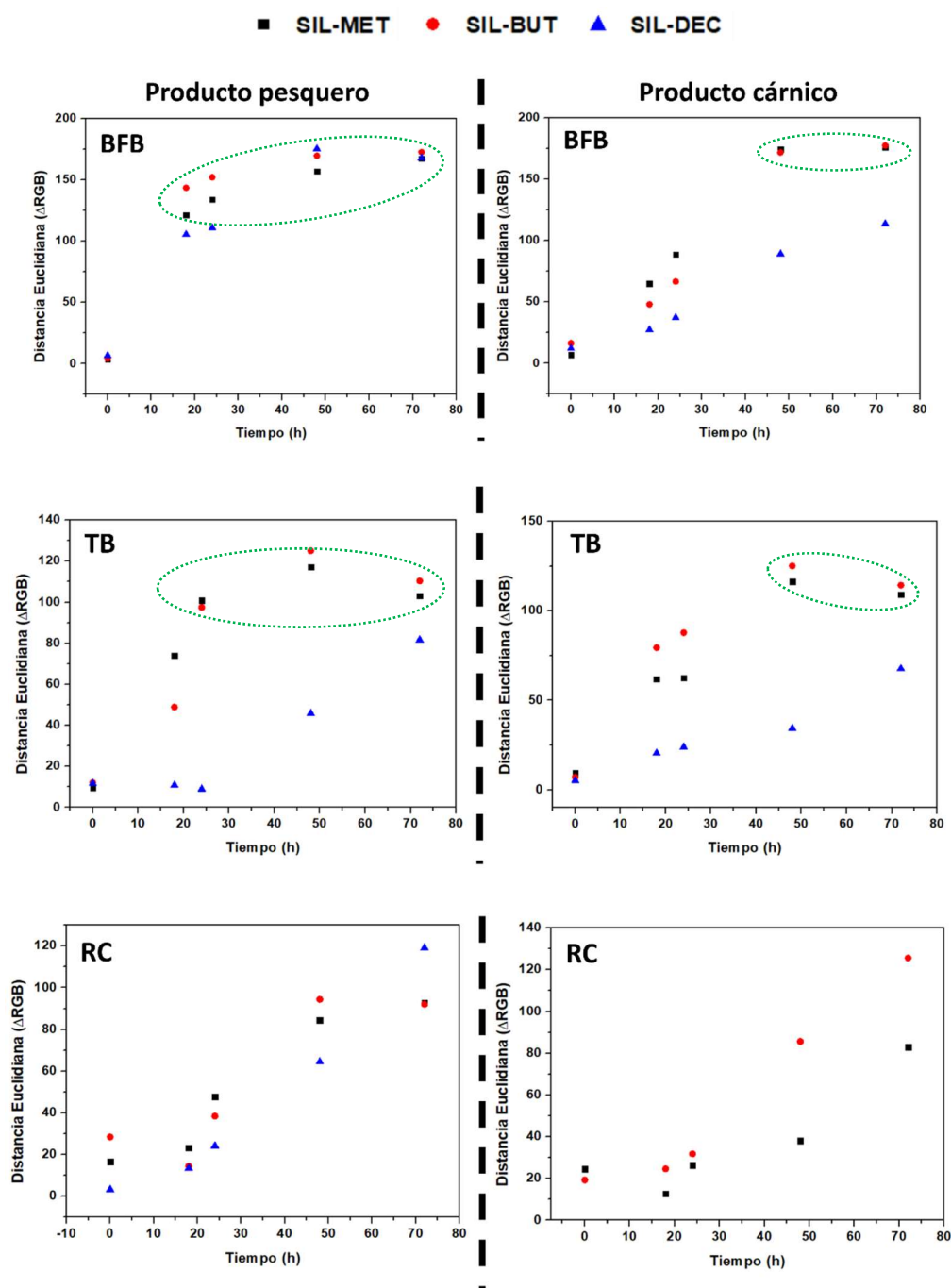
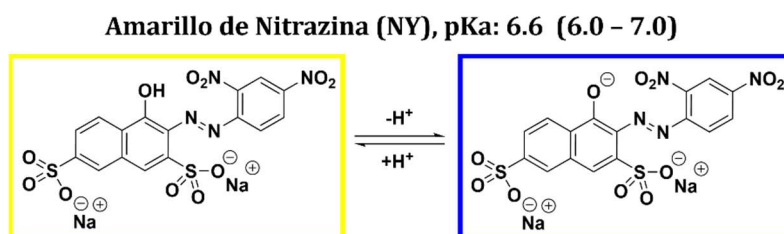


Figura 6.24. Variaciones de la distancia RGB para los SILs con las sondas **BFB**, **TB** y **RC** en pruebas de campo con productos envasados.

Los resultados muestran que las sondas **BFB** y **TB** alcanzan valores de distancia euclidiana entre 125-150 y 100-125, los cuales reflejan la saturación en el cambio de color para cada sonda, respectivamente. La estabilización de estos valores se produce a partir de las 24 horas para el producto de origen pesquero y a partir de las 48 horas para el producto de origen cárnico. Por el contrario, las gráficas correspondientes a la sonda **RC** presentan un aumento de la distancia euclidiana con el tiempo que supone la generación de aminas

volátiles con el tiempo. Sin embargo, no se aprecia que el valor se vuelva constante en el tiempo estudiado y esto podría explicarse por el intervalo de pH donde se produce el viraje, ya que **RC** presenta un viraje colorimétrico en un rango de pH superior en comparación con **BFB** y **TB**. Finalmente, la comparación del tipo de imidazol muestra diferencias de **SIL-MET** y **SIL-BUT** respecto de **SIL-DEC**, el cual muestra una cinética más lenta respecto de la transición cromática. Este efecto podría deberse a la peor difusión de las aminas volátiles en presencia de vapor de agua y la mayor naturaleza hidrofóbica del imidazol con una larga cadena alifática. En resumen, estos resultados son representativos de la observación visual del cambio de color y el deterioro del producto genera una concentración de aminas volátiles detectables con los materiales inteligentes preparados mediante la inmovilización por intercambio iónico de diferentes sondas colorimétricas.

A la vista de los resultados observados y la posible influencia del viraje colorimétrico en el cambio de color con el tiempo, se decidió evaluar la respuesta de los alimentos envasados con una sonda colorimétrica que presentase un viraje colorimétrico en un rango de pH superior en comparación con las sondas estudiadas. El amarillo de nitrazina (**NY**) se seleccionó como indicador de pH que cambia de color amarillo a azul en un rango de pH de 6.0-7.0, tal y como se detalla en el Esquema 6.6.



Esquema 6.6. Estructuras y cambios de color asociados a las formas químicas del **NY**.

La inmovilización de **NY** se llevó a cabo mediante la metodología utilizada para las otras sondas colorimétricas en dos tipos de SILs (**SIL-MET** y **SIL-DEC**). Posteriormente, se procedió a la evaluación de la respuesta en los alimentos (pollo y bacalao) estudiados previamente con las otras sondas. Los resultados del deterioro de bacalao mostraron que la transición de color para **NY** se observa de forma visual entre 48-72 horas aproximadamente, mientras que las otras sondas presentaban la transición entre 24-48 horas. Por otro lado, los resultados del deterioro de pollo mostraron una tendencia similar, ya que la transición para las otras sondas se produjo entre 48-72 horas y, en cambio, **NY** mostró cambios de color a partir de los 5 días. Como cabría esperar, la sonda colorimétrica **NY** presenta una cinética más lenta debido a que el viraje se encuentra en un rango de pH superior en

comparación con las otras sondas. Además, estos resultados muestran que el pollo genera, para el mismo intervalo de tiempo, niveles inferiores de aminas biogénicas volátiles y la cinética de cambio de color presenta diferencias según el tipo de imidazol (**SIL-MET** > **SIL-DEC**), tal y como se observa en la Figura 6.25, un comportamiento que ya se había comentado con relación a los resultados experimentales del apartado 6.3.2.2.



Figura 6.25. Evolución del cambio de color de la sonda **NY** inmovilizada en SILs para muestras de bacalao y pollo.

La Figura 6.26 representa la comparación de la respuesta de las sondas **BFB** y **NY** (inmovilizadas en **SIL-MET**) en términos de la distancia euclidiana para el deterioro de los alimentos. Como cabría esperar, la saturación de la sonda **BFB** requiere un período de tiempo inferior (2 días) en comparación con la sonda **NY** (3-5 días para pollo y 3 días para bacalao) debido al diferente intervalo de pH donde se produce el viraje colorimétrico.

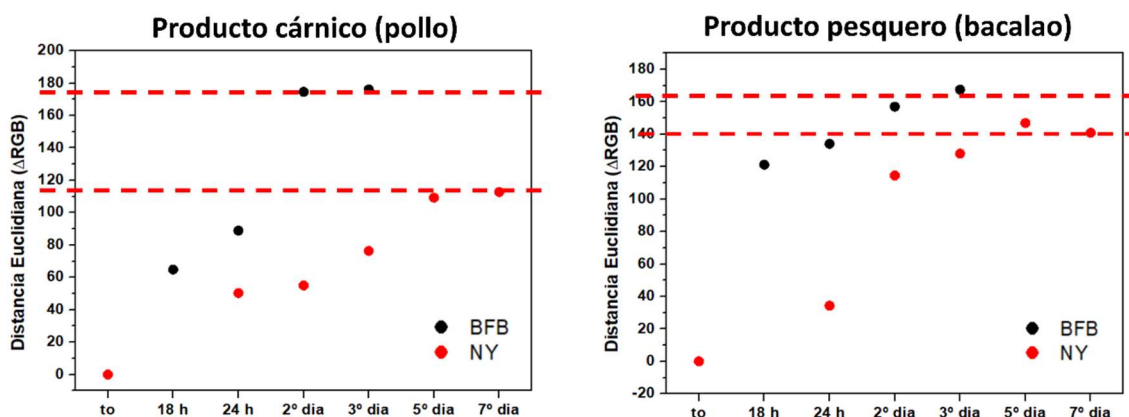


Figura 6.26. Evolución de la distancia euclidiana (ΔRGB) con el tiempo para las sondas **BFB** y **NY** inmovilizadas en **SIL-MET** en muestras de pollo y bacalao.

De este modo, una aproximación para la utilización del sistema inteligente sería la combinación de un código de etiquetas que estableciese unas recomendaciones en función del cambio colorimétrico. En este caso, el diseño se plantea con la utilización de las sondas **BFB** y **NY**, tal y como se representa en la Figura 6.27. Así, por ejemplo, se podrían tener 3 condiciones que representasen el estado del alimento: Buen estado (representado por el color verde) en un período hasta 24 horas (**BFB** y **NY** no cambian de color y la respuesta es negativa), precaución respecto del consumo (color amarillo) en el período de 48 horas aproximadamente (**BFB** cambia de color y la respuesta es positiva y **NY** no cambia de color y la respuesta es negativa) y, finalmente, un mal estado del alimento (color rojo) no apto para el consumo (ambas sondas cambian de color y la respuesta es positiva).

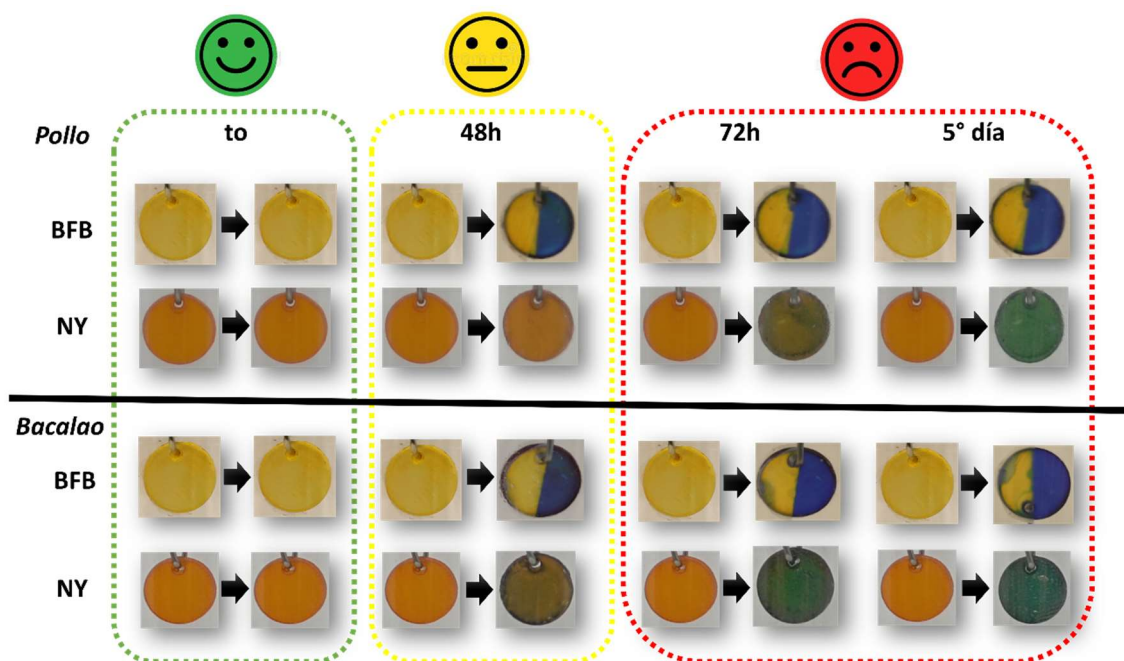


Figura 6.27. Código de respuesta de los SILs con **BFB** y **NY** en tres situaciones del estado del alimento: Buen estado (verde), precaución (amarillo) y mal estado (rojo).

6.3.3 Material inteligente 3D – Inmovilización covalente

En el primer apartado de este capítulo se ha reportado la inmovilización de sondas colorimétricas preparando diferentes líquidos iónicos soportados en los discos poliméricos impresos por 3D. La presencia de estas unidades permite una adsorción iónica sencilla de sonda para dar lugar al correspondiente material inteligente. Como se ha mencionado con anterioridad, una aproximación alternativa, que en este caso no incluye la presencia de unidades de líquido iónico, se basa en la funcionalización covalente de los discos poliméricos impresos por 3D directamente con sondas colorimétricas. Mediante esta metodología se elimina la probabilidad de lixiviación del indicador de pH, pudiendo dar

lugar a la obtención de materiales inteligentes más prácticos y con una vida útil más duradera.⁴¹ Sin embargo, este método presenta limitaciones de aplicabilidad debido a que este tipo de inmovilización solo puede ser usada con determinados indicadores de pH. Además, la inmovilización covalente es relativamente complicada y presenta desventajas tales como elevado coste, reacciones de varias etapas, procedimientos complicados de preparación o mala reproducibilidad.⁴²

La bibliografía recoge diferentes estrategias de inmovilización de sondas colorimétricas (ver Figura 6.28) basadas en la activación con NHS de celulosa modificada y el acoplamiento con grupos amina⁴³ (NR) y ácido carboxílico⁴¹ (BCP) o la apertura de grupos epóxido (MR,⁴⁴ NY,⁴⁵ RC,⁵⁰ AO7,⁴⁶ RB, MO,⁴⁷ y RB⁴⁸). Del mismo modo, se encuentran algunos ejemplos de sondas fluorescentes inmovilizadas covalentemente por método sol-gel.⁴⁹ Estos métodos presentan limitaciones de aplicabilidad debido a que este tipo de inmovilización solo puede ser usada con determinados indicadores, que presenten una funcionalización adecuada para su inmovilización.⁵⁰

⁴¹ Khanjanzadeh, H.; Park, B.-D. Covalent immobilization of bromocresol purple on cellulose nanocrystals for use in pH-responsive indicator films. *Carbohydrate Polymers* **2021**, *273*, 118550.

⁴² Zhou, J.; Jiang, B.; Gao, C.; Zhu, K.; Xu, W.; Song, D. Stable, reusable, and rapid response smart pH-responsive cotton fabric based on covalently immobilized with naphthalimide-rhodamine probe. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2022**, *355*, 131310.

⁴³ Khanjanzadeh, H.; Park, B.-D.; Pirayesh, H. Intelligent pH- and ammonia-sensitive indicator films using neutral red immobilized onto cellulose nanofibrils. *Carbohydrate Polymers* **2022**, *296*, 119910.

⁴⁴ Van der Schueren, L.; De Clerck, K.; Brancatelli, G.; Rosace, G.; Van Damme, E.; De Vos, W. Novel cellulose and polyamide halochromic textile sensors based on the encapsulation of Methyl Red into a sol-gel matrix. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, *162* (1), 27-34.

⁴⁵ Guido, E.; Colleoni, C.; De Clerck, K.; Plutino, M. R.; Rosace, G. Influence of catalyst in the synthesis of a cellulose-based sensor: Kinetic study of 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane epoxy ring opening by Lewis acid. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *203*, 213-222.

⁴⁶ Heydari, R.; Hosseini, M.; Amraei, A.; Mohammadzadeh, A. Preparation of a novel pH optical sensor using orange (II) based on agarose membrane as support. *Materials Science and Engineering: C* **2016**, *61*, 333-337.

⁴⁷ Ghosh, S.; Dey, C. K. Epoxy-based polymer bearing activated azo dye (methyl orange) units: novel colorimetric indicator for amines. *Supramolecular Chemistry* **2009**, *21* (7), 591-596.

⁴⁸ Zhou, J.; Jiang, B.; Gao, C.; Zhu, K.; Xu, W.; Song, D. Stable, reusable, and rapid response smart pH-responsive cotton fabric based on covalently immobilized with naphthalimide-rhodamine probe. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2022**, *355*, 131310.

⁴⁹ Ma, Q.-J.; Li, H.-P.; Yang, F.; Zhang, J.; Wu, X.-F.; Bai, Y.; Li, X.-F. A fluorescent sensor for low pH values based on a covalently immobilized rhodamine-naphthalimide conjugate. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, *166-167*, 68-74.

⁵⁰ Salmani G.K, M.; Rounaghi, G. H.; Chamsaz, M. An optical sensor for determination of low pH values based on covalent immobilization of Congo red on triacetyl cellulose films via epichlorohydrin. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *254*, 177-181.

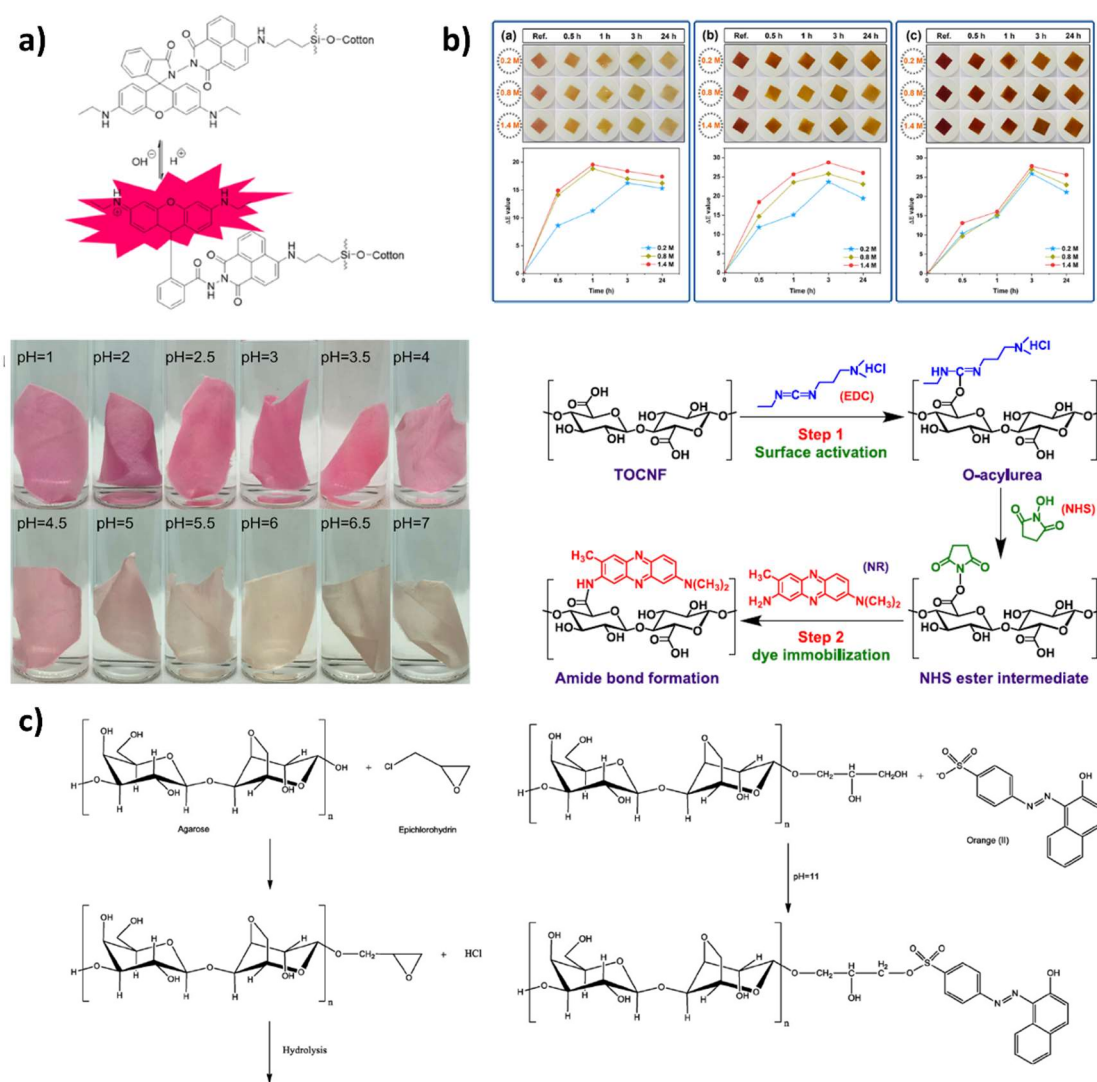


Figura 6.28. (a) Inmovilización de RB y cambios de color asociados al pH, (b) Acoplamiento de NR y cambios de color con la exposición al vapor de aminas y (c) Mecanismo de activación y acoplamiento para AO7 (tomado de ref. 42, 43 y 46, respectivamente).

En vista de estos antecedentes y con el fin de comparar ambas metodologías, se llevó a cabo un estudio para conseguir la inmovilización covalente de una sonda colorimétrica sensible al pH. La aproximación de este estudio está basada en la apertura del grupo epóxido de los discos obtenidos por impresión 3D que permiten la funcionalización covalente e inmovilización de una molécula orgánica sensible al pH. El amarillo de nitrazina (NY) fue seleccionado como indicador de pH tipo azo para ser inmovilizado covalentemente⁵¹ en el desarrollo de otro tipo de material inteligente y poder comparar con la misma sonda inmovilizada en los SILs como se ha detallado en el apartado anterior. La bibliografía

⁵¹ Van der Schueren, L.; Hemelsoet, K.; Van Speybroeck, V.; De Clerck, K. The influence of a polyamide matrix on the halochromic behaviour of the pH-sensitive azo dye Nitrazine Yellow. *Dyes and Pigments* **2012**, *94* (3), 443-451.

reporta que $\text{BF}_3(\text{OEt})_2$ se ha utilizado como catalizador ácido de Lewis para la apertura del anillo epóxido en la inmovilización de sondas sensibles al pH.^{45,52,53} Así, se procedió a la inmovilización covalente de **NY** mediante el ataque nucleofílico del grupo sulfonato en la apertura del anillo epóxido presente en los discos obtenidos por 3D. Tal y como se ilustra en la Figura 6.29, la metodología consiste en introducir los discos de impresión 3D en una disolución acuosa de 0.1 mg/mL de **NY** al 50% v/v de $\text{BF}_3(\text{OEt})_2$ comercial en agitación constante a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, los discos se extrajeron de la disolución y se lavaron en agua y MeOH, respectivamente.

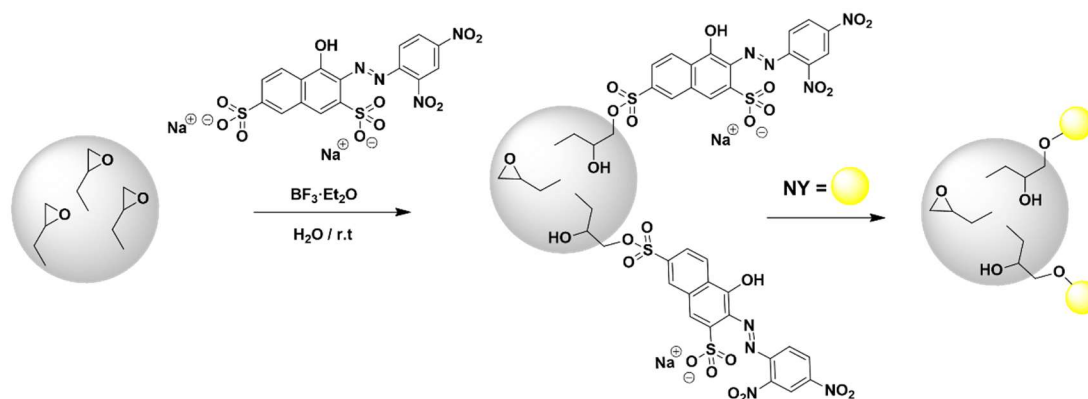


Figura 6.29. Funcionalización covalente del **NY** sobre los discos obtenidos por impresión 3D.

6.3.3.1 Caracterización de discos 3D modificados mediante FT-IR-ATR y Raman

La funcionalización de los discos con la **NY** se puede observar de manera cualitativa por la coloración de los discos. Además, se llevaron a cabo estudios de espectroscopia por FT-IR-ATR y Raman para monitorizar el grado de funcionalización.

⁵² Innocenzi, P.; Brusatin, G.; Guglielmi, M.; Bertani, R. New Synthetic Route to (3-Glycidoxypropyl)trimethoxysilane-Based Hybrid Organic-Inorganic Materials. *Chemistry of Materials* **1999**, *11* (7), 1672-1679.

⁵³ Trovato, V.; Vitale, A.; Bongiovanni, R.; Ferri, A.; Rosace, G.; Plutino, M. R. Development of a Nitrazine Yellow-glycidyl methacrylate coating onto cotton fabric through thermal-induced radical polymerization reactions: a simple approach towards wearable pH sensors applications. *Cellulose* **2021**, *28* (6), 3847-3868.

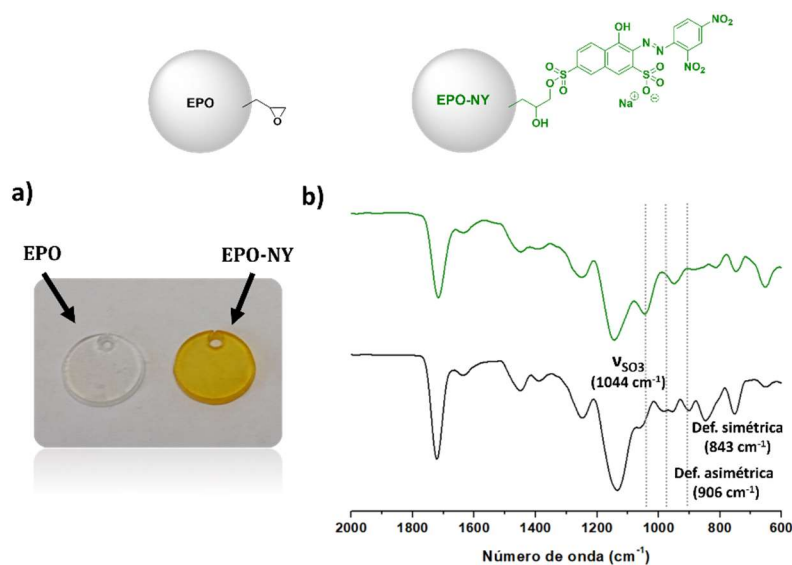
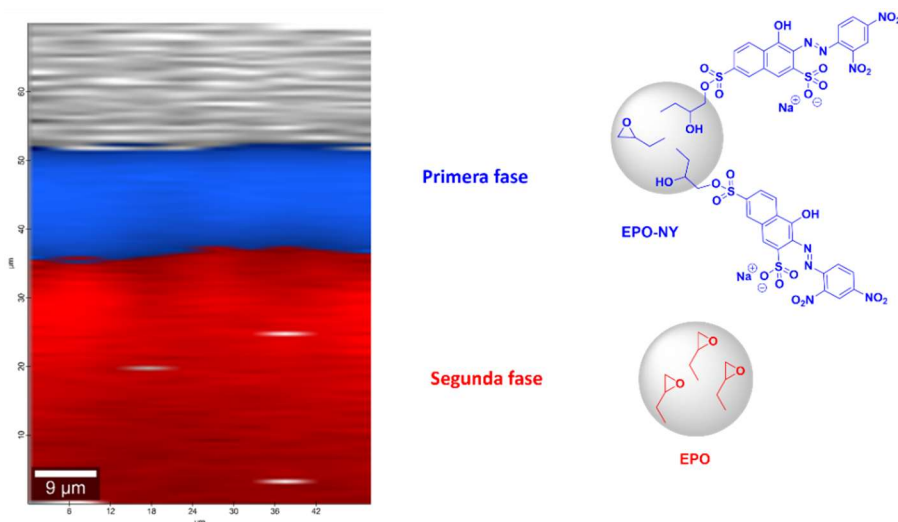


Figura 6.30. (a) Comparación de disco sin modificación covalente (**EPO**) y disco modificado con la sonda **NY** inmovilizada covalentemente y (b) Espectros IR correspondientes a **EPO** (línea negra) y **EPO-NY** (línea verde) en la región de 2000–600 cm^{-1} .

La Figura 6.30 muestra como observación visual que la funcionalización covalente se produce, ya que el disco tomó coloración amarilla y la forma inmovilizada de **NY** corresponde a la forma ácida de la sonda colorimétrica. Para confirmar la funcionalización exitosa del material con **NY** a través de la apertura del anillo de epóxido, los espectros de IR del material sin modificar y el sometido al proceso de post-modificación covalente se compararon y se confirmó la funcionalización por la aparición y desaparición de determinadas señales características. Tal y como se ilustra en la Figura 6.30, se aprecia la desaparición parcial de señales asociadas a la deformación simétrica y asimétrica del anillo de epóxido (843 y 906 cm^{-1} , respectivamente). Por otro lado, se puede identificar a 1044 cm^{-1} una señal correspondiente a la sonda colorimétrica funcionalizada y esta señal corresponde al estiramiento simétrico y asimétrico del grupo SO_3 .

a)



b)

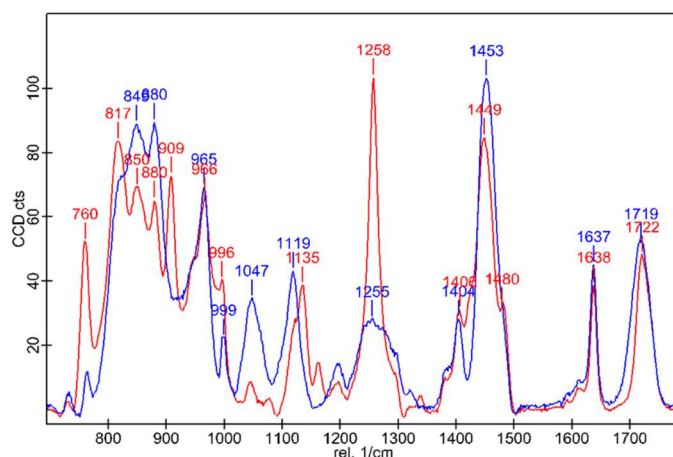


Figura 6.31. Estudio de microscopía confocal Raman de discos **EPO** y **EPO-NY** (longitud de onda de excitación: 785 nm, potencia del láser: 2.9 mW, aumento objetivo: 50x). (a) Mapeo para la profundidad inicial de 100 mm del disco: la región negra corresponde al aire, la región azul corresponde a la modificación superficial con unidades del indicador de pH, la región roja corresponde a la región epoxi sin modificar y (b) Espectros Raman correspondientes a las regiones azul (**EPO-NY**) y roja (**EPO**).

Para identificar la extensión de la modificación tanto de la superficie como de las capas internas, se realizó análisis de microscopía confocal Raman de las muestras. La Figura 6.31 muestra el mapeo obtenido para el disco **EPO** y el material modificado covalentemente con la sonda seleccionada (**EPO-NY**). El análisis de Raman revela la presencia de dos componentes en toda la profundidad evaluada. La segunda fase (rojo) corresponde a la resina epoxi, con bandas a 1722 cm^{-1} (C=O) y 1638 cm^{-1} (C=C) característicos del grupo éster y doble enlace de los monómeros acrílicos, respectivamente. Por otro lado, hay bandas de

absorción a 1258 cm^{-1} y 909 cm^{-1} asignables a los grupos epóxido (estiramiento asimétrico y simétrico, respectivamente).⁵⁴ Sin embargo, el análisis de la primera fase (azul) muestra claramente la presencia de otra componente diferente, que se encuentra en una fina capa superficial de $15\ \mu\text{m}$ de profundidad aproximadamente, revela: i) una disminución notable de la intensidad de las bandas asignables al grupo epóxido a 1261 cm^{-1} y 911 cm^{-1} , que corresponden a $\nu(\text{C-O-C})$ simétrico y la deformación asimétrica del anillo y ii) la aparición de nuevas bandas a 1119 cm^{-1} (C-H y C-N, en flexión plana del anillo de naftaleno) y 1047 cm^{-1} (deformación del anillo de naftaleno junto con estiramiento asimétrico y simétrico, SO_3).⁵⁵ Esto indica que en la primera fase se produjo la apertura de los grupos epóxido con la formación del enlace covalente con el compuesto azo.

6.3.3.2 Análisis de cambio de color – Componentes RGB

La respuesta colorimétrica de los discos (**EPO-NY**) con la sonda inmovilizada covalentemente se estudió y cuantificó a partir de la intensidad de las componentes de color (ΔRGB) como respuesta a la concentración de aminas volátiles. Para medir la respuesta y la sensibilidad del material inteligente se siguió la metodología descrita en la sección 6.3.2 y la Figura 6.16. El estudio se realizó en el rango de concentración de 10 a 100 ppm de NH_3 . De igual modo, el valor promedio de las componentes RGB se estimó mediante la selección de un área representativa de cada imagen y el análisis mediante la aplicación JavaScript. Posteriormente, el análisis cuantitativo de cambio de color se calculó a partir de la Ecuación 6.1 de la sección 6.3.2.

La Figura 6.32 representa los resultados experimentales de la exposición del sistema inteligente a diferentes concentraciones de aminas volátiles (NH_3). La sonda **NY** cambia de amarillo a azul cuando el pH aumenta, dando una respuesta positiva que se produce como consecuencia de la generación *in situ* de aminas volátiles. Como cabría esperar, el cambio de color es más rápido a mayor concentración y el sistema alcanza la saturación del cambio de color a un tiempo menor. El cambio de color se comienza a apreciar entre 20 y 30 minutos para concentraciones superiores a 50 ppm, mientras que para concentraciones inferiores se aprecia en intervalos de tiempo superiores a 60 minutos.

⁵⁴ Caldara, M.; Colleoni, C.; Guido, E.; Re, V.; Rosace, G. Development of a textile-optoelectronic pH meter based on hybrid xerogel doped with Methyl Red. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, *171-172*, 1013-1021.

⁵⁵ Snehalatha, M.; Ravikumar, C.; Sekar, N.; Jayakumar, V. S.; Joe, I. H. FT-Raman, IR and UV-visible spectral investigations and ab initio computations of a nonlinear food dye amaranth. *Journal of Raman Spectroscopy* **2008**, *39* (7), 928-936.

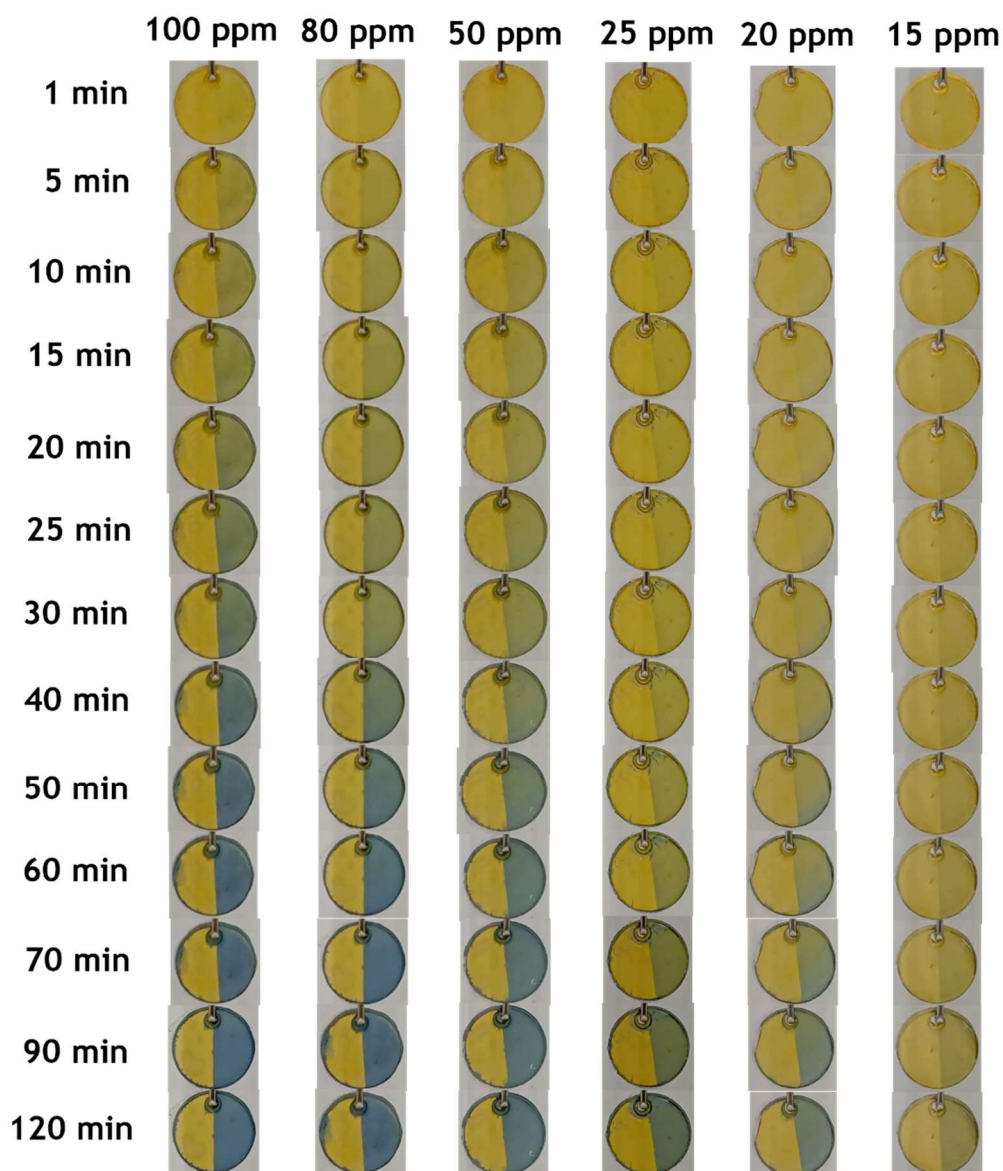


Figura 6.32. Respuesta de **EPO-NY** en el rango de 10 -100 ppm de NH_3 .

Los resultados del equilibrio muestran una respuesta colorimétrica diferente dependiendo de la concentración y se requieren tiempos de exposición más prolongados (120 minutos) en comparación con las sondas inmovilizadas en SILs por intercambio aniónico. Por otro lado, la respuesta colorimétrica es visualmente detectable hasta una concentración de 15 ppm. El estudio de la evolución del sistema para una concentración de 10 ppm no muestra cambios de transición colorimétrica. De este modo, se puede decir que el sistema presenta un LOD o límite de detección de 15 ppm. Es decir, este sistema presenta una menor sensibilidad que las sondas inmovilizadas en SILs.

Tal y como se observa en la Figura 6.33, el análisis cuantitativo mediante las componentes RGB representa la respuesta análoga a la observada visualmente. En este contexto, una

concentración superior implica un valor más grande para la distancia euclidiana, lo que supone una mayor variación en el color. Por otro lado, la saturación de color se aprecia con claridad a partir de 50 ppm, ya que el valor de distancia euclidiana se vuelve constante y alcanza el estado estacionario. Por el contrario, el color varía gradualmente y más lentamente a concentraciones inferiores a 25 ppm y la transición de color de amarillo a azul no es completa.

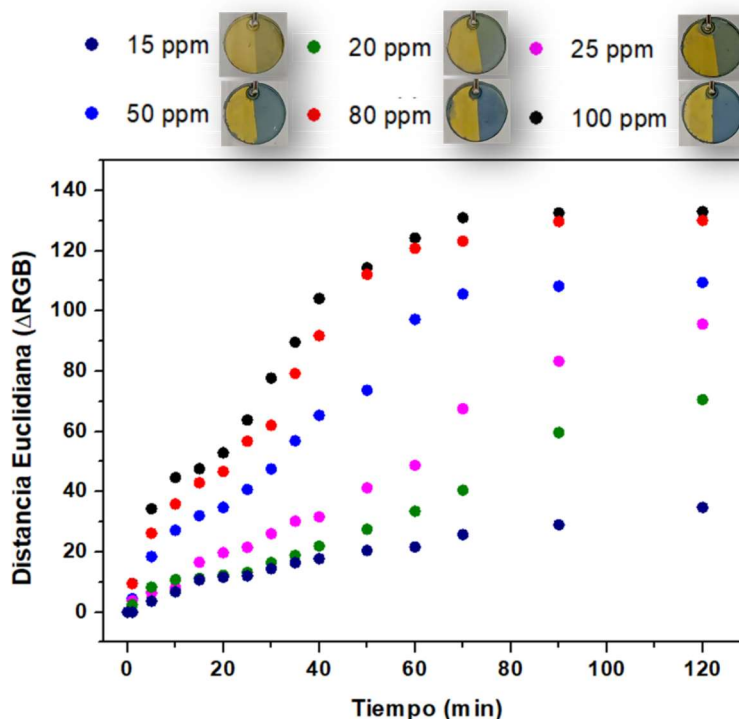


Figura 6.33. Variaciones de la distancia RGB para el sensor colorimétrico impregnado de colorante a lo largo del tiempo en el rango de 15 a 100 ppm de NH_3 .

Así, tomando los valores de este parámetro a los 120 minutos se puede obtener, tal y como se muestra en la Figura 6.34, una curva de calibración para la detección de NH_3 . Esta curva muestra una tendencia exponencial a la saturación, en la región superior a 25 ppm correspondiente al nivel de meseta, pero para el rango de 5 a 25 ppm muestra una variación significativa. En este sentido, si el valor de distancia euclidiana es superior a 100, solo se puede establecer que la concentración es superior a 25 ppm y no se puede especificar cuantitativamente la concentración exacta. Del mismo modo, si se representan los valores entre el rango de 5 y 25 ppm, se puede establecer una relación lineal entre la distancia euclidiana y la concentración de NH_3 , tal y como se representa en la Figura 6.34.

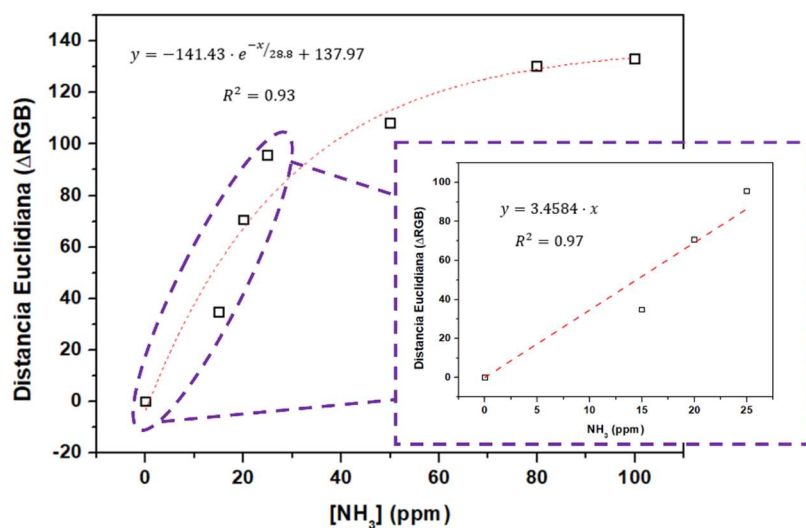


Figura 6.34. Representación exponencial de ΔRGB vs $[NH_3]$ (ppm) a 120 min y regresión lineal de ΔRGB vs $[NH_3]$ (ppm) a 15 min hasta 25 ppm.

6.3.3.3 Estudio de respuesta en muestras reales de alimentos envasados

El estudio en muestras reales se llevó a cabo mediante el análisis de los mismos tipos de alimentos para evaluar la respuesta y sensibilidad del sistema: producto pesquero (bacalao) y producto cárnico (pollo). En este sentido, se estudió la respuesta del sistema (**EPO-NY**) para evaluar el deterioro del alimento. Como se realizó con los SILs con sonda inmovilizada, se pesaron 2 gramos del alimento seleccionado y se siguió la misma metodología. El disco se introdujo en el vial y se dispuso en la parte superior, se selló y se estudió cómo evolucionó el sistema con el tiempo realizando fotografías.

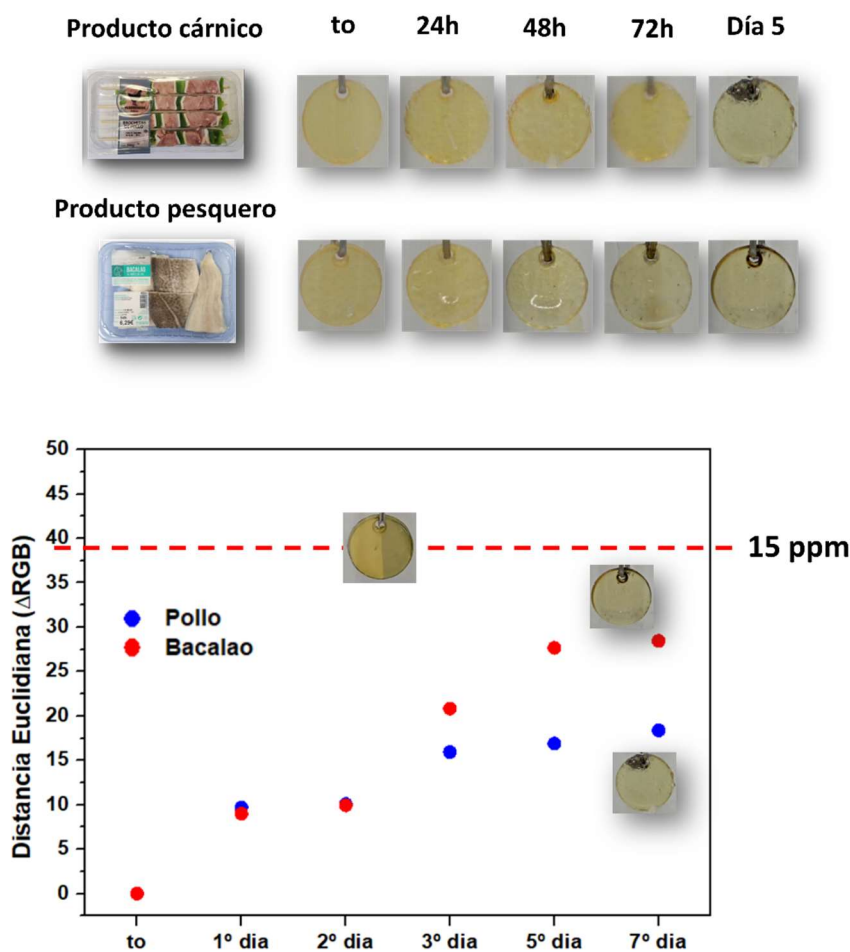


Figura 6.35. Evolución del cambio de color para muestras de bacalao y pollo con **EPO-NY** y representación de la distancia euclidiana (ΔRGB).

La Figura 6.35. muestra el cambio de color para las muestras de producto cárnico y producto pesquero con el tiempo. Los resultados experimentales muestran que no se aprecia un cambio significativo a la detección visual en un período de estudio de 5 días a temperatura ambiente. Sin embargo, el deterioro de los alimentos era evidente por el estado de descomposición y el olor putrefacto desprendido por los alimentos. Además, a partir del cálculo de las componentes RGB, se puede observar que los valores de la distancia euclidiana obtenidos mediante la detección del sistema se encontrarían por debajo de una concentración de 15 ppm según el estudio de concentración presentado en el apartado posterior.

6.3.3.4 Comparación de la inmovilización covalente y la inmovilización en SILs

La comparación de las metodologías de inmovilización de sondas colorimétricas se realizó a partir de los resultados experimentales obtenidos para la sonda colorimétrica amarillo de nitrozina (**NY**). Tal y como se observa en la Figura 6.36, la intensidad de la coloración del

disco modificado muestra que la inmovilización de la sonda colorimétrica es más eficiente en la metodología de intercambio iónico mediante el empleo de SILs, ya que incluso el disco toma una coloración anaranjada debido a la posible saturación de color por una mayor cantidad de sonda inmovilizada. Por otro lado, la respuesta colorimétrica de la sonda inmovilizada en el deterioro de alimentos presenta mejores resultados en el caso de los SILs, ya que se aprecia un cambio de color con el tiempo como consecuencia de la generación de aminas biogénicas en el proceso de descomposición y, por el contrario, el material con la sonda inmovilizada covalentemente no muestra respuesta en los mismos períodos de tiempo considerados. Este resultado observado podría tener relación con la naturaleza hidrofóbica/hidrofílica de la superficie del material, ya que los SILs presentan una naturaleza más hidrofílica y compatible con la matriz de estudio rica en contenido de agua. De este modo, la difusión del analito de interés en presencia de vapor de agua se produce con mayor facilidad en los SILs.

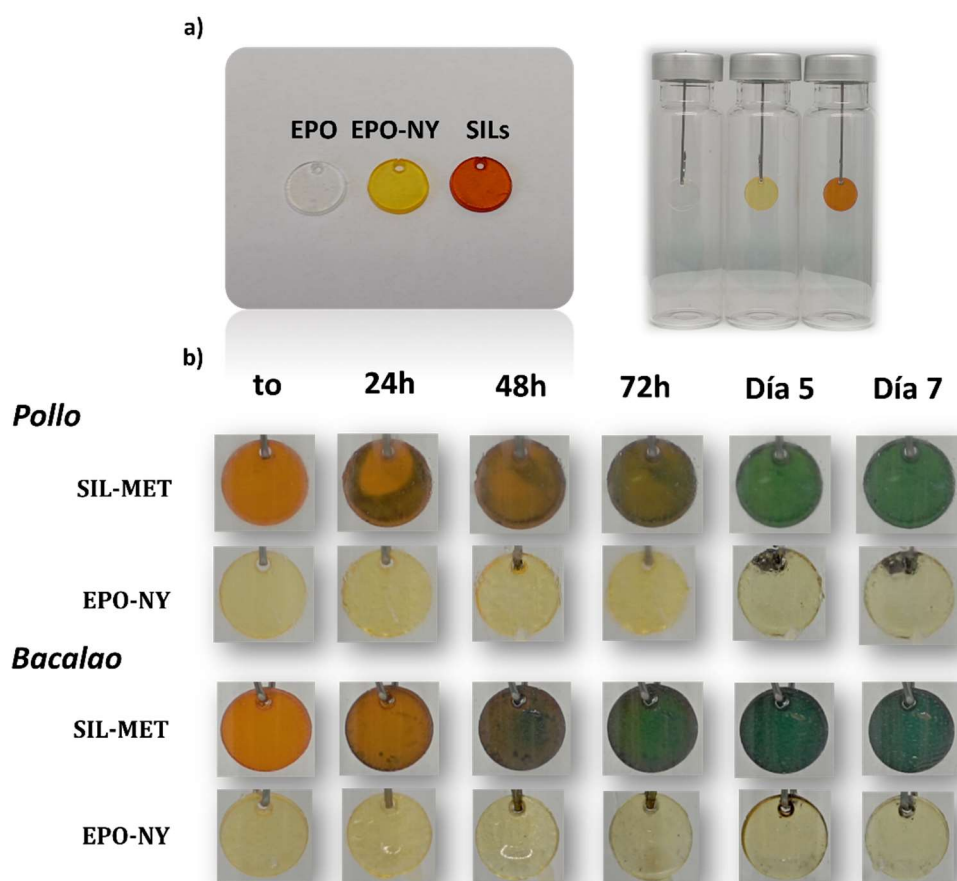


Figura 6.36. (a) Coloración de los discos en la inmovilización de la sonda colorimétrica **NY** y (b) comparación de la evolución colorimétrica de **NY** en los dos tipos de inmovilización para pollo y bacalao.

6.3.4 Conclusiones

Por último, se recogen y presentan las principales conclusiones extraídas del presente capítulo.

- Se ha abordado una metodología sencilla para la preparación de materiales avanzados por impresión 3D mediante la optimización de una formulación monomérica funcional que contenga GMA como componente elemental.
- La preparación de SILs se ha llevado a cabo mediante la estrategia de post-funcionalización del material impreso por 3D para generar líquidos iónicos soportado a partir de la apertura del grupo funcional epóxido.
- La apertura del grupo epóxido para la preparación de SILs se ha estudiado mediante diferentes técnicas espectroscópicas como FT-IR-ATR y Raman.
- Se ha desarrollado una metodología sencilla para el diseño de sistemas inteligentes de respuesta colorimétrica, la cual está basada en una primera etapa de inmovilización por intercambio iónico de sondas sensibles al pH y una segunda etapa de acidificación de la sonda seleccionada.
- Se ha investigado la influencia crítica de la naturaleza hidrofílica/hidrofóbica del disolvente y del material empleado en las etapas de inmovilización y acidificación de las sondas colorimétricas.
- Se demuestra que el material inteligente es sensible a la concentración de gas amoníaco y permite la detección de concentraciones de hasta 1 ppm mediante detección visual.
- Se ha investigado que la cinética de la respuesta colorimétrica del material inteligente depende tanto la naturaleza hidrofílica/hidrofóbica del imidazolio como del intervalo de pH donde se produce el viraje colorimétrico.

- Se ha empleado un modelo matemático basado en las componentes RGB del color para evaluar la respuesta colorimétrica del sistema inteligente sensible a la generación de aminos volátiles.
- Los sistemas inteligentes colorimétricos muestran respuesta en muestras reales de alimentos envasados y son sensibles a la detección del deterioro de alimentos como pollo y bacalao en la generación de aminos biogénicos.
- Los sistemas inteligentes colorimétricos se muestran como una potencial aproximación para el desarrollo de códigos colorimétricos que informen sobre el estado de los alimentos y su posible consumo mediante la combinación de diferentes sondas colorimétricas.
- La funcionalización covalente del material polimérico con una sonda colorimétrica se ha estudiado mediante diferentes técnicas espectroscópicas como FT-IR-ATR y Raman.
- Se han evaluado dos estrategias diferentes de inmovilización observándose que la aproximación de los SILs en comparación con la funcionalización covalente se realiza mediante una preparación sencilla, la inmovilización de sonda es más efectiva y el sistema muestra una respuesta sensible y detectable de la degradación de los alimentos en muestras reales. Además, esta estrategia no presenta tantas limitaciones y puede ser usada con una gama más amplia de sondas colorimétricas.
- En este contexto, se ha demostrado el desarrollo de sistemas inteligentes colorimétricos que podrían tener potencial aplicación para la monitorización *in situ* del estado y deterioro de alimentos.

CAPÍTULO VII

Parte Experimental

7 CAPITULO VII. Parte Experimental

En este capítulo se describen los procedimientos experimentales para la síntesis de los diferentes productos y materiales obtenidos en la presente Tesis Doctoral, así como las técnicas empleadas para su caracterización y evaluación como sensores colorimétricos.

7.1 Consideraciones generales

Los reactivos y disolventes empleados fueron del mejor grado comercialmente asequible. Se adquirieron en distintas casas comerciales (Sigma-Aldrich, Scharlab, TCI-Chemicals o Iris-Biotech) y se utilizaron sin purificación previa.

Las reacciones sensibles al aire y/o humedad se han llevado a cabo bajo atmósfera inerte de nitrógeno, empleando material de vidrio secado en la estufa previamente y disolventes secos suministrados por un sistema dispensador de disolventes Pure Solv de Innovative Technology. Los reactivos también sensibles a la humedad se manejaron con ayuda de jeringas y bajo atmósfera inerte.

La purificación de los productos sintetizados se ha realizado en general mediante cristalización o mediante procedimiento de lavado en disolventes donde los productos son insolubles y las impurezas, por el contrario, son solubles. Una vez obtenidos los productos sintetizados, se secaron en una estufa de vacío marca Binder a una temperatura de 45 °C y después fueron adecuadamente guardados en desecadores o nevera, según las necesidades del producto.

7.2 Técnicas de análisis

7.2.1 Espectroscopia de RMN

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y de ^{13}C se han adquirido en espectrómetros Bruker Avance III HD 300 a 300 MHz, Bruker Avance III HD 400 a 400 MHz y Varian INOVA 500 a 500 MHz en tubos de un diámetro de 5 mm, utilizando un disolvente deuterado de elevada pureza. Los cambios químicos se dan en valores delta (δ) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz), usando la señal del solvente residual como referencia (TMS). Para la caracterización de los productos sintetizados, los espectros se adquirieron a 30 °C.

7.2.2 Espectroscopia de FT-IR-ATR

Los espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR) se han adquirido con un espectrofotómetro FT/IR-4700 de JASCO mediante el accesorio de reflexión única Pike ATR Diamond/ZnSe. (Rango espectral de 4000-600 cm^{-1}).

7.2.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las temperaturas de transición vítrea (T_g) y los puntos de fusión (T_m) se midieron utilizando un calorímetro diferencial de barrido (DSC) de Mettler-Toledo, modelo DSC822e. El instrumento se ha calibrado para la temperatura y el flujo de calor con muestras de referencia de zinc e indio proporcionadas por Mettler-Toledo. Las muestras se han colado en una bandeja de aluminio herméticamente sellada de 40 μL con un orificio en la parte superior. Se ha usado una bandeja de aluminio vacía como referencia. Las muestras se han expuesto a una atmósfera fluida de N_2 . Las temperaturas de transición se han determinado mediante ciclos múltiples (típicamente tres) que implicaban calentar la muestra de -50 a 120 $^\circ\text{C}$, seguido de enfriamiento de 120 a -50 $^\circ\text{C}$, ambos a una velocidad de 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$. Las temperaturas de transición se ha determinado para el segundo ciclo de cada muestra.

7.2.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

Los datos se han registrado en un TG-SDTA Mettler Toledo modelo TGA/SDTA851e/LF/1600 utilizando el siguiente programa de calentamiento: 1. Calentamiento y medición de la pérdida de peso de 25 $^\circ\text{C}$ a 500 $^\circ\text{C}$ a 10 $^\circ\text{C/min}$ bajo N_2 .

7.2.5 Espectroscopia Raman

Los espectros Raman se han adquirido con un Raman Confocal Microscope apyron (WITec) con tres fibras ópticas conectadas a las fuentes láser para excitar las muestras (532 y 785 nm) con filtros de paso largo y dos espectrómetros optimizados, el primero para el rango visible con un EMCCD ultra- detector de alta eficiencia y el segundo optimizado para la región NIR con un detector CCD de alta eficiencia y equipado con diferentes lentes ópticas Zeiss (x10, x20 LD, x50 LD, x100 (LD: longitud focal larga)).

7.2.6 Espectroscopia UV-Visible

Las mediciones de espectroscopia UV-Vis se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV2450 usando un rango de longitud de onda entre 200 y 800 nm.

7.2.7 Análisis elemental

El análisis elemental se realizó empleando un equipo CHN Euro EA 3000. Los análisis elementales de los compuestos fueron obtenidos por duplicado y se realizó la media de sus valores.

7.2.8 Ángulo de contacto

La humectabilidad de los discos se ha determinado utilizando un goniómetro de ángulo de contacto estático al aire libre (Phoenix150, Surface Electro Optics).

7.2.9 Potenciometría

Las valoraciones potenciométricas se llevaron a cabo utilizando un equipo Titromatic Crison. La adquisición de los datos de voltaje se realiza con el programa informático CrisonCapture. El electrodo de referencia es un electrodo de Ag/AgCl en solución saturada de KCl. Se ha utilizado el programa informático HYPERQUAD para calcular las constantes de protonación y estabilidad, y el programa HySS se ha utilizado para la obtención de los diagramas de distribución. El rango de pH investigado es 2.5–11.0.

7.3 Procedimientos sintéticos, protocolos de estudio y caracterización – Capítulo IV

Los rendimientos de los intermedios y productos derivados de L-valina mediante las diferentes metodologías se encuentran en la Tabla 4.1. del capítulo IV.

7.3.1 Síntesis del compuesto 2 – Método i

Etapas 1 – Éster activado de la L-valina

En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 mL se pesan 2 grs del compuesto 1 derivado de L-valina (7.95 mmol, 1 equiv.) y 0.92 grs de *N*-hidrosuccinimida (7.95 mmol, 1 equiv.). Posteriormente, se purga el balón mediante diversos ciclos de nitrógeno. A continuación, bajo condiciones de atmósfera inerte, se adicionan 40 mL de THF y la disolución en agitación se enfría con baño de hielo hasta alcanzar 0°C. Después de estabilizar la mezcla durante 30 minutos, se añade gota a gota una disolución de 1.65 grs de DCC (7.95 mmol, 1 equiv.) en 15 mL de THF. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se agita a 0°C durante una hora. Posteriormente, la reacción se deja a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se filtra el subproducto DCU

y se evapora el disolvente del filtrado por destilación a presión reducida. El crudo obtenido se redisuelve en CH_2Cl_2 y se realizan extracciones ácido-base (3x30mL) con disoluciones de HCl (pH:3) y NaOH (pH:10), respectivamente. A continuación, se realiza un lavado con 50 mL de H_2O destilada y la fase orgánica separada se seca sobre MgSO_4 y se filtra. El disolvente orgánico se elimina parcialmente a presión reducida hasta la aparición del producto sólido. El paso final de purificación se basa en una cristalización en nevera con 30 mL de IPA. El sólido cristalizado se filtra al vacío y se lava con 20 mL de IPA enfriado. Finalmente, el producto se seca a vacío.

Etapa 2 – Compuesto 2

En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 mL se pesan 2 grs del éster activado (5.74 mmol, 1 equiv.) de la L-valina a partir del compuesto 1 y se purga el balón mediante diversos ciclos de N_2 . A continuación, se añaden 40 mL de THF y se disuelve el sólido mediante agitación. Posteriormente, se añade gota a gota la amina correspondiente (5.74 mmol, 1equiv.) disuelta en 15 mL de THF. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una hora y se calienta a 45-50°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, el disolvente se elimina a presión reducida y el producto obtenido se redisuelve en 50 mL de CH_2Cl_2 . Seguidamente, se realizan extracciones ácido-base (3x30mL) con disoluciones de HCl (pH:3) y NaOH (pH:10), respectivamente. A continuación, se realiza un lavado con 50 mL de H_2O destilada y la fase orgánica separada se seca sobre MgSO_4 y se filtra. El disolvente orgánico se elimina parcialmente a presión reducida hasta la aparición del producto sólido. El paso final de purificación se basa en una cristalización en nevera con 30 mL de IPA. El sólido cristalizado se filtra al vacío y se lava con 20 mL de IPA enfriado. Finalmente, el producto se seca a vacío.

7.3.2 Síntesis del compuesto 2 – Método ii – **Z-Val-But**

En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 mL se pesan 2 grs del compuesto 1 derivado de L-valina (7.95 mmol, 1 equiv.) y se disuelve en 30 mL de THF. A continuación, se añade 1.1 mL de Et_3N (7.95 mmol, 1 equiv.) gota a gota a la disolución y la mezcla en agitación se enfría con CryoCool a -10°C. Una vez se alcanza la temperatura, se añade gota a gota una disolución de 0.8 mL de cloroformiato de etilo (7.95 mmol, 1 equiv.) en 5 mL de THF. El CO_2 liberado se captura mediante un globo. Posteriormente, se agregan 10 ml de THF y la mezcla blanca de composición no homogénea se agita vigorosamente durante 30 minutos a -10°C hasta completa disolución. A continuación, se añade gota a gota 0.80 mL de la butilamina (7.95 mmol, 1 equiv.) disuelta en 10 ml de THF, que finalmente se deja agitar

a -10°C durante 2 horas y luego a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, la mezcla de reacción se concentra a presión reducida para eliminar el THF. Seguidamente, se añaden 50 mL de H₂O y se realizan extracciones con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). La fase orgánica se evapora a presión reducida hasta la aparición del producto sólido. A continuación, el sólido se cristaliza en 50 mL de IPA. El sólido se filtra al vacío, se lava con 50 mL de IPA enfriado y se seca al vacío a 40°C.

7.3.3 Síntesis del compuesto 2 – Método ii – **Z-Val-Bn**

En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 mL se pesan 2 grs del compuesto **1** derivado de L-valina (7.95 mmol, 1 equiv.) y se disuelve en 30 mL de THF. A continuación, se añade 1.1 mL de Et₃N (7.95 mmol, 1 equiv.) gota a gota a la disolución y la mezcla en agitación se enfría con CryoCool a -10°C. Una vez se alcanza la temperatura, se añade gota a gota una disolución de 0.8 mL de cloroformiato de etilo (7.95 mmol, 1 equiv.) en 5 mL de THF. El CO₂ liberado se captura mediante un globo. Posteriormente, se agregan 10 ml de THF y la mezcla blanca de composición no homogénea se agita vigorosamente durante 30 minutos a -10°C hasta completa disolución. A continuación, se añade gota a gota 0.90 mL de la bencilamina (7.95 mmol, 1 equiv.) disuelta en 10 ml de THF, que finalmente se deja agitar a -10°C durante 2 horas y luego a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, la mezcla de reacción se concentra a presión reducida para eliminar el THF. Seguidamente, se añaden 50 mL de H₂O y se realizan extracciones con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). La fase orgánica se evapora a presión reducida hasta la aparición del producto sólido. A continuación, el sólido se cristaliza en 50 mL de IPA. El sólido se filtra al vacío, se lava con 50 mL de IPA enfriado y se seca al vacío a 40°C.

7.3.4 Síntesis del compuesto 2 – Método iii – **Z-Val-But**

En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 mL se pesan 2 grs del compuesto **1** derivado de L-valina (7.95 mmol, 1 equiv.) y se disuelve en 30 mL de 2-MeTHF. A continuación, se añade 1.1 mL de Et₃N (7.95 mmol, 1 equiv.) gota a gota a la disolución y la mezcla en agitación se enfría con CryoCool a -10°C. Una vez se alcanza la temperatura, se añade gota a gota una disolución de 0.8 mL de cloroformiato de etilo (7.95 mmol, 1 equiv.) en 5 mL de 2-MeTHF. El CO₂ liberado se captura mediante un globo. Posteriormente, se agregan 10 ml de 2-MeTHF y la mezcla blanca de composición no homogénea se agita vigorosamente durante 30 minutos a -10°C hasta completa disolución. A continuación, se añade gota a gota 0.80 mL de la butilamina (7.95 mmol, 1 equiv.) disuelta en 10 ml de 2-MeTHF, que finalmente se deja agitar a -10°C durante 2 horas y luego a temperatura

ambiente durante 24 horas. A continuación, la mezcla de reacción se lava con 50 ml de una solución al 5 % de HCl y 2 x 50 ml de H₂O destilada. El disolvente orgánico se elimina parcialmente a presión reducida hasta la aparición del producto sólido por insolubilidad en la fase acuosa. El sólido se filtra al vacío, se lava con 20 mL de 2-MeTHF enfriado y se seca al vacío a 40°C.

7.3.5 Síntesis del compuesto 2 – Método iii – **Z-Val-Bn**

En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 mL se pesan 2 grs del compuesto **1** derivado de L-valina (7.95 mmol, 1 equiv.) y se disuelve en 30 mL de 2-MeTHF. A continuación, se añade 1.1 mL de Et₃N (7.95 mmol, 1 equiv.) gota a gota a la disolución y la mezcla en agitación se enfría con CryoCool a -10°C. Una vez se alcanza la temperatura, se añade gota a gota una disolución de 0.8 mL de cloroformiato de etilo (7.95 mmol, 1 equiv.) en 5 mL de 2-MeTHF. El CO₂ liberado se captura mediante un globo. Posteriormente, se agregan 10 ml de 2-MeTHF y la mezcla blanca de composición no homogénea se agita vigorosamente durante 30 minutos a -10°C hasta completa disolución. A continuación, se añade gota a gota 0.90 mL de la bencilamina (7.95 mmol, 1 equiv.) disuelta en 10 ml de 2-MeTHF, que finalmente se deja agitar a -10°C durante 2 horas y luego a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, la mezcla de reacción se lava con 50 ml de una solución al 5 % de HCl y 2 x 50 ml de H₂O destilada. El disolvente orgánico se elimina parcialmente a presión reducida hasta la aparición del producto sólido por insolubilidad en la fase acuosa. El sólido se filtra al vacío, se lava con 20 mL de 2-MeTHF enfriado y se seca al vacío a 40°C.

7.3.6 Síntesis del compuesto 3 – Método iv

2 grs del compuesto 2 se disuelven en 30 mL de MeOH en un matraz de fondo redondo de dos bocas. Posteriormente, se une un adaptador de dos bocas al matraz y se purga con globo realizando diversos ciclos de N₂. A continuación, bajo condiciones de atmósfera inerte, se añade Pd/C al 10 % w/w al matraz y se desgasifica la solución con nuevos ciclos de N₂. Posteriormente, los globos de N₂ se sustituyen con globos de H₂ y el gas se libera en la solución mientras se produce la agitación a temperatura ambiente. Después de 24 horas, la solución se filtra al vacío a través de Celite y el líquido obtenido se evapora a presión reducida y se obtiene el compuesto 3 en forma de un líquido viscoso que se deja secando en alto vacío durante 24 horas.

7.3.7 Síntesis del compuesto 3 – Método v

2 grs del compuesto 2 se disuelven en 20 mL de una solución de HBr/AcOH (33 %) y la mezcla se agita durante 1 h a temperatura ambiente. En este punto, se añaden 10 mL de éter dietílico seco y se produce la deposición de un precipitado. Este precipitado se filtra y se disuelve en 20 mL de H₂O destilada. La fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). Posteriormente, la fase acuosa se basifica con gránulos de NaOH hasta pH=12 en baño de hielo. Una vez se estabiliza el pH, la fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). La fase orgánica se lava con H₂O destilada y se seca sobre MgSO₄. Finalmente, el disolvente orgánico se evapora y se obtiene el compuesto 3.

7.3.8 Síntesis del compuesto 2 – Método iii – **Boc-Pro-But**

En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 mL se pesan 2 grs del compuesto 1 derivado de L-prolina (9.29 mmol, 1 equiv.) y se disuelve en 30 mL de 2-MeTHF. A continuación, se añade 1.29 mL de Et₃N (9.29 mmol, 1 equiv.) gota a gota a la disolución y la mezcla en agitación se enfría con CryoCool a -10°C. Una vez se alcanza la temperatura, se añade gota a gota una disolución de 0.94 mL de cloroformiato de etilo (9.29 mmol, 1 equiv.) en 5 mL de 2-MeTHF. El CO₂ liberado se captura mediante un globo. Posteriormente, se agregan 10 ml de 2-MeTHF y la mezcla blanca de composición no homogénea se agita vigorosamente durante 30 minutos a -10°C hasta completa disolución. A continuación, se añade gota a gota 1.05 mL de la bencilamina (9.29 mmol, 1 equiv.) disuelta en 10 ml de 2-MeTHF, que finalmente se deja agitar a -10°C durante 2 horas y luego a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, la mezcla de reacción se lava con 50 ml de una solución al 5 % de HCl y 2 x 50 ml de H₂O destilada. El disolvente orgánico se elimina parcialmente a presión reducida hasta la aparición del producto sólido por insolubilidad en la fase acuosa. El sólido se filtra al vacío, se lava con 20 mL de 2-MeTHF enfriado y se seca al vacío a 40°C. (m: 2.11 grs, 84%).

El procedimiento de la sección 7.3.8 también se ha realizado para los derivados de L-valina con el grupo protector Boc y los rendimientos se reflejan en la Tabla 4.2. del capítulo IV.

7.3.9 Síntesis del compuesto 3 – **Pro-But**

2 grs del compuesto 2 con el grupo protector Boc del derivado de L-prolina (7.40 mmol, 1 equiv.) se disuelven en 10 mL CH₂Cl₂ y 10 mL de ácido trifluoroacético. La reacción se agita durante 4 h a temperatura ambiente. En este punto, el disolvente se evapora a presión reducida y se añade NaOH 1M para basificar hasta que el pH=10 en baño de hielo. Una vez

se estabiliza el pH, la fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). La fase orgánica se lava con H_2O destilada y se seca sobre MgSO_4 . Finalmente, el disolvente orgánico se evapora y se obtiene el compuesto 3 derivado de L-prolina. (m: 1.12 grs, 89%).

7.3.10 Síntesis del PILs

Se disuelve 1 mmol del compuesto 3 en 2 ml de MeOH. La cantidad estequiométrica del ácido correspondiente se añade lentamente mientras se agita la solución. Una vez finalizada la adición, la solución se deja agitando a temperatura ambiente durante 60 minutos y el disolvente se evapora a presión reducida. El líquido iónico prótico sintetizado se seca al vacío a 50°C durante al menos 24 horas.

7.3.11 Titulación potenciométrica

Las valoraciones potenciométricas se han realizado a 298.1 K . 0.025 mmoles del compuesto 3 correspondiente se disuelven en 50 mL de NaCl 0.1M. Seguidamente, la disolución se acidifica hasta pH de 2.5 y se inicia la titración potenciométrica hasta pH=11 con una disolución de NaOH 0.1M.

7.3.12 Condiciones de cultivo

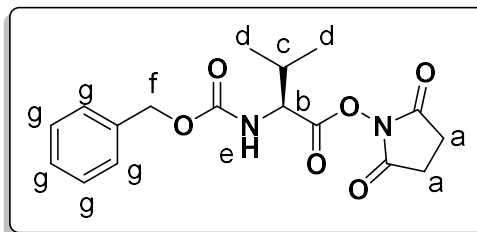
Se aísla *Escherichia coli* MG1655 del cultivo liofilizado de *E. coli* MG1655. Los cepas se cultivan a 37°C en una incubadora y los cultivos madre se mantienen en medio de agar LB. Los cultivos experimentales se cultivaron en medio de agar LB (Caldo de Lisogenia) que contenía: LB (10 g), extracto de levadura (6 g), 400 ml de agua desionizada.

7.3.13 Procedimiento para el estudio respuesta a aminas volátiles

En un vial de 20 mL con septum se dispone el tejido de celulosa con la sonda inmovilizada en el líquido iónico prótico de naturaleza hidrofóbica y se sella el vial. Posteriormente, se añaden 100 μL de NH_4Cl de una concentración determinada y se adicionan 100 μL de NaOH 2M. Una vez añadida la base, se adquieren imágenes fotográficas en diferentes intervalos de tiempo a medida que se produce la evolución de NH_3 (g) y se produce el cambio de color.

7.3.14 Caracterización

- **Z-Val-OSucc (1):** 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ((benzyloxy)carbonyl)-L-valinate

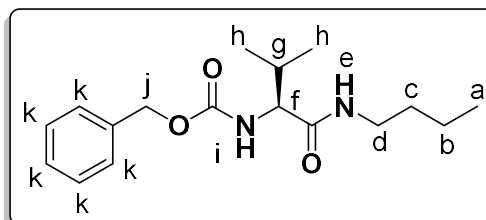


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.46 – 7.28 (m, 5H_g), 5.26 (d, J = 8.4 Hz, 1H_e), 5.15 (s, 2H_f), 4.69 (dd, J = 8.7, 4.5 Hz, 1H_b), 2.83 (s, 1H_a), 2.44 – 2.20 (m, 1H_c), 1.18 – 0.89 (m, 6H_h).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 168.53(C=O), 167.72 (C=O), 155.83 (C=O), 135.97 (C_{cuaternario}), 128.59 (C_g), 128.28 (C_g), 67.45 (C_b), 57.51 (C_f), 31.69 (C_c), 25.59 (C_a), 18.69 (C_d), 17.23 (C_d).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3358, 2961, 1812, 1781, 1734, 1713, 1526, 1455, 1351, 1311, 1234, 1202, 1069, 1021, 994, 951, 916, 898, 811, 775, 753, 729, 698, 640.

- **Z-ValBut (2a):** benzyl (S)-(1-(butylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)carbamate

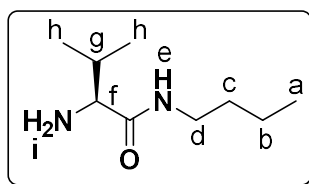


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.50 – 7.30 (m, 5H_k), 5.89 (s, 1H_e), 5.38 (s, 2H_i), 5.13 (s, 2H_j), 3.92 (dd, J = 8.7, 6.5 Hz, 1H_f), 3.35 – 3.17 (m, 1H_d), 2.22 – 2.06 (m, 1H_g), 1.61 – 1.20 (m, 4H_{b+c}), 1.02 – 0.88 (m, 6H_h).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171.16(C=O), 156.59 (C=O), 136.40 (C_{cuaternario}), 128.70 (C_g), 128.26 (C_g), 67.20 (C_b), 60.91 (C_f), 39.40 (C_d), 31.69 (C_g), 31.10 (C_c), 20.17 (C_h), 19.39 (C_h), 18.05 (C_b), 13.82 (C_a).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3289, 2956, 2871, 2360, 2342, 1687, 1639, 1536, 1465, 1455, 1388, 1367, 1346, 1290, 1241, 1133, 1117, 1077, 1039, 991, 974, 937, 915, 844, 779, 751, 694, 679.

- **ValBut (3a):** (S)-2-amino-N-butyl-3-methylbutanamide

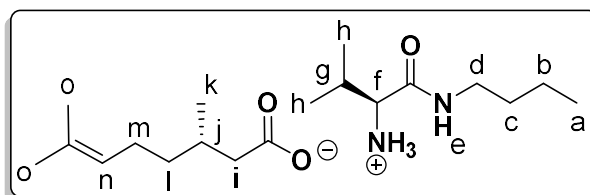


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.25 (s, 1H_e), 3.38 – 3.12 (m, 3H_{d+f}), 2.38 – 2.19 (m, 1H_g), 1.56 – 1.41 (m, 2H_c), 1.41 – 1.25 (m, 2H_b), 1.02 – 0.87 (m, 6H_{a+h}), 0.82 (d, J = 6.9 Hz, 3H_h).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 174.21 (C=O), 60.35 (C_f), 38.86 (C_d), 31.93 (C_c), 30.95 (C_g), 20.28 (C_b), 19.84 (C_h), 16.17 (C_h), 13.88 (C_a).

IR (ATR) ν_{máx} (cm⁻¹): 3289, 2956, 2871, 1687, 1640, 1536, 1455, 1388, 1367, 1346, 1290, 1241, 1133, 1117, 1040, 975, 916, 845, 779, 751, 695.

- **ValBut-Citro:** (S)-1-(butylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium (S)-3,7-dimethyloct-6-enoate

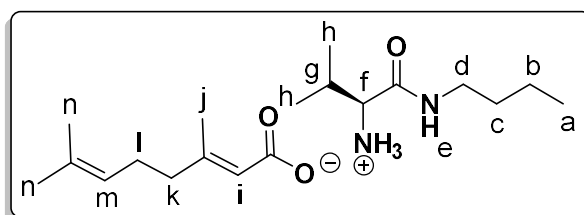


¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 5.15 – 5.08 (m, 1H_n), 3.35 (d, J = 5.9 Hz, 1H_f), 3.29 – 3.13 (m, 2H_d), 2.22 (dd, J = 13.7, 5.9 Hz, 1H_i), 2.12 – 1.85 (m, 5H_{g+i+j+m}), 1.67 (d, J = 1.1 Hz, 3H_o), 1.61 (s, 3H_o), 1.57 – 1.46 (m, 2H_c), 1.43 – 1.31 (m, 3H_{b+l}), 1.31 – 1.12 (m, 1H_l), 1.00 (t, J = 7.0 Hz, 6H_{a+h}), 0.97 – 0.92 (m, 6H_{h+k}).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 180.06 (COO⁻), 172.48 (C=O), 132.01 (C_{cuaternario}), 125.77 (C_n), 60.71 (C_f), 45.21 (C_i), 40.18 (C_d), 38.23 (C_l), 32.47 (C_c), 32.36 (C_j), 31.67 (C_g), 26.59 (C_m), 25.87 (C_o), 21.11 (C_b), 20.17 (C_h), 19.21 (C_a), 18.01 (C_k), 17.70 (C_o), 14.02 (C_h).

IR (ATR) ν_{máx} (cm⁻¹): 3648, 3236, 3058, 2960, 2928, 2873, 2115, 1669, 1541, 1463, 1377, 1300, 1249, 1229, 1159, 1112, 1040, 1021, 982, 928, 858, 826, 736, 710, 657.

- **ValBut-Gera:** (S)-1-(butylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium (E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoate

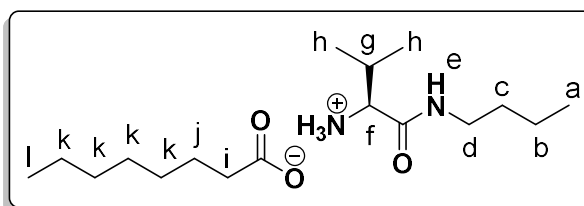


^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 5.66 (s, 1H_i), 5.23 – 5.04 (m, 1H_m), 3.36 (d, J = 5.9 Hz, 1H_f), 3.29 – 3.11 (m, 2H_d), 2.24 – 1.99 (m, 8H_{g+j+k+l}), 1.75 – 1.67 (m, 3H_n), 1.64 (s, 3H_n), 1.59 – 1.47 (m, 2H_c), 1.46 – 1.30 (m, 2H_b), 0.99 (dt, J = 14.6, 7.1 Hz, 9H_{a+h}).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 172.78 (COO⁻), 155.77 (C=O), 133.02 (C_{cuaternario}), 125.25 (C_{cuaternario}), 124.56 (C_m), 120.05 (C_i), 59.35 (C_f), 41.63 (C_i), 40.16 (C_d), 32.48 (C_c), 32.45 (C_g), 27.33 (C_k), 25.84 (C_n), 21.12 (C_b), 19.24 (C_h), 18.68 (C_j), 18.00 (C_a), 17.73 (C_n), 14.02 (C_h).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3225, 2962, 2929, 2875, 2635, 1667, 1646, 1541, 1466, 1442, 1396, 1375, 1301, 1242, 1167, 1108, 1075, 1017, 982, 931, 877, 823, 738, 695, 621.

- **ValBut-Oct:** (S)-1-(butylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium octanoate

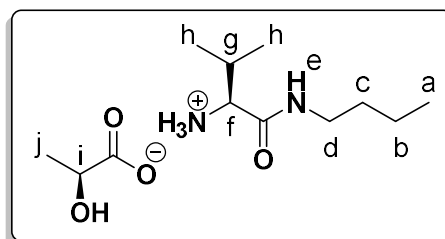


^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 3.36 (d, J = 5.9 Hz, 1H_f), 3.32 – 3.13 (m, 2H_d), 2.25 – 2.16 (t, J = 7.0 Hz, 2H_i), 2.12 – 2.01 (m, 1H_g), 1.66 – 1.47 (m, 4H_{c+j}), 1.44 – 1.24 (m, 10H_{b+k}), 1.00 (t, J = 6.9 Hz, 6H_{a+h}), 0.95 (t, J = 7.3 Hz, 3H_h), 0.90 (t, J = 6.9 Hz, 3H_i).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 180.90 (COO⁻), 172.19 (C=O), 60.62 (C_f), 40.19 (C_d), 37.55 (C_i), 32.97 (C_k), 32.47 (C_c), 32.30 (C_g), 30.59 (C_k), 30.26 (8C_k), 27.13 (C_j), 23.70 (C_k), 21.13 (C_b), 19.18 (C_h), 18.02 (C_a), 14.42 (C_i), 14.04 (C_h).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3298, 2962, 2928, 2874, 2853, 2159, 1654, 1591, 1568, 1406.

- **ValBut-Lac:** (S)-1-(butylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium-(S)-2-hydroxypropanoate

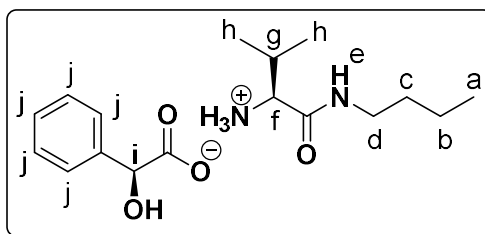


^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 4.02 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H_i), 3.50 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H_f), 3.37 – 3.24 (m, 1H_d), 3.23 – 3.14 (m, 1H_d), 2.20 – 2.03 (m, 1H_g), 1.59 – 1.45 (m, 2H_c), 1.45 – 1.35 (m, 2H_b), 1.33 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H_j), 1.03 (dd, $J = 6.9$ Hz, $J = 4.3$ Hz, 6H_{a+h}), 0.94 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H_h).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 181.46 (COO^-), 170.26 (C=O), 69.15 (C_i), 60.14 (C_f), 40.29 (C_d), 32.42 (C_c), 31.73 (C_g), 21.44 (C_j), 21.11 (C_b), 18.92 (C_h), 18.07 (C_a), 14.00 (C_h).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3271, 3082, 2964, 2933, 2874, 1669, 1568, 1124, 1036.

ValBut-Man: (S)-1-(butylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium (S)-2-hydroxy-2-phenylacetate

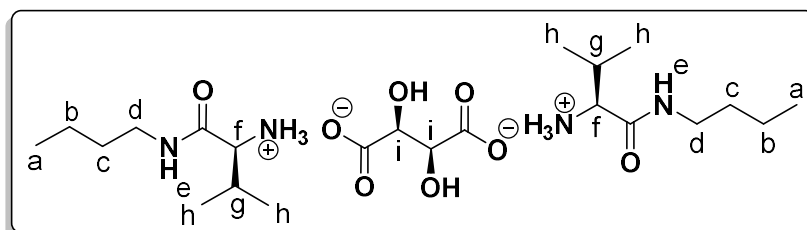


^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.52 – 7.41 (m, 2H_j), 7.35 – 7.17 (m, 3H_j), 4.88 (s, 1H_i), 3.53 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H_f), 3.37 – 3.23 (m, 1H_d), 3.22 – 3.14 (m, 1H_d), 2.19 – 2.04 (m, 1H_g), 1.57 – 1.46 (m, 1H_c), 1.46 – 1.31 (m, 2H_b), 1.02 (dd, $J = 6.9$, 4.3 Hz, 6H_h), 0.95 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H_a).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 178.44 (COO^-), 169.67 (C=O), 142.80 ($\text{C}_{\text{cuaternario}}$), 127.63 (C_j), 127.63 (C_j), 127.63 (C_j), 75.62 (C_i), 60.01 (C_f), 40.31 (C_d), 32.40 (C_c), 31.57 (C_g), 21.10 (C_b), 18.84 (C_h), 18.04 (C_a), 12.60 (C_h).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3271, 3061, 3032, 2962, 2932, 2876, 2362, 1667, 1569, 1397, 1359, 1059, 933, 736, 698.

- **ValBut₂-Tar:** Bis((S)-1-(butylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium) (2S,3S)-2,3-dihydroxysuccinate

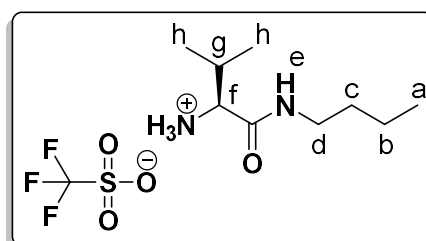


¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 4.34 (s, 2H_i), 3.54 (d, J = 6.0 Hz, 2H_f), 3.37 – 3.25 (dd, J = 11.5, 4.4 Hz, 2H_d), 3.24 – 3.12 (m, 2H_d), 2.20 – 2.06 (m, 2H_g), 1.59 – 1.45 (m, 4H_c), 1.45 – 1.31 (m, 4H_b), 1.08 – 0.98 (t, J = 7.0 Hz, 12H_{a+h}), 0.99 – 0.90 (m, 6H_h).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 178.13(COO⁻), 170.28 (C=O), 74.76 (C_i), 60.09 (C_f), 40.24 (C_d), 32.37 (C_c), 31.68 (C_g), 21.07 (C_b), 18.88 (C_h), 18.16 (C_a), 14.00 (C_h).

IR (ATR) ν_{máx} (cm⁻¹): 3269, 3085, 2963, 2929, 2874, 1664, 1567, 1464, 1348, 1246, 1114, 1067, 1029, 688, 621.

- **ValBut-OTf:** (S)-1-(butylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium trifluoromethanesulfonate

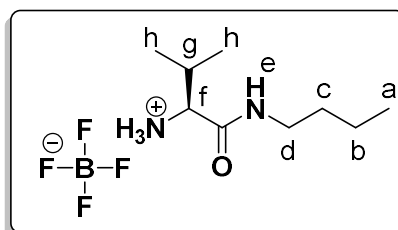


¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 3.57 (d, J = 6.0 Hz, 1H_f), 3.37 – 3.26 (m, 1H_d), 3.24 – 3.15 (m, 1H_d), 2.22 – 2.08 (m, 1H_g), 1.59 – 1.47 (m, 2H_c), 1.45 – 1.32 (m, 2H_b), 1.05 (dd, J = 6.9, 4.2 Hz, 6H_{a+h}), 0.95 (t, J = 7.3 Hz, 3H_h).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 169.29 (C=O), 126.23, 123.28, 120.20 (CF₃), 59.94 (C_f), 40.32 (C_d), 32.37 (C_c), 31.50 (C_g), 21.10 (C_b), 18.82 (C_h), 17.97 (C_a), 13.99 (C_h).

IR (ATR) ν_{máx} (cm⁻¹): 3312, 3134, 2967, 2936, 2876, 1664, 1496, 1270, 1253, 1225, 1184, 1163, 1032, 626.

- **ValBut-BF₄**: (S)-1-(butylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium tetrafluoroborate

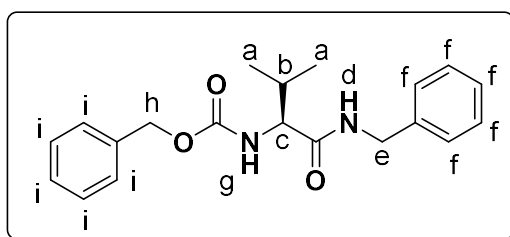


¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 3.57 (d, J = 6.0 Hz, 1H_f), 3.37 – 3.25 (m, 1H_c), 3.25 – 3.13 (m, 1H_c), 2.23 – 2.06 (m, 1H_g), 1.59 – 1.46 (m, 2H_c), 1.45 – 1.30 (m, 2H_b), 1.04 (dd, J = 6.9, 3.6 Hz, 6H_{a+h}), 0.95 (t, J = 7.3 Hz, 3H_h).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 169.32 (C=O), 59.95 (C_f), 40.37 (C_d), 32.32 (C_c), 31.46 (C_g), 21.06 (C_b), 18.75 (C_h), 17.96 (C_a), 13.98 (C_h).

IR (ATR) ν_{máx} (cm⁻¹): 3623, 3387, 3238, 2966, 2934, 2874, 2362, 1672, 1560, 1506, 1053.

- **Z-ValBn (2b)**: benzyl (S)-1-(benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)carbamate

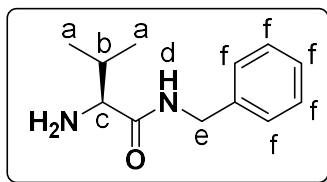


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.45 – 7.14 (m, 10H_{f+i}), 6.35 (s, 1H_d), 5.41 (s, H_g), 5.17 – 4.93 (s, 2H_h), 4.54 – 4.32 (m, 2H_e), 4.00 (dd, J = 8.7, 6.5 Hz, H_c), 2.24 – 2.08 (m, 1H_b), 1.05 – 0.81 (m, 6H_a).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.16 (C=O), 156.59 (C=O), 137.8 (C_{cuaternario}), 136.40 (C_{cuaternario}), 128.88, 128.68, 128.34, 128.16, 127.90, 127.73 (C_{f+i}), 67.08 (C_b), 61.25 (C_e), 43.74 (C_h), 31.38 (C_b), 19.39 (C_h), 18.05 (C_h).

IR (ATR) ν_{máx} (cm⁻¹): 3289, 2956, 2871, 2360, 2342, 1687, 1639, 1536, 1465, 1455, 1388, 1367, 1346, 1290, 1241, 1133, 1117, 1077, 1039, 991, 974, 937, 915, 844, 779, 751, 694, 679.

- **ValBn (3b):** (S)-2-amino-N-benzyl-3-methylbutanamide

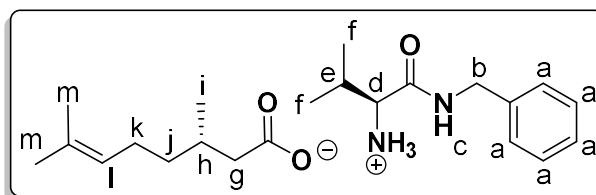


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.78 (s, 1H_d), 7.23 – 6.99 (m, 5H_f), 4.37 – 4.13 (m, 2H_e), 3.03 (d, J = 4.2 Hz, 1H_c), 2.18 – 1.95 (m, 1H_b), 0.81 (d, J = 6.9 Hz, 3H_a), 0.69 (d, J = 6.9 Hz, 3H_a).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.56 (C=O), 138.72 (C_{cuaternario}), 128.40 (C_f), 128.14 (C_f), 127.49 (C_f), 127.40 (C_f), 127.31 (C_f), 127.05 (C_f), 60.21 (C_c), 42.83 (C_e), 31.07 (C_b), 19.61 (C_a), 16.26 (C_a).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3301, 3063, 3030, 2960, 2929, 2870, 1648, 1605, 1517, 1497, 1454, 1361, 1237, 1114, 1078, 1029, 729, 698.

- **ValBn-Citro:** (S)-1-(benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium (S)-3,7-dimethyloct-6-enoate

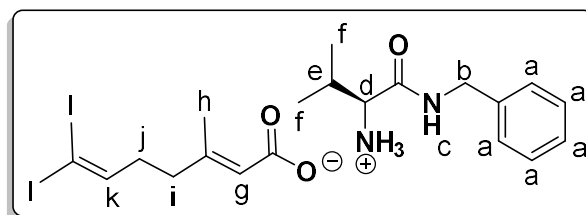


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.37 – 7.19 (m, 5H_a), 5.11 (m, 1H_i), 4.41 (q, J = 14.7 Hz, 2H_b), 3.40 (d, J = 5.8 Hz, 1H_d), 2.23 (dd, J = 5.8 Hz, 1H_g), 2.14 – 1.85 (m, 5H_{e+g+h+k}), 1.68 (s, 3H_m), 1.61 (s, 3H_m), 1.46 – 1.30 (m, 1H_j), 1.30 – 1.13 (m, 1H_j), 1.05 – 0.87 (m, 9H_{f+i}).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 179.45 (COO⁻), 172.18 (C=O), 139.59 (C_{cuaternario}), 132.08 (C_{cuaternario}), 129.60 (C_a), 128.89 (C_a), 128.44 (C_a), 125.71 (C_i), 60.61 (C_d), 44.66 (C_g), 44.25 (C_b), 38.15 (C_j), 32.35 (C_e), 31.55 (C_h), 26.55 (C_k), 25.87 (C_m), 20.13 (C_f), 19.18 (C_i), 17.94 (C_f), 17.69 (C_m).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3031, 2966, 2913, 1669, 1645, 1540, 1454, 1396, 1375, 1300, 1241, 1168, 1107, 1081, 1029, 871, 821, 732, 697.

- **ValBn-Gera:** (S)-1-(benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium (E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoate

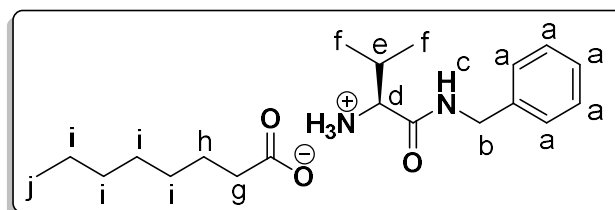


¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.37 – 7.19 (m, 5H_a), 5.66 (d, J = 1.1 Hz, H_g), 5.22 – 5.04 (m, 1H_k), 4.41 (q, J = 14.7 Hz, H_b), 3.37 (d, J = 5.8 Hz, H_d), 2.23 – 1.99 (m, 4H_{i+j}), 2.08 (d, J = 4.9 Hz, H_h), 2.07 – 2.00 (m, 1H_e), 1.68 (s, 3H_l), 1.62 (s, 3H_i), 0.97 (dt, J = 13.2, 6.6 Hz, 6H_f).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 172.39 (COO⁻), 157.09 (C=O), 139.60 (C_{cuaternario}), 133.11 (C_{cuaternario}), 129.59 (C_a), 128.89 (C_a), 128.43 (C_a), 124.48 (C_g), 119.29 (C_k), 60.67 (C_d), 44.24 (C_b), 41.69 (C_j), 32.41 (C_e), 27.30 (C_i), 25.8 (C_i), 19.20 (C_f), 18.73 (C_h), 17.94 (C_f), 17.71 (C_i).

IR (ATR) ν_{máx} (cm⁻¹): 3031, 2964, 2914, 1670, 1542, 1455, 1396, 1298, 1245, 1166, 1109, 1079, 1029, 823, 733, 697, 606.

- **ValBn-Oct:** (S)-1-(benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium octanoate

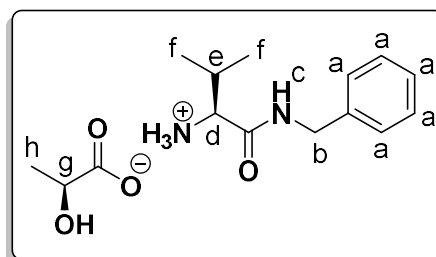


¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.37 – 7.17 (m, 5H_a), 4.42 (q, J = 14.7 Hz, 2H_b), 3.47 (d, J = 5.8 Hz, 1H_d), 2.22 (t, J = 7.5 Hz, 2H_g), 2.17– 2.02 (m, 1H_e), 1.65 – 1.54 (m, 2H_h), 1.42 – 1.20 (m, 8H_i), 0.99 (t, J = 7.1 Hz, 6H_f), 0.90 (t, J = 6.9 Hz, 3H_j).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 179.80 (COO⁻), 170.50 (C=O), 139.45 (C_{cuaternario}), 129.54 (C_a), 128.92 (C_a), 128.53 (C_a), 60.07 (C_d), 44.30 (C_b), 36.64 (C_g), 32.90 (C_e), 31.77 (C_h), 30.39 (C_i), 30.23 (C_i), 26.75 (C_i), 23.68 (C_i), 18.90 (C_f), 18.06 (C_f), 14.43 (C_j).

IR (ATR) ν_{máx} (cm⁻¹): 3063, 3033, 2958, 2925, 2854, 1671, 1542, 1458, 1399, 1298, 1242, 1093, 1026, 724, 699.

- **ValBn-Lac:** (S)-1-(benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium (S)-2-hydroxypropanoate

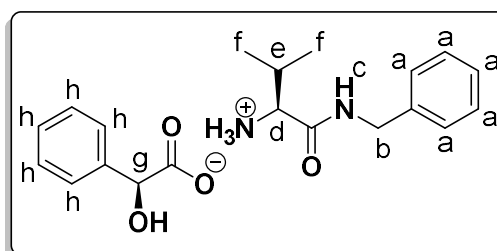


^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.40 – 7.21 (m, 5H_a), 4.43 (q, J = 14.7 Hz, 2H_b), 4.09 (q, J = 6.9 Hz, H_g), 3.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H_d), 2.25 – 2.10 (m, 1H_e), 1.34 (d, J = 6.9 Hz, 3H_f), 1.05 (dd, J = 6.9, 1.9 Hz, 6H_f).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 180.48 (COO⁻), 169.63 (C=O), 139.39 (C_{cuaternario}), 129.58 (C_a), 128.96 (C_a), 128.60 (C_a), 68.65 (C_g), 59.88 (C_d), 44.34 (C_b), 31.62 (C_e), 21.22 (C_h), 18.84 (C_f), 18.08 (C_f).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3290, 2971, 2936, 2875, 2359, 1656, 1599, 1557, 1455, 1342, 1243, 1126, 1036, 850, 753, 699.

- **ValBn-Man:** (S)-1-(benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium (S)-2-hydroxy-2-phenylacetate

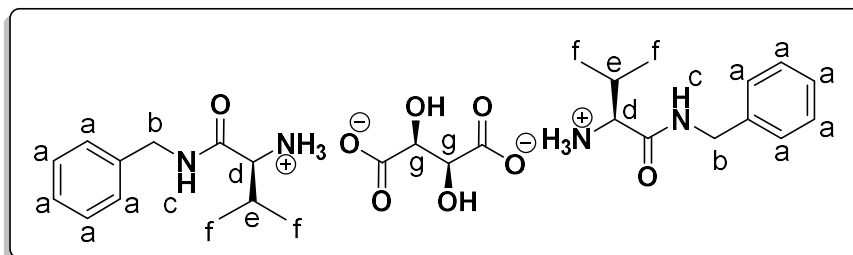


^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.52 – 7.41 (m, 2H_{a+h}), 7.37 – 7.20 (m, 2H_{a+h}), 4.96 (s, 1H_g), 4.42 (q, J = 14.7 Hz, 2H_b), 3.64 (d, J = 5.8 Hz, 1H_d), 2.26 – 2.10 (m, 1H_e), 1.02 (dd, J = 6.9, 2.4 Hz, 6H).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 179.09 (COO⁻), 169.54 (C=O), 142.30 (C_{cuaternario}), 139.39 (C_{cuaternario}), 129.63, 129.19, 128.97, 128.66, 128.52, 127.92 (C_{a+h}), 75.25 (C_g), 44.35 (C_b), 31.55 (C_e), 18.80 (C_f), 18.07 (C_f).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3063, 3030, 2965, 1666, 1563, 1496, 1458, 1244, 1189, 1062, 1027, 727, 692.

- **ValBn₂-Tar:** Bis((S)-1-(benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium) (2S,3S)-2,3-dihydroxysuccinate

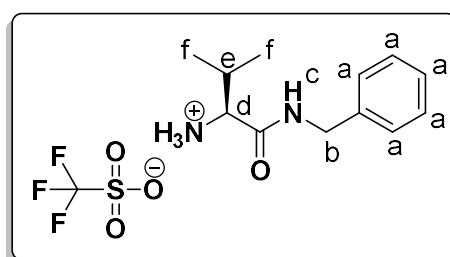


¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.39 – 7.20 (m, 10H_a), 4.55 – 4.28 (m, 6H_{b+g}), 3.23 (d, J = 5.7 Hz, 2H_d), 2.00 (m, 2H_e), 0.95 (dd, J = 11.6, 6.9 Hz, 6H_f).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 177.99 (COO⁻), 170.22 (C=O), 139.45 (C_{cuaternario}), 129.62 (C_a), 128.96 (C_a), 128.49 (C_a), 74.62 (C_g), 60.06 (C_d), 44.35 (C_b), 31.76 (C_e), 18.88 (C_f), 18.10 (C_f).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3258, 3065, 2967, 2935, 2828, 1666, 1559, 1497, 1455, 1395, 1353, 1298, 1244, 1116, 1069, 1027, 907, 838, 727, 697, 607.

- **ValBn-OTf:** (S)-1-(benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium trifluoromethanesulfonate

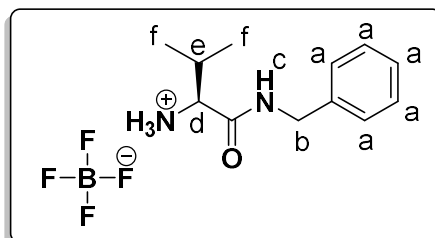


¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.40 – 7.20 (m, 5H_a), 4.43 (q, J = 14.7 Hz, 2H_b), 3.64 (d, J = 5.8 Hz, 1H_d), 2.31 – 2.02 (m, 1H_e), 1.03 (dd, J = 6.9, 4.6 Hz, 6H_f).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 169.27 (C=O), 139.33 (C_{cuaternario}), 129.66 (C_a), 128.96 (C_a), 128.55 (C_a), 123.35, 120.19, 117.02 (CF₃), 59.91 (C_d), 44.35 (C_b), 31.56 (C_e), 18.80 (C_f), 17.91 (C_f).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3315, 3092, 2962, 2358, 1661, 1564, 1495, 1286, 1241, 1225, 1164, 1035, 1015, 697, 636.

- **ValBn-BF₄:** (S)-1-(benzylamino)-3-methyl-1-oxobutan-2-aminium tetrafluoroborate

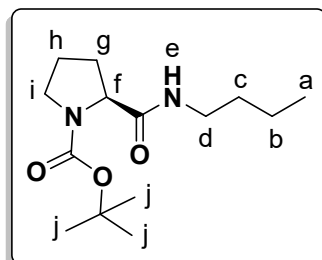


¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.41 – 7.18 (m, 5H_a), 4.43 (q, J = 14.7 Hz, 2H_b), 3.64 (d, J = 5.8 Hz, 1H_d), 2.26 – 2.06 (m, 1H_e), 1.02 (dd, J = 6.9, 3.8 Hz, 6H_f).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 169.38 (C=O), 139.33 (C_{cuaternario}), 129.60 (C_a), 128.93 (C_a), 128.51 (C_a), 59.90 (C_d), 44.33 (C_b), 31.56 (C_e), 18.76 (C_f), 17.91 (C_f).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3373, 3213, 3032, 2972, 2360, 1668, 1556, 1500, 1454, 1073, 1024, 757, 702, 642.

- **Boc-ProBut (2a):** tert-butyl (S)-2-(butylcarbamoyl)pyrrolidine-1-carboxylate

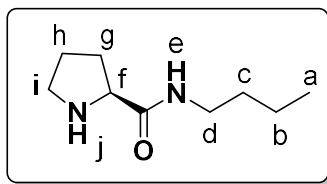


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.93 – 6.01 (s, 1H_e), 4.23 (m, 1H_f), 3.61 – 3.09 (m, 4H_{d+i}), 2.48 – 2.23 (m, 2H_d), 2.51 – 1.56 (m, 4H_{g+h}), 1.55 – 1.40 (m, 11H_{c+j}), 1.40 – 1.25 (m, 2H_b), 1.01 – 0.80 (t, J = 0.0 Hz, 3H_a).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.58 (C=O), 155.08 (C=O), 79.59 (C_{cuaternario}), 60.63 (C_f), 46.54 (C_i), 38.51 (C_d), 31.23 (C_c), 30.72 (C_g), 27.83 (C_h), 23.20 (C_j), 19.48 (C_b), 13.19 (C_a).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 2982, 2360, 2342, 1816, 1789, 1740, 1698, 1389, 1364, 1241, 1200, 1157, 1131, 1097, 1078, 997, 851, 814, 787, 774, 759, 650, 610.

- **ProBut:** (S)-N-butylpyrrolidine-2-carboxamide

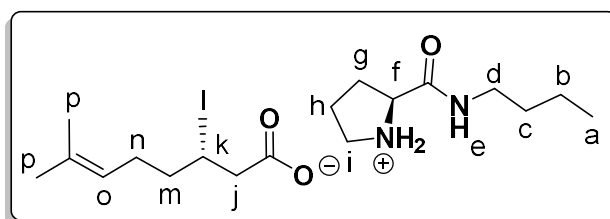


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.61 (s, 1H_e), 3.81 – 3.68 (m, 1H_f), 3.28 – 3.15 (m, 2H_d), 3.08 – 2.94 (m, 1H_i), 2.94 – 2.82 (m, 1H_i), 2.23 – 2.06 (m, 1H_g), 1.98 – 1.79 (m, 1H_g), 1.78 – 1.60 (m, 2H_h), 1.56 – 1.39 (m, 2H_c), 1.39 – 1.20 (m, 2H_b), 1.00 – 0.83 (m, 3H_a).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.57 (C=O), 60.72 (C_f), 47.36 (C_i), 38.85 (C_d), 31.97 (C_c), 30.91 (C_g), 26.22 (C_h), 20.23 (C_b), 13.89 (C_a).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3310, 2957, 2931, 2870, 1649, 1522, 1457, 1438, 1376, 1298, 1244, 1103, 908, 669.

- **ProBut-Citro:** (S)-2-(butylcarbamoyl)pyrrolidin-1-ium (S)-3,7-dimethyloct-6-enoate

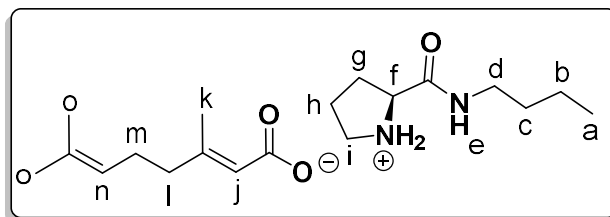


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 5.15 – 5.07 (m, 1H_o), 4.08 (dd, J = 8.5, 6.6 Hz, 1H_f), 3.36 – 3.16 (m, 4H_{d+i}), 2.41 – 2.29 (m, 1H_g), 2.24 (dd, J = 14.1, 6.0 Hz, 1H_j), 2.11 – 1.83 (m, 7H_{g+h+j+k+n}), 1.67 (s, 3H_p), 1.61 (s, 3H_p), 1.58 – 1.44 (m, 2H_c), 1.46 – 1.30 (m, 3H_{b+m}), 1.28 – 1.15 (m, 1H_m), 0.99 – 0.88 (m, 6H_{a+i}).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 180.24 (COO⁻), 171.59 (C=O), 132.02 (C_{cuaternario}), 125.76 (C_o), 61.15 (C_f), 47.41 (C_i), 45.24 (C_j), 40.36 (C_d), 38.22 (C_m), 32.44 (C_c), 31.67 (C_k), 31.45 (C_g), 26.58 (C_n), 25.87 (C_p), 25.63 (C_h), 21.01 (C_b), 20.18 (C_i), 17.70 (C_p), 14.02 (C_a).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3227, 3062, 2958, 2926, 2871, 1676, 1557, 1452, 1379, 1292, 1253, 1200, 1157, 1113, 1078, 1034, 986, 928, 862, 827, 735, 663.

- **ProBut-Gera:** (S)-2-(butylcarbamoyl)pyrrolidin-1-ium (E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoate

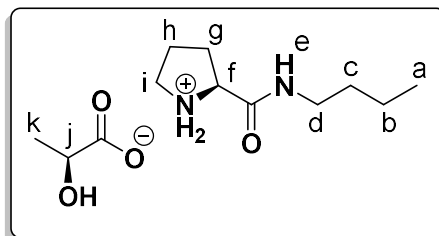


^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 5.66 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H_i), 5.19 – 5.07 (m, 1H_n), 4.05 (dd, $J = 8.5, 6.6$ Hz, 1H_f), 3.33 – 3.17 (m, 4H_{d+i}), 2.38 – 2.27 (m, 1H_g), 2.22 – 2.11 (m, 4H_{l+m}), 2.09 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H_k), 2.02 – 1.88 (m, 3H_{g+h}), 1.68 (s, 3H_o), 1.62 (s, 3H_p), 1.56 – 1.43 (m, 2H_c), 1.42 – 1.27 (m, 2H_b), 0.94 (dd, $J = 9.8, 4.9$ Hz, 3H_a).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 171.94, (COO^-) 155.41 ($\text{C}=\text{O}$), 133.01 ($\text{C}_{\text{cuaternario}}$), 124.57 (C_n), 120.28 (C_j), 61.18 (C_f), 47.45 (C_i), 41.60 (C_l), 40.33 (C_d), 32.45 (C_c), 31.50 (C_g), 27.34 (C_o), 25.84 (C_m), 25.72 (C_h) 21.01 (C_b), 18.66 (C_k), 17.72 (C_p), 14.02 (C_a).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3222, 2962, 2929, 2873, 2730, 2556, 1675, 1648, 1557, 1141, 1376, 1297, 1106, 1035, 986, 867, 823, 689.

- **ProBut-Lac:** (S)-2-(butylcarbamoyl)pyrrolidin-1-ium (S)-2-hydroxypropanoate

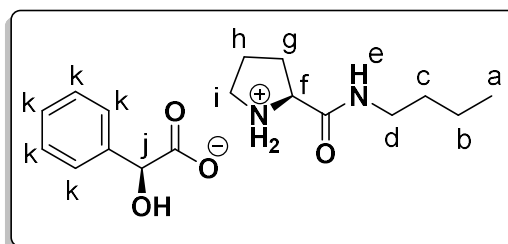


^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 4.18 (dd, $J = 8.5, 6.6$ Hz, 1H_f), 4.05 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H_i), 3.43 – 3.31 (m, 2H_l), 3.28 – 3.15 (m, 2H_d), 2.49 – 2.32 (m, 1H_g), 2.11 – 1.87 (m, 3H_{g+h}), 1.59 – 1.44 (m, 2H_c), 1.43 – 1.25 (m, 2H_b), 1.33 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H_k), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H_a).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 181.37 (COO^-), 169.98 ($\text{C}=\text{O}$), 69.04 (C_j), 61.07 (C_f), 47.31 (C_i), 40.49 (C_d), 32.39 (C_c), 31.22 (C_g), 25.21 (C_h), 21.40 (C_k), 21.00 (C_b), 14.00 (C_a).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3242, 3077, 2959, 2933, 2871, 1668, 1562, 1451, 1341, 1255, 1121, 1035, 848, 657.

- **ProBut-Man:** (S)-2-(butylcarbamoyl)pyrrolidin-1-ium (S)-2-hydroxy-2-phenylacetate

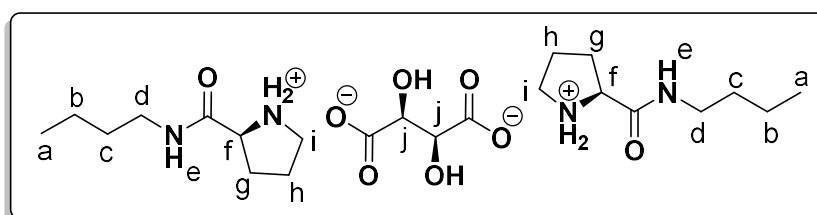


^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.51 – 7.40 (m, 2H_k), 7.35 – 7.15 (m, 3H_k), 4.90 (s, 1H_j), 4.25 – 4.10 (m, 1H_f), 3.40 – 3.15 (m, 4H_{d+i}), 2.43 – 2.25 (m, 1H_g), 2.07 – 1.84 (m, 3H_{g+h}), 1.58 – 1.43 (m, 2H_c), 1.43 – 1.27 (m, 2H_b), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H_a).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 179.15 (COO⁻), 169.91 (C=O), 143.21 (C_{cuaternario}), 129.08, 128.36, 127.91 (C_k), 75.95 (C_j), 61.04 (C_f), 47.29 (C_i), 40.49 (C_d), 32.37 (C_c), 31.18 (C_g), 25.17 (C_h), 21.00 (C_b), 14.00 (C_a).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3267, 3062, 2960, 2934, 2873, 1671, 1574, 1451, 1358, 1190, 1062, 1026, 933, 735, 694.

- **ProBut₂-Tar:** Bis((S)-2-(butylcarbamoyl)pyrrolidin-1-ium) (2S,3S)-2,3-dihydroxysuccinate



^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 4.33 (s, 2H_j), 4.24 (dd, $J = 8.3, 6.5$ Hz, 2H_f), 3.39 – 3.30 (m, 4H_i), 3.29 – 3.14 (m, 4H_d), 2.47 – 2.32 (m, 2H_g), 2.11 – 1.87 (m, 6H_{g+h}), 1.59 – 1.46 (m, 4H_c), 1.44 – 1.29 (m, 4H_b), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H_a).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 178.72 (COO⁻), 170.41 (C=O), 74.95 (C_j), 61.02 (C_f), 47.39 (C_i), 40.48 (C_d), 32.39 (C_c), 31.32 (C_g), 25.28 (C_h), 21.02 (C_b), 14.01 (C_a).

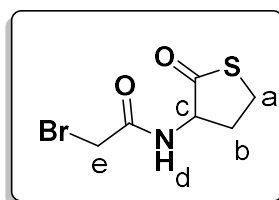
IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3263, 3086, 2960, 2934, 2871, 2823, 1674, 1572, 1358, 1115, 1068, 1031, 682, 613.

7.4 Procedimientos sintéticos y caracterización – Capítulo V

7.4.1 Síntesis del compuesto 4

Se pesa el clorhidrato de tiolactona de DL-homocisteína (9.2 g, 60 mmol, 1 equiv.) y se disuelve en H₂O milli-Q (200 ml) en un matraz de fondo redondo de 500 mL. La disolución se enfría con hielo (0°C) en agitación continua. Posteriormente, se añade K₂CO₃ (25.7 g, 180 mmol, 3 equiv.) lentamente. La mezcla resultante se agita durante 5 min y se añade CH₂Cl₂ (200 ml). Luego de esto, se agrega gota a gota bromuro de bromoacetilo (10.5 mL, 120 mmol, 2 equiv.) disuelto en CH₂Cl₂ (40 mL) durante 1 h. Después de la adición, la mezcla de reacción se deja reaccionar durante 30 min a 0 °C y, seguidamente, a temperatura ambiente durante 60 min. Posteriormente, la fase orgánica se separa y se realizan extracciones con una solución al 5% de ácido cítrico (2 x 40 ml). La fase orgánica se decanta y se lava con H₂O milli-Q (2 x 40 ml). A continuación, la fase orgánica resultante se seca sobre MgSO₄ y se filtra. Finalmente, el disolvente orgánico se evapora y se obtiene el compuesto 4 como un sólido blanco sin purificación adicional (m: 9.88 grs, 70 %).

- **Compuesto 4:** 2-bromo-N-(2-oxotetrahydrothiophen-3-yl)acetamide



¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz) δ (ppm): 7.03 (s, 1H_d), 4.65 – 4.48 (m, 1H_c), 3.85 (s, 2H_e), 3.45 – 3.21 (m, 2H_a), 2.58 (m, 1H_b), 2.24 – 2.06 (m, 1H_b).

¹³C NMR (CD₃CN, 101 MHz): δ (ppm): 205.7 (C=O), 167.4 (C=O), 59.9 (C_c), 31.1 (C_e), 29.4 (C_a), 27.9 (C_b).

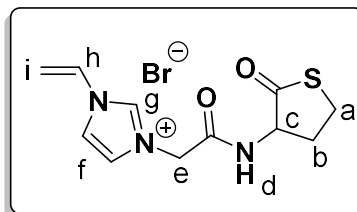
IR (ATR) ν_{máx} (cm⁻¹): 3261, 3060, 3016, 2959, 2944, 2907, 1697, 1656, 1536, 1432, 1324, 1274, 1261, 1178, 1142, 1115, 1059, 1023, 981, 921, 889, 853, 751, 684, 659, 613.

7.4.2 Síntesis del compuesto 5

En un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 mL se pesa el compuesto 4 (7 grs, 29.4 mmoles, 1.1 equiv.) y se disuelve en 120 mL de ACN. Paralelamente, se disuelve el vinilimidazol (2.42 mL, 26.7 mmoles, 1 equiv.) en 25 mL de ACN y se añade gota a gota sobre la primera disolución en agitación. La mezcla resultante se calienta a 50°C durante 16 horas.

Con el transcurso de la reacción, el producto precipita por ser insoluble en ACN. Transcurrido el tiempo, se decanta el ACN y se lava la reacción con ACN (3 x 50 mL). Finalmente, se añade éter etílico y se evapora el disolvente a presión reducida para obtener el compuesto 5 en forma de sólido blanco sin purificación adicional (m: 7.50 grs, 77 %).

Compuesto 5: 3-(2-oxo-2-((2-oxotetrahydrothiophen-3-yl)amino)ethyl)-1-vinyl-1H-imidazol-3-ium bromide



$^1\text{H NMR}$ (MeOD, 400 MHz) δ (ppm): 9.33 (t, $J = 1.4$ Hz, 1H_g), 8.05 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H_f), 7.74 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H_f), 7.31 (dd, $J = 15.6, 8.7$ Hz, 1H_h), 5.96 (dd, $J = 15.6, 2.7$ Hz, 1H_i), 5.48 (dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz, 1H_i), 5.15 (s, 2H_e), 4.73 (dd, $J = 12.8, 7.0$ Hz, 1H_c), 3.54 – 3.33 (m, 2H_a), 2.70 – 2.58 (m, 1H), 2.32 – 2.08 (m, 1H_b).

$^{13}\text{C NMR}$ (MeOD, 101 MHz) δ (ppm): 206.7 (C=O), 166.9 (C=O), 129.7 (C_g), 125.8 (C_f), 120.2 (C_h), 110.3 (C_i), 60.3 (C_c), 52.1 (C_e), 31.5 (C_a), 28.1 (C_b).

IR (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 3142, 3092, 3024, 1706, 1669, 1548, 1369, 1266, 1174, 1018, 978, 928, 852, 788, 757, 699, 626.

7.4.3 Estudio cinético de apertura en DMSO- d_6

En un tubo de RMN con septum se prepara una disolución del compuesto 5 (250 mg, 0.75 mmol, 1 equiv.) en 1 mL de DMSO- d_6 (previamente secado con MgSO_4 anhidro) y se adiciona la 3-dimetilaminopropilamina (96 μL , 0.75 mmol, 1 equiv). Una vez añadida la amina, se adquieren diversos espectros de ^1H -RMN a 30 °C en diferentes tiempos de reacción (5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 1h, 3h, 5h y 24h) y durante el periodo de tiempo de no adquisición el tubo se transfiere a un vial para proporcionar agitación continua a la disolución de estudio.

7.4.4 Estudio cinético del fotopolimerización en DMSO- d_6

En un vial de 12 mL se pesa el compuesto 5 (250 mg, 0.75 mmol, 1equiv.) y se disuelve en 1 mL de DMSO- d_6 (previamente secado con MgSO_4 anhidro). Seguidamente, se adiciona la

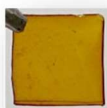
amina 3-dimetilaminopropilamina (96 μ L, 0.75 mmol, 1 equiv) y se deja en agitación durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, 2.5 mg del fotoiniciador DMPA (1% en peso respecto del compuesto 5, 0.5 % mol) se añaden y se disuelven en la mezcla de reacción. La mezcla resultante se transfiere a un tubo de RMN con septum y se irradia la luz ultravioleta de 365 nm. De este modo, se adquieren diversos espectros de ^1H -RMN a 30 °C en diferentes tiempos de exposición (30 s, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 10 min y 30 min) y durante el periodo de tiempo de no adquisición el tubo se cubre en ausencia de luz.

7.4.5 Procedimiento para la preparación de membranas poliméricas

En un vial de 12 mL se pesa el compuesto 5 (750 mg, 2.25 mmol, 1equiv.) y se disuelve en 3 mL de una mezcla DMF:H₂O (1:1). Seguidamente, las cantidades de amina se añaden según la composición y la mezcla resultante se deja 24 horas en agitación para asegurar que la apertura de la tiolactona es completa. Transcurrido este tiempo, 7.5 mg del fotoiniciador DMPA (1% en peso respecto del compuesto 5, 0.5 % mol) se pesan y se disuelven en 200 μ L de DMF que se añade sobre la disolución inicial. Posteriormente, la disolución se deposita sobre un molde de silicona y se distribuye uniformemente. Después de esto, se dispone a la luz ultravioleta de 365 nm durante 30 minutos para llevar a cabo la polimerización de la disolución. Seguidamente, los moldes se colocan en una estufa a 45°C con pentóxido de fósforo durante 24 horas para secar la membrana polimerizada de forma lenta y que no se contraiga sin perder el diámetro del molde utilizado. Transcurrido este tiempo, se extrae de la estufa y se deja 2 horas a temperatura ambiente para facilitar la separación de la membrana. Una vez la membrana se separa del molde, se deposita sobre papel vegetal y se vuelve a introducir en estufa a 60°C durante 24 horas.

7.4.6 Figuras suplementarias del capítulo V

Composición T-1



LiCl (11%)

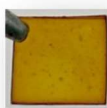
K₂CO₃ (40%)

NaBr (60%)

NH₄Cl (80%)

K₂SO₄(98%)

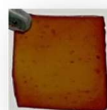
➤ 1h



➤ 2h



➤ 5h



➤ 24



S.5.1. Respuesta colorimétrica de membrana de composición T-1 en diferentes RH (%).

Composición T-3



LiCl (11%)

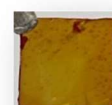
K₂CO₃ (40%)

NaBr (60%)

NH₄Cl (80%)

K₂SO₄(98%)

➤ **1h**



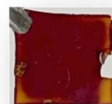
➤ **2h**



➤ **5h**



➤ **24h**



S.5.2. Respuesta colorimétrica de membrana de composición T-3 en diferentes RH (%).

Composición T-4



LiCl (11%)

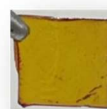
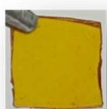
K₂CO₃ (40%)

NaBr (60%)

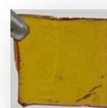
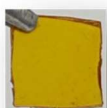
NH₄Cl (80%)

K₂SO₄(98%)

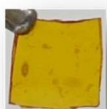
➤ 1h



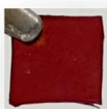
➤ 2h



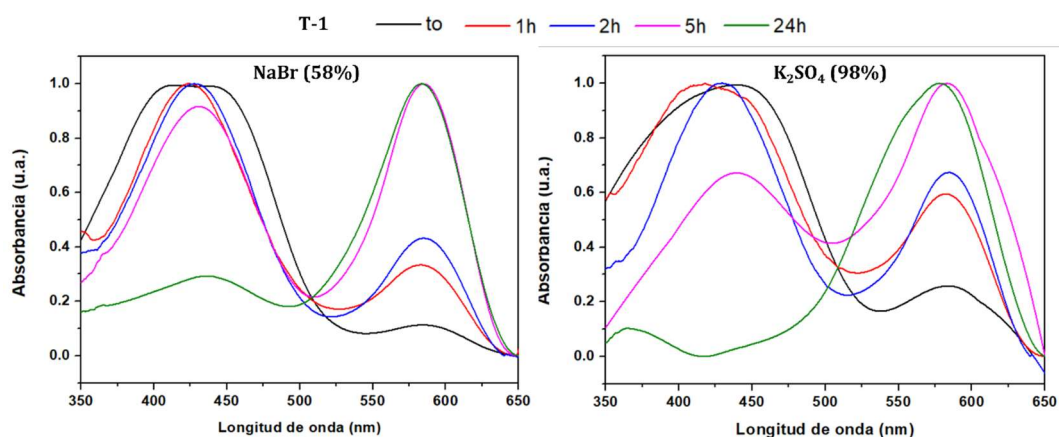
➤ 5h



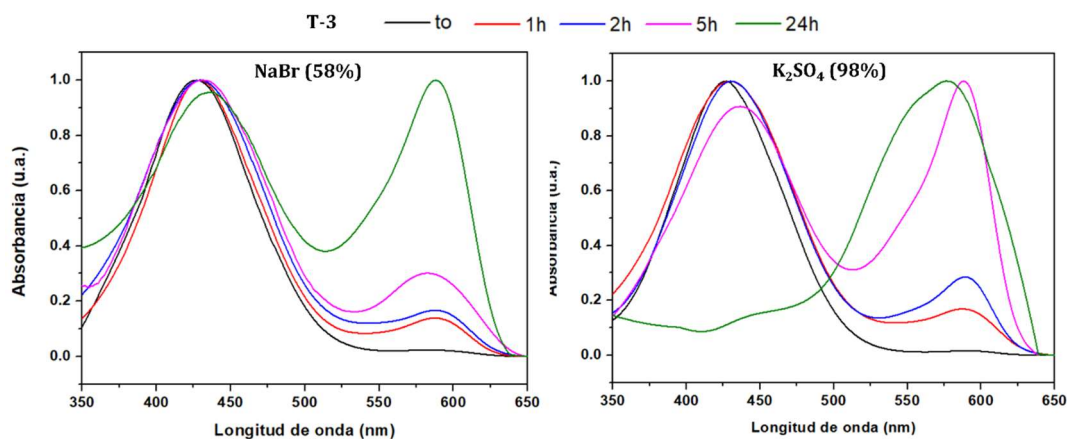
➤ 24h



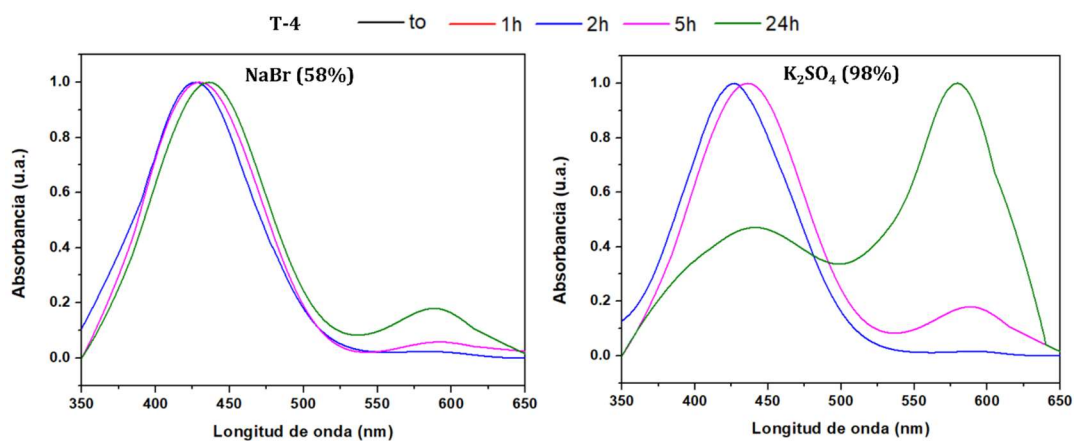
S.5.3. Respuesta colorimétrica de membrana de composición T-4 en diferentes RH (%).



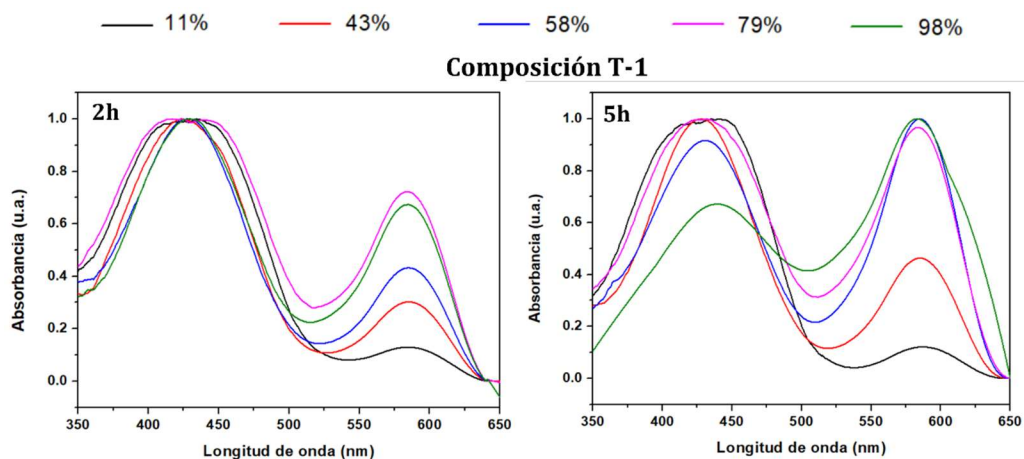
S.5.4. Cambios en las curvas espectrales asociados al efecto de la humedad para la membrana T-1 en entorno de 58 % (izquierda) y 98 % (derecha).



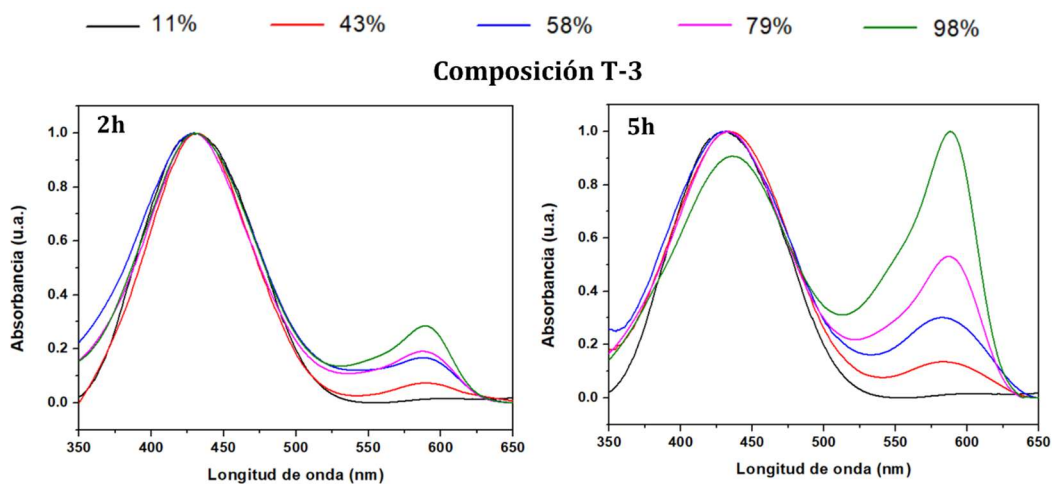
S.5.5. Cambios en las curvas espectrales asociados al efecto de la humedad para la membrana T-3 en entorno de 58 % (izquierda) y 98 % (derecha).



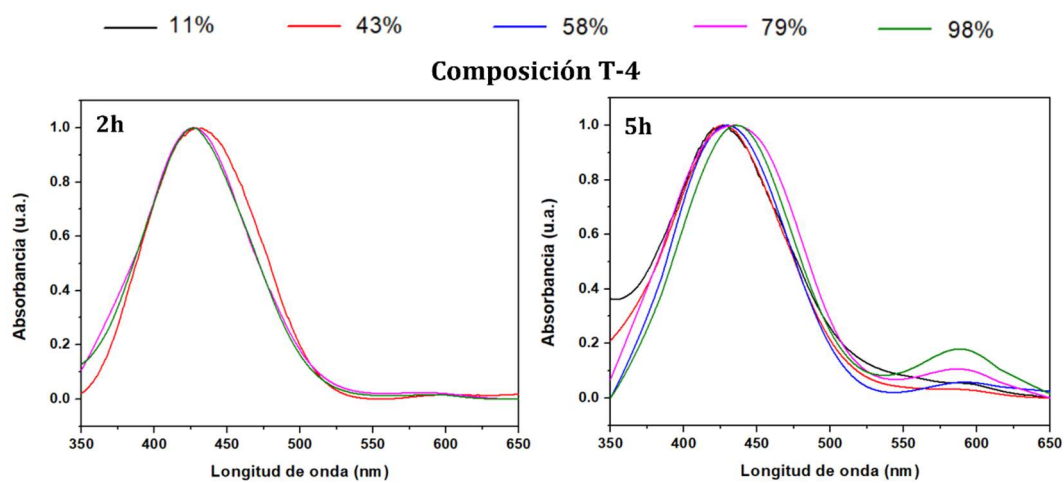
S.5.6. Cambios en las curvas espectrales asociados al efecto de la humedad para la membrana T-4 en entorno de 58 % (izquierda) y 98 % (derecha).



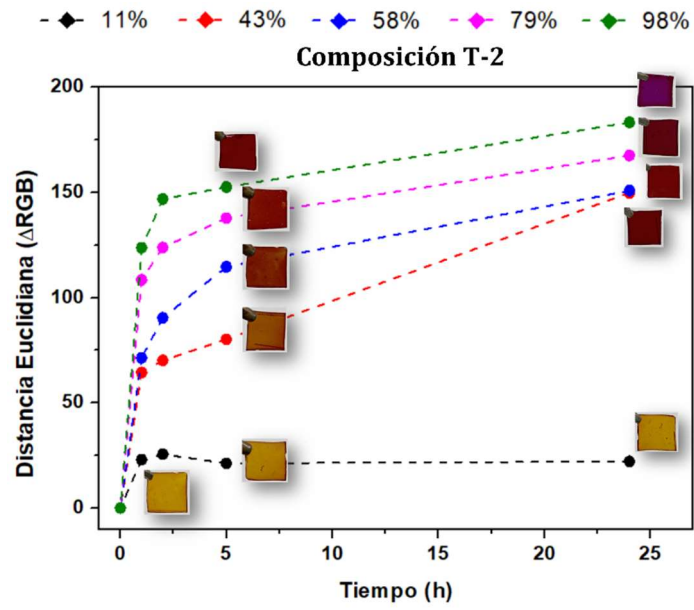
S.5.7. Efecto de la humedad relativa controlada en la cinética de cambio del espectro de absorción para la composición T-1.



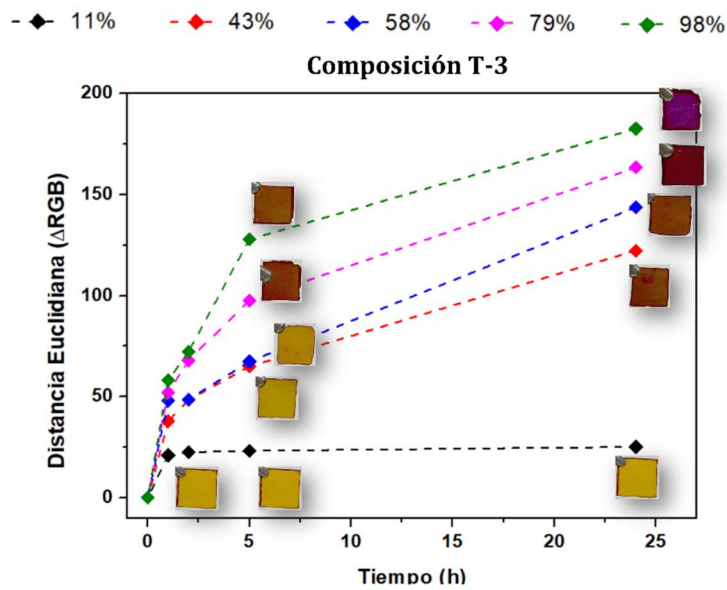
S.5.8. Efecto de la humedad relativa controlada en la cinética de cambio del espectro de absorción para la composición T-3.



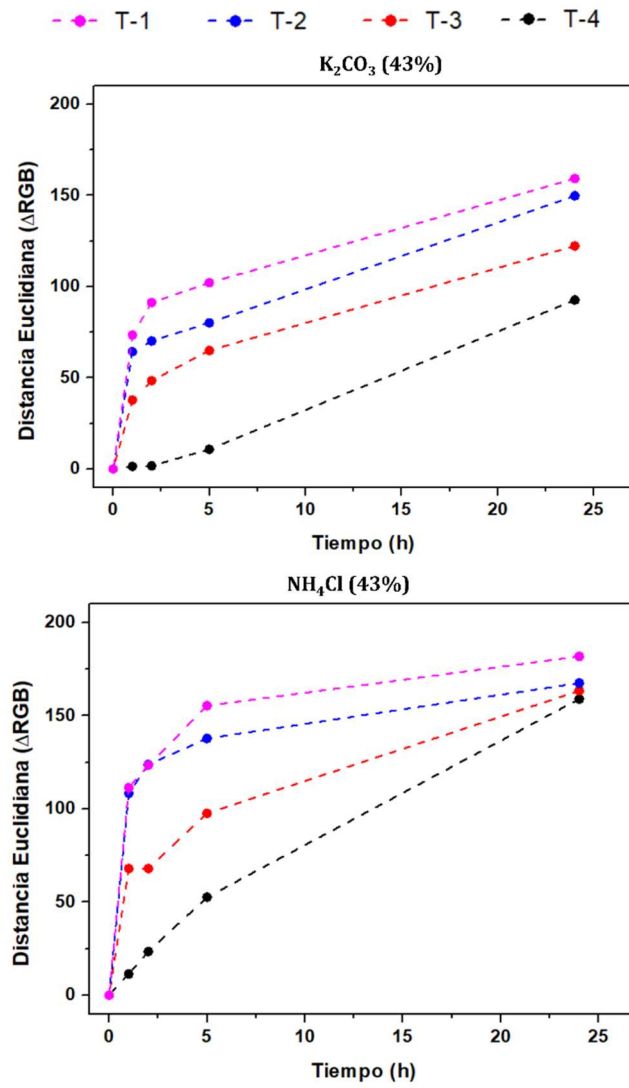
S.5.9. Efecto de la humedad relativa controlada en la cinética de cambio del espectro de absorción para la composición T-4.



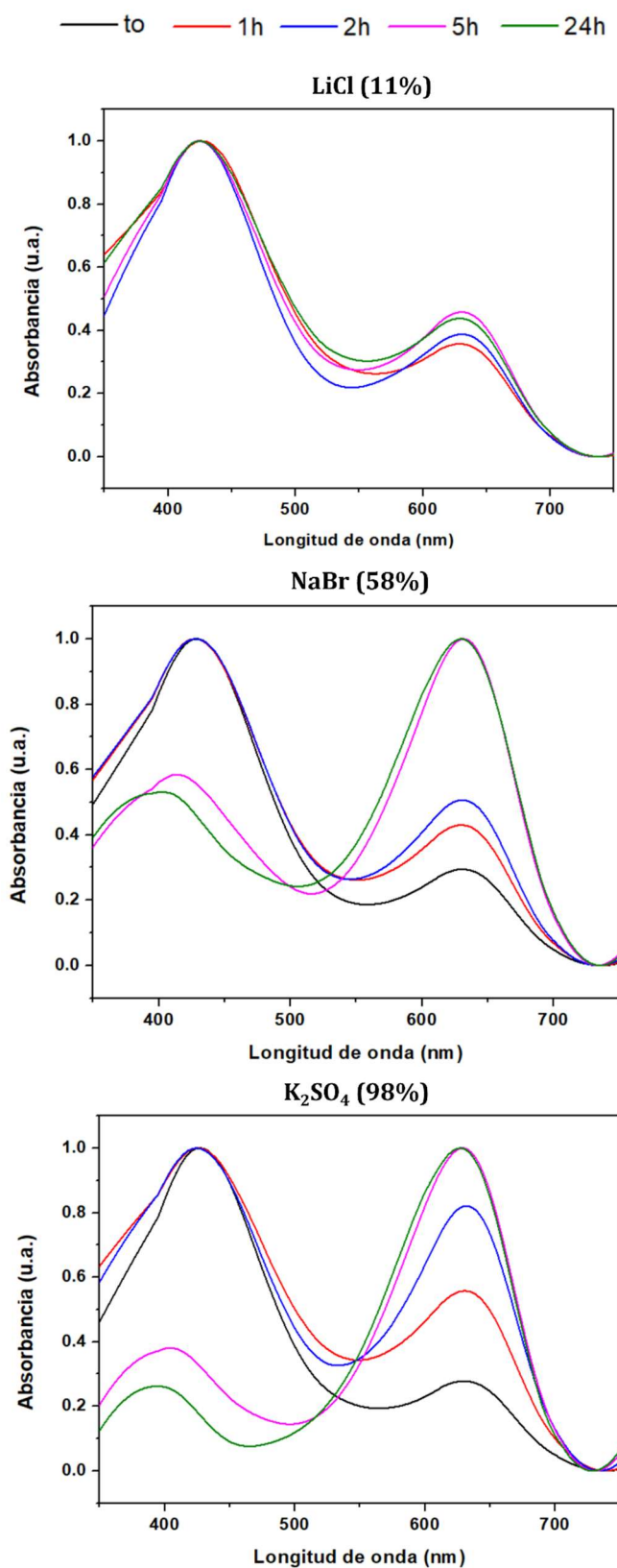
S.5.10. Análisis de las componentes del color RGB en diferentes RH (%) para composición T-2.



S.5.11. Análisis de las componentes del color RGB en diferentes RH (%) para composición T-3.



S.5.12. Análisis RGB en diferentes RH (%) para membranas de composición variada.



S.5.13. Efecto de la humedad relativa controlada en la cinética de cambio del espectro de absorción para la composición T-5.

7.5 Procedimientos sintéticos y caracterización – Capítulo VI

7.5.1 Procedimiento general para la impresión 3D de discos

El tanque de la impresora se llena con 200 mL de una solución monomérica que contiene 50 % en peso (100 mL) de metacrilato de glicidilo (GMA), 40 % en peso (80 mL) de dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) y 10 % en peso de la tinta de fotopolímero translúcido comercial. Esta solución contiene un 2% en peso (2 grs) del fotoiniciador (óxido de fenil-bis-(2,4,6-trimetilbenzoil)fosfina) respecto a GMA. La estructura 3D se obtiene según el diseño digital descargado en la impresora y diseñado con el programa “Autocad”. Una vez impresa la estructura 3D, se extraen los discos de la plataforma, se lavan con IPA (3 x 25 mL) y se curan a 60°C durante 24 h.

Parámetros de impresión 3D

Discos: Tiempo de exposición de 120 s, tiempo de fondo de 120 s, tiempo de impresión total de 17 min.

7.5.2 Procedimiento general para la preparación de SILs

SIL-MET

En un vial de 12 mL se prepara una disolución con 1-metilimidazol (292 μ L, 3.6 mmol, 1 equiv.) y HCl concentrado (300 μ L, 3.6 mmol, 1 equiv.). Dicha disolución se diluye en 1.4 mL de EtOH y se introduce el disco impreso por 3D y funcionalizado con grupos epóxido. La mezcla de reacción se deja en contacto con el polímero a temperatura ambiente y bajo agitación orbital (125 rpm) durante 24 h. Finalmente, el disco 3D se lava con IPA (3 x 25 mL) y se seca a 60 °C durante 24 h.

SIL-BUT

En un vial de 12 mL se prepara una disolución con 1-butilimidazol (485 μ L, 3.6 mmol, 1 equiv.) y HCl concentrado (300 μ L, 3.6 mmol, 1 equiv.). Dicha disolución se diluye en 1.2 mL de EtOH y se introduce el disco impreso por 3D y funcionalizado con grupos epóxido. La mezcla de reacción se deja en contacto con el polímero a temperatura ambiente y bajo agitación orbital (125 rpm) durante 24 h. Finalmente, el disco 3D se lava con IPA (3 x 25 mL) y se seca a 60 °C durante 24 h.

SIL-DEC

En un vial de 12 mL se prepara una disolución con 1-decil-2-metilimidazol (905 μL , 3.6 mmol, 1 equiv.) y HCl concentrado (300 μL , 3.6 mmol, 1 equiv.). Dicha disolución se diluye en 0.8 mL de EtOH y se introduce el disco impreso por 3D y funcionalizado con grupos epóxido. La mezcla de reacción se deja en contacto con el polímero a temperatura ambiente y bajo agitación orbital (125 rpm) durante 24 h. Finalmente, el disco 3D se lava con IPA (3 x 25 mL) y se seca a 60 °C durante 24 h.

7.5.3 Procedimiento para la inmovilización de sonda colorimétrica en SILs

Se pesan 2 mg de la sonda colorimétrica o indicador de pH seleccionado y se disuelve en 10 mL de una mezcla de H₂O:Acetona (3:7). Posteriormente, se introduce el disco 3D y se deja en contacto con el SIL a temperatura ambiente y bajo agitación orbital (125 rpm) durante 30-60 minutos. A continuación, el disco se extrae y se introduce en una mezcla mixta (10 mL) de HCl 2.5M: Acetona (4:1) bajo agitación orbital (125 rpm) durante 30 minutos. Finalmente, el disco se extrae de la disolución y se seca sobre papel.

7.5.4 Procedimiento para la inmovilización covalente

En un vial de 12 mL se pesan 10 mg de amarillo de nitrazina y se añaden 5 mL de H₂O milli-Q y 5 mL de una disolución comercial de 50% v/v de BF₃(OEt)₂. Posteriormente, se introduce el disco impreso por 3D y funcionalizado con grupos epoxi. La mezcla de reacción se deja en contacto con el polímero a temperatura ambiente y bajo agitación orbital (125 rpm) durante 24 h. Finalmente, el disco 3D se lava con MeOH (10 mL) y se seca sobre papel.

7.5.5 Procedimiento para el estudio de respuesta a aminas volátiles

En un vial de 20 mL con septum se dispone el disco 3D con la sonda inmovilizada y se sella el vial. Posteriormente, se añaden 100 μL de NH₄Cl de una concentración determinada y se adicionan 100 μL de NaOH 2M. Una vez añadida la base, se adquieren imágenes fotográficas en diferentes intervalos de tiempo a medida que se produce la evolución de NH₃ (g) y se produce el cambio de color.