

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 991**

21 Número de solicitud: 201300554

51 Int. Cl.:

G01N 27/413 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

12.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.12.2014

Fecha de la concesión:

22.12.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

04.01.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE BURGOS (100.0%)
C/ Hospital del Rey s/n
09001 Burgos (Burgos) ES**

72 Inventor/es:

**MOLINERO ABAD , Begoña;
ALONSO LOMILLO , María Asunción ;
DOMÍNGUEZ RENEDO , Olga ;
JAUREGUIBEITIA , Arrate y
ARCOS MARTÍNEZ , María Julia**

54 Título: **Dispositivo electródico para la detección de sulfitos, procedimiento de fabricación y uso de dicho dispositivo**

57 Resumen:

Dispositivo electródico para la detección de sulfitos, con tres electrodos, uno de referencia, otro de trabajo y otro auxiliar, obtenidos todos los electrodos por serigrafía, el área activa del electrodo de referencia incluye tinta de plata/cloruro de plata, la del contraelectrodo tinta de carbono y la del electrodo de trabajo con una tinta de carbono que incorpora tetratiafulvaleno (TTF) al 3%, sobre una lámina plástica de poliéster, modificándose el área activa del de trabajo con la enzima sulfito oxidasa (SOx) en su superficie mediante entrecruzamiento con glutaraldehído (GA) y seroalbúmina bovina (BSA), así como su procedimiento de fabricación y su uso en la detección citada, de manera simple, con bajo coste y en relativo corto tiempo de análisis.

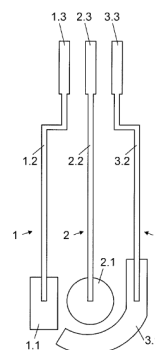


Fig.2

ES 2 524 991 B2

DESCRIPCIÓN

Dispositivo electródico para la detección de sulfitos, procedimiento de fabricación y uso de dicho dispositivo

OBJETO DE LA INVENCION

5 La presente invención se enmarca en el campo de la electroquímica aplicada al análisis químico.

Así, la presente invención se refiere a un dispositivo constituido por un sistema electródico para la detección de sulfito, con tres electrodos, obtenidos todos los electrodos por serigrafía, modificándose uno de ellos posteriormente con una enzima, así como su procedimiento de fabricación y condiciones de uso en la detección citada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Las celdas electroquímicas son de gran interés en el análisis de sustancias debido a su robustez, fabricación sencilla y económica.

Una de las técnicas más utilizadas para la fabricación de los electrodos que se utilizan en las celdas electroquímicas es la serigrafía. Esta técnica permite construir sensores químicos con una reproducibilidad y una infraestructura mínima.

La serigrafía es un método de impresión directa, también llamado de impresión por penetración. La deposición de tintas se realiza capa a capa sobre un sustrato. La calidad de los sensores químicos así fabricados depende, en gran medida, de los materiales utilizados.

25 Mediante la tecnología de electrodos serigrafiados es posible la miniaturización de los sensores ofreciendo la ventaja de ser versátiles, pueden ser fabricados con distintas configuraciones de electrodos y con diferentes tintas, y tener bajo coste pudiendo así prestarse para la producción en masa de electrodos desechables. Además pueden ser utilizados para análisis in situ.

30 Para aumentar la selectividad de los electrodos se modifican por diferentes métodos, por ejemplo inmovilizando una sustancia, frecuentemente un enzima, en su superficie que responda selectivamente a determinados analitos. La selectividad y la acción catalítica de las reacciones enzimáticas potencian la selectividad y sensibilidad de los dispositivos.

35 El método de inmovilización es muy importante ya que condiciona la sensibilidad y estabilidad del sensor.

40 El método más común y generalizado para el análisis de sulfito fue desarrollado por Monier-Williams, quien utilizó una técnica de valoración clásica, procedimiento que requiere bastante tiempo. También se han utilizado otros métodos como espectrofotometría, electroforesis capilar y cromatografía. Sin embargo, estos procedimientos tienen algunas desventajas, tales como alto coste, tiempos de análisis largos y en algunos casos es necesario un pretratamiento de la muestra, que los hace inadecuados para el análisis de rutina. Las técnicas electroquímicas han sido también tradicionalmente empleadas para la detección de sulfito. Principalmente se han utilizado electrodos de pasta de carbón vítreo. Los problemas típicos asociados con estos procedimientos han sido el envenenamiento de los electrodos, que conducen a una pérdida en la sensibilidad. Además los altos potenciales a pie se opera inciden en la selectividad debido a la gran sobretensión aplicada para controlar la oxidación de sulfito. Con el fin de mejorar ambos

factores, estos electrodos han sido modificados por complejos metálicos o agentes biológicos. En general, los biosensores se han desarrollado utilizando enzimas sulfito oxidasa (SOx) inmovilizados sobre diferentes electrodos, tales como oro, platino o carbono. Para la modificación de los electrodos se han utilizado tanto nanomateriales (nanopartículas de oro, quitosan, nanopartículas magnéticas recubiertas de oro, ITO, nanotubos de carbono multicapa) como polímeros (polianilina, polipirrol), sin que estos dispositivos hayan solucionado por completo los problemas aludidos.

El mecanismo de medición de sulfito utilizando un biosensor enzimático se basa en el seguimiento de la reacción, catalizada por SOx en la que los sitios activos del molibdeno en SOx, pasan por estados de oxidación y de reducción durante la oxidación catalítica de sulfito a sulfato. La detección indirecta de sulfito se puede lograr por distintos métodos como detectar el agotamiento de oxígeno o la generación de peróxido, siendo este último el método más sencillo aunque presenta nuevamente el inconveniente del gran sobrepotencial que se requiere generalmente.

La utilización de mediadores, añadidos a la celda electroquímica junto con el electrolito soporte, permite disminuir el potencial de uso, contribuyendo a evitar interferencias, y han sido frecuentemente utilizados. El potencial redox del tetratiafulvaleno (TTF) en torno a 100 mV, permite su utilización como mediador en el campo de los biosensores electroquímicos con resultados óptimos. Sin embargo, la insolubilidad de esta sustancia ha limitado su uso a las disoluciones no acuosas. Este problema se puede solventar incorporando el TTF a la tinta de serigrafiado, originando así una pasta conductora con mediador incorporada para el serigrafiado directo del electrodo de trabajo.

En el biosensor propuesto, el enzima sulfito oxidasa en adelante (SOx), interacciona específicamente con el sulfito catalizando su oxidación a sulfato. La inmovilización de este enzima sobre un electrodo serigrafiado permite poner a punto un dispositivo que aúna las ventajas de los dispositivos electrónicos serigrafiados desechables con el uso de enzimas específicos para la detección de sulfito.

La presente invención solventa las desventajas de los dispositivos electrónicos conocidos, y presenta gran simplicidad, bajo coste y corto tiempo de análisis, comparado con otras técnicas, por lo que supone un gran avance en su empleo para la determinación de sulfitos en distintos tipos de muestras, como por ejemplo muestras de vino.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención queda establecida y caracterizada en las reivindicaciones independientes, mientras que las reivindicaciones dependientes describen otras características de la misma.

El objeto de la invención es un dispositivo electrónico, su procedimiento de fabricación y uso del mismo para la detección de sulfitos. El problema a resolver es constituir el dispositivo, llevar a cabo su fabricación y usarlo, todo ello de manera simple, con bajo coste y en relativo corto tiempo de análisis, comparado con las técnicas conocidas.

A la vista de lo anteriormente enunciado, la presente invención se refiere a un dispositivo electrónico para la detección de sulfitos en distintos tipos de muestras alimentarias, obtenido por serigrafía, caracterizado por que comprende tres electrodos, cada electrodo consta de un contacto, un tramo y un área activa, siendo un electrodo de trabajo, uno auxiliar o contraelectrodo, y otro de referencia, constituidos todos los electrodos por serigrafía de una tinta de materiales conductores sobre una lámina plástica de poliéster. Las vías conductoras se

han impreso con una tinta conductora de Ag, el de referencia con una tinta de Ag/AgCl en el área activa, el área activa del contraelectrodo con una tinta de carbono y el área activa del electrodo de trabajo también con una tinta de carbono a la que se ha incorporado previamente tetratiafulvaleno (TTF) al 3%, y que se modifica posteriormente de manera que se inmoviliza el enzima sulfito oxidasa (SOx) en su superficie utilizando un agente bifuncional como el glutaraldehído (GA), mediante entrecruzamiento, en presencia de seroalbúmina bovina (BSA).

Opcionalmente el dispositivo incluye un aislante que cubre el dispositivo, dejando libre los contactos y aéreas activas de los electrodos.

Asimismo, la presente invención se refiere a un proceso de fabricación del dispositivo anteriormente mencionado que comprende las siguientes etapas:

-serigrafiado de una lámina de poliéster con tinta de plata con las formas de los contactos y los tramos de los tres electrodos

- serigrafiado del área activa del electrodo de referencia con Ag/AgCl,

- serigrafiado del área activa del contreelectrodo con una pasta de carbono,

- serigrafiado de un aislante cubriendo el dispositivo, excepto las áreas activas de los electrodos y los bornes,

- serigrafiado del área activa de uno de los electrodos con pasta de carbono a la que se ha incorporado TTF,

- modificación del área activa de uno de los electrodos mediante inmovilización del enzima sulfito oxidasa (SOx) en su superficie mediante entrecruzamiento con glutaraldehído (GA) y seroalbúmina bovina (BSA).

Y, la presente invención se refiere al uso del dispositivo anteriormente mencionado con la opción del aislante pie comprende las siguientes etapas:

- introducción del dispositivo en una celda electroquímica que contiene 5 mL de una disolución tampón de dihidrogenofosfato sódico con pH 6, 50 mM y KCl 100 mM, termostatzada a 40°C,

- unión de los contactos de los electrodos a un potencióstato,

- aplicación de un potencial de 0.200 V entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo,

- espera a estabilización de corriente,

- adición de 100 µL de disolución problema de sulfito objeto de análisis,

- sucesivas adiciones de 100 µL de disolución patrón de sulfito,

- registro de las intensidades de corriente,

- representación de la recta de calibrado,

- extrapolación de dicha recta de calibrado para calcular la concentración de sulfito en la muestra problema.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Se complementa la presente memoria descriptiva, con un juego de figuras, ilustrativas del ejemplo preferente y nunca limitativas de la invención.

5

La figura 1 muestra el esquema de la reacción electroquímica en la que interviene el mediador TTF y la enzima.

La figura 2 representa una vista en alzado de los electrodos sin aislante.

10

La figura 3 representa una vista en alzado de los electrodos con un aislante.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la realización aquí detallada y mostrada en las figuras, la invención se refiere a un dispositivo electroquímico para la detección de sulfito, con tres electrodos (1, 2, 3), obtenidos todos los electrodos por serigrafía, uno de ellos, el de trabajo (2) incorporando un mediador a la pasta, y modificándose posteriormente con un enzima, así como su procedimiento de fabricación y su uso en la detección citada.

Como la técnica serigráfica implica el uso de materiales concretos y da lugar a la configuración geométrica concreta del dispositivo, la exposición de dicha técnica de fabricación sirve asimismo de explicación de la configuración del dispositivo, pudiendo ir ligadas ambas, configuración y técnica o procedimiento de fabricación, durante la presente exposición detallada de la invención.

25

El mecanismo de reacción transcurre de acuerdo con el esquema mostrado en la figura 1. El sulfito se oxida en presencia de sulfito oxidasa (SOx) hasta sulfato. El enzima reducido se oxida en presencia del mediador, tetratíofulvaleno (TTF), que a su vez se recupera por reducción en el electrodo, originando una corriente proporcional a la concentración de sulfito en la muestra.

30

La invención se refiere al dispositivo, procedimiento de fabricación y de uso de un dispositivo de tres electrodos (1, 2, 3) desechables, serigrafiados en un soporte de poliéster, en concreto politereftalato de etileno (PET), cuya disposición espacial permite el rápido análisis "in situ" de pequeños volúmenes de muestra por técnicas electroquímicas.

35

El dispositivo consta de tres electrodos serigrafiados (1, 2, 3): electrodo de referencia (1), electrodo de trabajo (2) y electrodo auxiliar (3) o contraelectrodo.

Los electrodos tienen tres zonas o partes diferenciadas: los contactos (1.3, 2.3, 3.3) o bornes, para su conexión a un potencióstato de los conocidos; las aéreas activas (1.1, 2.1, 3.1), en contacto directo con la muestra a analizar y los tramos (1.2, 2.2, 3.2), como unión entre contactos (1.3, 2.3, 3.3) y las aéreas activas (1.1, 2.1, 3.1).

El procedimiento de fabricación, serigrafiado, del dispositivo se lleva a cabo con la ayuda de una serie de pantallas, moldes o patrones de serigrafado en las que aparece, en una superficie porosa, el esquema del motivo a imprimir que definirá el dispositivo.

Los patrones son como sigue:

50

- El primer patrón se utiliza para formar, serigrafiando con pasta comercial conductora de plata, los contactos (1.3, 2.3, 3.3) y los tramos (1.2, 2.2, 3.2) de los electrodos (1, 2, 3). Es decir, se

crea la base conductora eléctrica del dispositivo. Después de su aplicación esta capa debe curarse durante 20 minutos a 120 °C.

5 -El segundo patrón está diseñado para la obtención del área activa (1.1) del electrodo de referencia (1) . Para su formación se imprime un producto comercial a base de Ag/AgCl sobre la base conductora en la zona del área activa de dicho electrodo, que posteriormente se somete a un proceso de curación en las mismas condiciones, 20 minutos a 120 °C.

10 - El tercer patrón se utiliza para constituir el área activa (3.1) del contraelectrodo (3), serigrafiando pasta de carbono comercial. Tras su aplicación se somete a un curado de 60°C durante 30 minutos.

15 - El cuarto patrón es una capa de tinta aislante (4) que cubre el dispositivo, dejando libre los contactos (1.3, 2.3, 3.3) y áreas activas (1.1, 2.1, 3.1) de los electrodos. La correcta formación de esta capa aislante (4) exige la curación a 80°C durante 30 minutos.

20 -Por último el quinto patrón permite la impresión del área activa (2.1) del electrodo de trabajo (2) utilizando una tinta comercial de carbono a la que se ha incorporado TTF al 3%. El proceso de incorporación se lleva a cabo mezclando mecánicamente las cantidades adecuadas

25 En esta realización, los contactos (1.3, 2.3, 3.3), los tramos (1.2, 2.2, 3.2) y el área activa del electrodo de referencia (1) es de geometría rectangular, el de trabajo (2) circular y el contraelectrodo (3) tiene forma arqueada envolvente de los otros dos electrodos. Las mejores dimensiones del área activa (1.1) del electrodo de referencia del dispositivo corresponden a 2 mm de anchura por 4 mm de longitud.

Para el electrodo de trabajo (2) la mejor dimensión probada de su área activa (2.1) corresponde a un círculo de 4.5 mm de diámetro.

30 En cuanto al contraelectrodo (3) las mejores dimensiones de su área activa (3.1) son una anchura entre 1,4 y 1,5 mm, un tramo recto de entre 3 y 5 mm, que conecta con un arco de radio entre 3 y 5 mm.

35 La inmovilización del enzima SOx sobre el electrodo de trabajo (2) se realiza de acuerdo con el siguiente procedimiento: se adiciona sobre el electrodo 1 µL de una disolución de BSA (3% peso/volumen), 3 µL de una solución de glutaraldehído (GA) al 5% y 1 µL de una disolución SOx. El electrodo se deja inmovilizando durante 60 minutos, se lava con tampón fosfato tras el cual ya está listo para realizar medidas cronoamperométricas. Igualmente puede dejarse inmovilizado a una temperatura de 4°C, hasta nuevo uso.

40 Para poner en funcionamiento el dispositivo, se unen las partes superiores conductoras (1.3, 2.3, 3.3) de cada uno de los electrodos (1, 2, 3) con los bornes de salida de un potencióstato a través de unas conexiones eléctricas. A través de este y de acuerdo con la técnica seleccionada para llevar a cabo la determinación amperométrica, se impone una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo (2) y el contraelectrodo (3) y se registra la intensidad que se origina en el circuito debido a las reacciones electroquímicas que la perturbación de potencial provoca, con la adición de sulfito y que va a permitir poner de manifiesto la presencia de los analitos.

50 Para llevar a cabo la determinación de una muestra problema de sulfito, se parte de la celda electroquímica que contiene 5 mL de una solución tampón de dihidrogenofosfato sódico (pH= 6), 50 mM y KCl 100 mM. A continuación se conecta el potencióstato a los contactos (1.3, 2.3, 3.3) de los electrodos y se aplica un potencial de -0.200 V entre el electrodo de trabajo (2)

5 y el contraelectrodo (3) . En ese momento se aprecia una intensidad de corriente alta que se estabiliza pasados unos minutos. Cuando se obtiene una señal estable de la intensidad de la corriente, se lleva a cabo una adición de 100 μL de disolución problema de sulfito un incremento de intensidad debido al proceso de reacción electroquímica experimentado. A continuación se hacen sucesivas adiciones de 100 μL de disolución de sulfito 10^{-3} M en un rango de concentración de 19.6 hasta 167.7 μM dependiendo de las características de la muestra, observándose sucesivos saltos de intensidad.

10 Se obtiene la recta de calibración correspondiente. Se calculan las intensidades de las sucesivas adiciones y estos valores se representan frente a la concentración originando una recta cuya intersección con el eje de abscisas permite obtener, por extrapolación, la concentración de la muestra problema en molaridad que posteriormente se transforma en molaridad teniendo en cuenta el volumen de la muestra de partida.

15

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo electródico para la detección de sulfitos obtenido por serigrafía **caracterizado** por que comprende tres electrodos (1, 2, 3) , cada electrodo consta de un contacto o borne (1.3, 2.3, 3.3), un tramo (1.2, 2.2, 3.2) y un área activa (1.1, 2.1, 3.1), siendo uno de referencia (1) ,
 5 otro de trabajo (2) , y otro auxiliar o contraelectrodo (3) , constituidos los bornes (1.3, 2.3, 3.3) y los tramos (1.2, 2.2, 3.2) con una tinta de plata, el área activa del electrodo de referencia (1.1) con una tinta de plata/cloruro de plata, el área activa del contraelectrodo (3.1) con una tinta de carbono y el área activa del electrodo de trabajo (2.1) con una tinta de carbono que incorpora tetratiafulvalento (TTF) al 3%, sobre una lámina plástica de poliéster, estando el electrodo de
 10 trabajo (2) modificado de manera que se inmoviliza el enzima sulfito oxidasa (SOx) en su superficie mediante entrecruzamiento con glutaraldehído (GA) y seroalbúmina bovina (BSA).
2. Dispositivo electródico según la reivindicación 1 que incluye un aislante (4) que cubre el dispositivo, dejando libre los contactos (1.3, 2.3, 3.3) y aéreas activas (1.1, 2.1, 3.1) de los
 15 electrodos (1, 2, 3).
3. Dispositivo electródico según la reivindicación 1 en el que los contactos (1.3, 2.3, 3.3), los tramos (1.2, 2.2, 3.2) y el área activa (1.1) del electrodo de referencia (1) tienen forma rectangular.
 20
4. Dispositivo electródico según la reivindicación 3 en el que el área activa (1.1) del electrodo de referencia tiene forma rectangular de 2 mm de anchura par 4 mm de longitud.
5. Dispositivo electródico según la reivindicación 3 en el que el área activa (2.1) del electrodo de 5 trabajo (2) es un círculo de 4.5 mm de diámetro.
6. Dispositivo electródico según la reivindicación 3 en el que el área activa (3.1) del contraelectrodo (3) tiene una anchura entre 1,4 y 1,5 mm, un tramo recto de entre 3 y 5 mm, que conecta con un arco de radio entre 3 y 5 mm.
 30
7. Proceso de fabricación del dispositivo según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- serigrafiado de una lámina de poliéster con tinta de plata con las formas de los contactos (1.3, 2.3, 3.3) y los tramos (1.2, 2.2, 3.2) de los tres electrodos (1, 2, 3), 20
 - serigrafiado del área activa (1.1) del electrodo de referencia (1) con Ag/AgC1,
 - serigrafiado del área activa (3.1) del conrelectrodo (3) can una pasta de carbono,
 - 40 - serigrafiado de un aislante (4) cubriendo el dispositivo excepto el área activa (1.2, 2.2, 3.2) de los electrodos (1, 2, 3) y los bornes (1.1, 2.1, 3.1) de los electrodos (1, 2, 3),
 - serigrafiado del área activa (2.1) del electrodo de trabajo (2) con una pasta de carbono a la que se ha incorporado TTF al 3%,
 - 45 - modificación del área activa (2.1) del electrodo de trabajo (2) mediante inmovilización del enzima sulfito oxidasa (SOx) en su superficie mediante entrecruzamiento con glutaraldehído (GA) y seroalbúmina bovina (BSA).
 - 50
8. Proceso de fabricación según la reivindicación 7 en el que la inmovilización del enzima SOx sobre el electrodo de trabajo (2) se realiza adicionando sobre el electrodo 1 μ L de una

disolución de BSA en 3% peso/volumen, 3 μ L de una solución de glutaraldehído (GA) al 5% y 1 μ L de una disolución SO_x, dejando el electrodo inmovilizando durante 60 minutos a 4°C, posteriormente se lava con tampón fosfato.

- 5 9. Uso del dispositivo según las reivindicaciones y 2 **caracterizado por** que comprende las siguientes etapas:
- 10 - introducción del dispositivo en una celda electroquímica que contiene 5 mL de una solución tampón de dihidrogenofosfato sódico con pH 6.0, 50 mM y KC1 100 mM, termostatzada a 40°C,
- unión de los contactos (1.3, 2.3, 3.3) de los electrodos a un potencióstato,
- 15 - aplicación de un potencial de 0.200 V entre el electrodo de trabajo (2) y el contraelectrodo (3),
- espera a estabilización de corriente,
- adición de un volumen 100 μ L de disolución problema que contiene sulfito,
- 20 - sucesivas adiciones 100 μ L de disolución de patrón de sulfito,
- registro de las intensidades de corriente,
- representación de la recta de calibrado,
- 25 - extrapolación de dicha recta de calibrado para calcular la concentración de sulfito en la muestra problema.

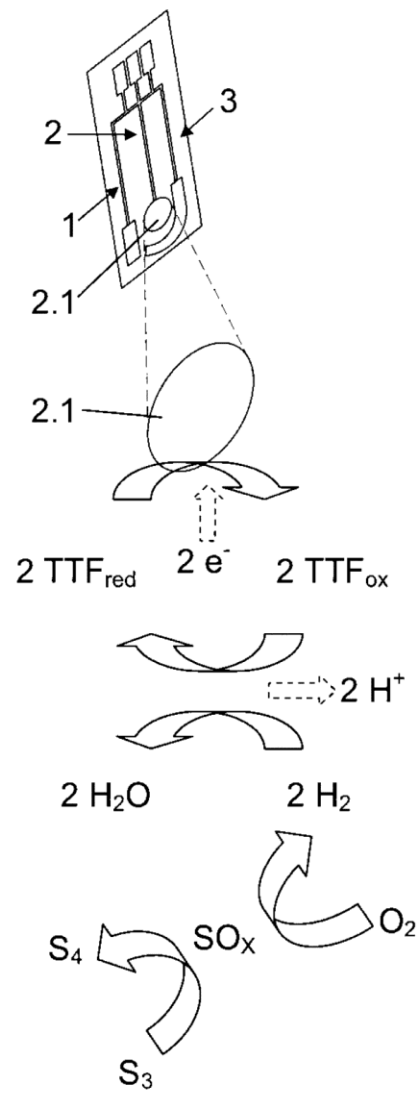


Fig.1

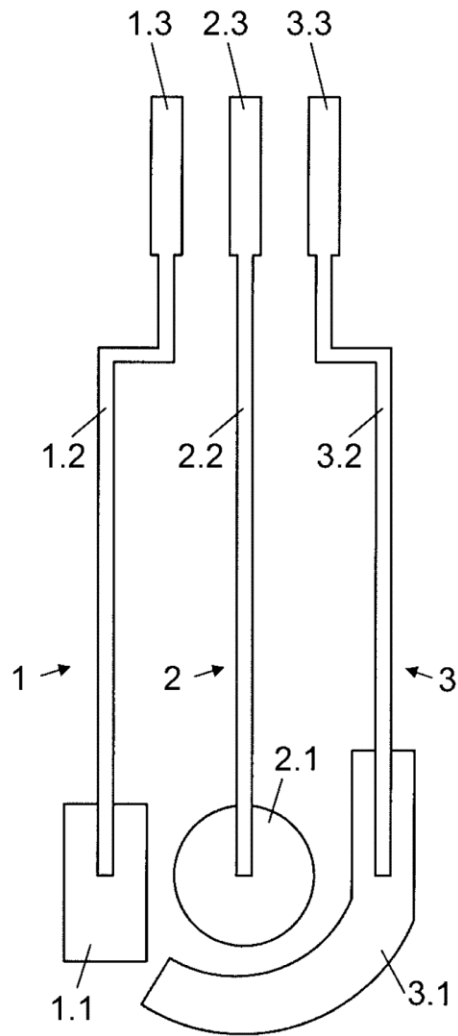


Fig.2

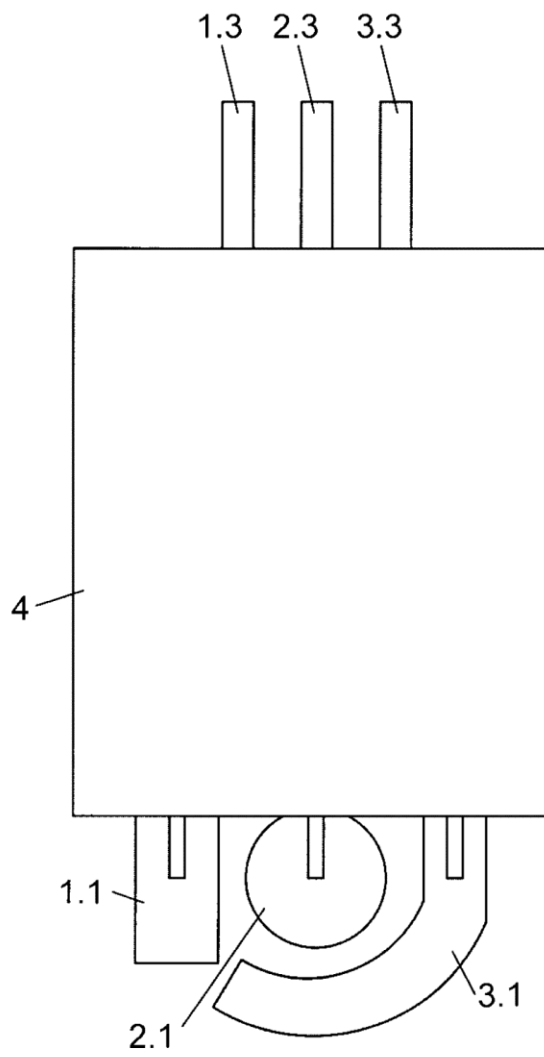


Fig.3



- ②① N.º solicitud: 201300554
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 12.06.2013
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N27/413** (2006.01)
C12Q1/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ABASS, A.K. et al. Development of an amperometric sulfite biosensor based on sulfite oxidase with cytochrome c, as electron acceptor, and a screen-printed transducer, Sensors and Actuators B (Chemical), Vol. 62, No. 2, 25.02.2000, páginas 148-153, ISSN 0925-4005 (print), <DOI: 10.1016/S0925-4005(99)00385-8>	1,7,9
A	KORELL, U. et al. A sulphite biosensor. Coupling of sulphite oxidase (EC 1.8.3.1) to a TTFTCNQ electrode. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, Vol. 351, No. 1-2, 01.06.1993, páginas 137-143, ISSN 0022-0728, <DOI:10.1016/0022-0728(93)80229-B>	1,7,9
A	GONZALO-RUIZ, J. et al. Screen-printed biosensors for glucose determination in grape juice, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 22, No. 7, 15.02.2007, páginas 1517-1521, ISSN 0956-5663, <DOI: 10.1016/j.bios.2006.07.020>	1,7,9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 03.10.2014</p>	<p>Examinador A. Figuera González</p>	<p>Página 1/5</p>
---	--	------------------------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPI,TXTE, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC, EMBASE, MEDLINE, XPAIP, XPESP, XPESP2, XPI3E, XPIEE, Internet

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.10.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ABASS, A.K. et al. Development of an amperometric sulfite biosensor based on sulfite oxidase with cytochrome c, as electron acceptor, and a screen-printed transducer, Sensors and Actuators B (Chemical), Vol. 62, No. 2, pág.148-153	25.02.2000
D02	KORELL, U. et al. A sulphite biosensor. Coupling of sulphite oxidase (EC 1.8.3.1) to a TTFTCNQ electrode. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, Vol. 351, No. 1-2, pág. 137-143	01.06.1993
D03	GONZALO-RUIZ, J. et al. Screen-printed biosensors for glucose determination in grape juice, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 22, No. 7, pág.1517-1521	15.02.2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

REIVINDICACIÓN 1

Se considera que el documento del estado de la técnica más próximo al objeto de la reivindicación 1 es el documento D01.

En D01 se describe un sensor amperométrico de sulfito basado en el uso de sulfito oxidasa con un transductor serigrafiado. El electrodo de trabajo es de tinta de carbono modificada y el electrodo de referencia/contraelectrodo es de Ag/AgCl.

Las principales diferencias entre el objeto de la reivindicación 1 y el biosensor descrito en D01 son:

- En D01 se utilizan solo dos electrodos realizando uno de ellos tanto las funciones del electrodo de referencia y como las del contraelectrodo
- En D01 la lámina plástica no es de poliéster sino de PVC
- En D01 no se menciona el empleo de GA y BSA
- En D01 no se menciona el uso de TTF

Las dos primeras diferencias podrían considerarse meras opciones de diseño alternativas.

Sin embargo, las dos últimas diferencias tienen como efecto técnico respectivamente, el conseguir un entrecruzamiento de la enzima con GA y BSA en el electrodo y la reducción del potencial de óxido-reducción.

Se aportan así soluciones más eficientes, por una parte, al problema de la inmovilización de la enzima en el electrodo y por otra parte al problema de falta de selectividad de los biosensores cuando trabajan a potenciales altos en los que otras especies químicas pueden interferir en la medida del sulfito.

En el estado de la técnica, es conocido el uso de GA y BSA para el entrecruzamiento con enzimas en un electrodo serigrafiado tal y como se ilustra por ejemplo en el documento D03. Sin embargo el biosensor de D03, que tiene además una estructura prácticamente idéntica a la estructura del dispositivo de la reivindicación 1, no se menciona específicamente la aplicación a la determinación de sulfito.

Por otra parte, aunque el uso de TTF como mediador en biosensores enzimáticos de diferentes especies químicas (glucosa, por ejemplo) es conocido, no se han recuperado documentos en el estado de la técnica que indiquen que puede ser utilizado para la medida de sulfito incorporado en una tinta en un electrodo serigrafiado.

Así por ejemplo, en D02 se describe un biosensor de sulfito en el que se acopla sulfito oxidasa a un electrodo TTF/TCNQ. Se emplean tres electrodos: un electrodo de trabajo con TTF/TCNQ, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un contraelectrodo de Pt. Se establece que los compuestos TTF y/o TCNQ son mediadores eficaces de la transferencia de electrones de la sulfito oxidasa lo que se considera notable teniendo en cuenta que el número de mediadores conocidos para esta enzima es muy limitado (véase D02, página 142, final del primer párrafo).

Pero en D02 los electrodos no son serigrafiados y el único ejemplo que se aporta es de uso conjunto de TTF/TCNQ, no de TTF únicamente.

Por lo tanto se considera que, pese a existir características técnicas comunes con el dispositivo objeto de la reivindicación 1 en los tres documentos citados D01-D03, no parece existir en ellos ninguna indicación que hubiera podido conducir al experto en la materia a combinar dichos documentos para modificar los biosensores descritos de forma que se hubiera llegado al dispositivo objeto de la reivindicación 1.

En conclusión se considera que la reivindicación 1 es nueva y tiene actividad inventiva de acuerdo con lo establecido en los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.

REIVINDICACIONES 7 y 9.

Las reivindicaciones independientes 7 y 9 se refieren respectivamente a un proceso de fabricación del dispositivo según las reivindicaciones 1 y 2 y al uso de un dispositivo según las reivindicaciones 1 y 2.

Así pues, como la reivindicaciones 1 y 2 son nuevas y tienen actividad inventiva, las reivindicaciones 7 y 9 también tienen novedad y actividad inventiva.

REIVINDICACIONES 2-6 Y 8

Las reivindicaciones 2-6 y 8, dependientes respectivamente de forma directa o indirecta de las reivindicaciones independientes 1 y 7 que tienen novedad y actividad inventiva, tienen por lo tanto a su vez novedad y actividad inventiva.