

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 643**

21 Número de solicitud: 201700149

51 Int. Cl.:

G01N 31/22 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

24.02.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.08.2018

Fecha de concesión:

14.03.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

21.03.2019

73 Titular/es:

UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)
Campus Universitario s/n
36310 Vigo (Pontevedra) ES

72 Inventor/es:

BENDICHO HERNÁNDEZ , José Carlos ;
PENA PEREIRA , Francisco Javier ;
VILLAR BLANCO, Lorena y
LAVILLA BELTRÁN , María Isela

54 Título: **Dispositivo y método colorimétrico no instrumental para especies químicas volátiles**

57 Resumen:

Dispositivo y método colorimétrico no instrumental para especies químicas volátiles. La presente invención se refiere a un dispositivo basado en un sustrato sólido, más concretamente papel, y al método colorimétrico no instrumental llevado a cabo con el mismo que permite la determinación cualitativa y cuantitativa de diferentes analitos mediante formación de derivados volátiles y reacción química colorimétrica con una sustancia reactiva confinada en el dispositivo analítico en papel. En la invención, la sustancia reactiva se encuentra confinada en la zona de detección (2) del sustrato de papel mediante barreras hidrofóbicas (4), que separan físicamente la zona de detección (2) de la zona de inyección (3), a través de la cual se puede inyectar un reactivo líquido (11) que permite la generación de una forma volátil del analito sin que la sustancia reactiva presente en la zona de detección (2) se vea afectada en dicho proceso.

ES 2 679 643 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

DESCRIPCIÓN**DISPOSITIVO Y MÉTODO COLORIMÉTRICO NO INSTRUMENTAL PARA
ESPECIES QUÍMICAS VOLÁTILES**

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el campo del análisis químico, con aplicación en
10 sectores como el medioambiental, el alimentario y el farmacéutico, entre otros. Más
específicamente, la invención se refiere a un dispositivo basado en un sustrato sólido,
más concretamente papel, que permite la determinación cualitativa y cuantitativa de
diferentes analitos mediante formación de una especie volátil, extracción de la misma y
reacción química colorimétrica.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El empleo de soportes sólidos de distinta naturaleza (celulosa, polímeros plásticos,
20 metales, etc.) ha sido y sigue siendo fundamental en distintos ámbitos de la química
analítica. Particularmente, la celulosa es un material funcional muy atractivo que es
utilizado como soporte sólido, por ejemplo, en análisis a la gota (denominados spot
tests en inglés), en cromatografía, así como en papel indicador de pH y en kits
portátiles para análisis rápidos.

25

Actualmente, diversas casas comerciales ofrecen una amplia variedad de kits
colorimétricos que permiten realizar análisis semi-cuantitativos de modo rápido. Dichos
sistemas pueden ser empleados por personal no especializado, y se caracterizan por
su bajo coste y rapidez, siendo aplicables en la determinación de numerosos
30 parámetros analíticos individuales. Estos kits colorimétricos se basan en la formación
de un producto coloreado mediante la reacción entre el analito y un reactivo químico
impregnado en tiras de ensayo. Posteriormente, se lleva a cabo la comparación visual
entre el color del producto generado y las zonas de color de una tarjeta impresa
correspondientes a concentraciones crecientes de analito. Comúnmente, las tiras de
35 ensayo de estos kits son sumergidas en la muestra problema, si bien, en algunos
casos, la determinación de analitos puede ser llevada a cabo mediante la generación
de una forma volátil de los mismos y posterior reacción colorimétrica con un reactivo

químico presente en la tira de ensayo. Los documentos de patente US3741727 (A) y US 2008/0069728 A1 describen sistemas basados en el empleo de recipientes de muestra flexibles en cuyo interior se introduce, junto con la muestra problema, al menos una ampolla conteniendo los reactivos necesarios para la formación de los productos volátiles correspondientes. La tira de ensayo se expone a la fase gaseosa generada sobre la muestra a través de una lengüeta abierta (US3741727 A), o bien en los orificios presentes en la parte superior de una bolsa flexible (US 2008/0069728 A1). Estos sistemas abiertos dan lugar a pérdidas del analito, lo que compromete notablemente la exactitud y la precisión del método, existiendo además riesgo de exposición a los vapores generados. Para evitar estos problemas se deben emplear sistemas cerrados que permitan la generación *in situ* del volátil y su reacción con la sustancia reactiva. Asimismo, la sensibilidad alcanzada con los sistemas anteriormente descritos es muy limitada, por lo que no es posible detectar el analito de interés cuando éste se encuentra presente a niveles de concentración inferiores o equivalentes al límite máximo permitido (por encima del cual se producen riesgos significativos para el medio ambiente y/o la salud humana).

En los últimos años, el interés en el desarrollo de dispositivos analíticos en papel (denominados paper-based analytical devices en inglés) como base para el análisis químico y biológico se ha visto incrementado enormemente tras las importantes contribuciones del grupo de investigación del Prof. Whitesides (Martínez *et al.*, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46 (2007) 1318–1320; Martínez *et al.*, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3–10). Como sustrato sólido, el papel permite trabajar con cantidades mínimas de reactivos y es susceptible de ser modificado químicamente para incorporar grupos funcionales específicos. La combinación de dispositivos analíticos en papel con diversos sistemas electrónicos de amplia implantación, tales como cámaras digitales, teléfonos móviles, tablets, etc., así como con programas informáticos de análisis de imagen, permite llevar a cabo análisis químico cuantitativo sin necesidad del empleo de las técnicas analíticas instrumentales, más sofisticadas, comúnmente empleadas para tal fin. Esta estrategia ha permitido el desarrollo de nuevas metodologías de análisis caracterizadas por su bajo coste, sencillez y rapidez, lo cual las hace especialmente útiles para realizar medidas de campo (Martínez *et al.*, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3–10; Martinez *et al.*, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3699–3707).

Los dispositivos analíticos en papel han sido empleados para determinar analitos de muy diversa naturaleza (Cate *et al.*, *Anal. Chem.* 87 (2015) 19–41). Sin embargo, a pesar del potencial de dichos sistemas, el desarrollo de métodos colorimétricos

basados en dispositivos analíticos en papel mediante formación de derivados volátiles del analito es todavía muy limitado. Estos se basan en el diseño de sistemas de tres dimensiones relativamente complejos (Jayawardane *et al.*, Anal. Chem. 87 (2015) 4621–4626; Phansi *et al.*, Anal. Chem. 88 (2016) 8749–8756). Además, los

5 dispositivos analíticos basados en papel presentan una sensibilidad inferior a la alcanzada utilizando métodos de análisis análogos en disolución. Este aspecto limita significativamente su aplicación cuando se trata de determinar compuestos presentes a niveles de concentración traza o ultratrazas en muestras de interés. Tal es el caso de aquellos contaminantes regulados por la legislación correspondiente cuya

10 concentración máxima admisible es inferior al límite de detección obtenido con dispositivos analíticos en papel. Para mitigar esta limitación, recientemente se han propuesto distintas estrategias con el fin de pre-concentrar analitos en combinación con dispositivos analíticos en papel. Así, Wong y colaboradores han propuesto la evaporación aplicando una temperatura elevada (220 °C) sobre el extremo de un

15 dispositivo en papel (Wong *et al.*, Anal. Chem. 86 (2014) 11981–11985). La sucesiva toma de muestra y evaporación producida de modo localizado permite pre-concentrar significativamente los analitos presentes en la muestra. Satarpai y colaboradores emplean discos circulares preparados a partir de papel de filtro modificados con un adsorbente para la extracción en fase sólida de plomo en muestras acuosas (Satarpai

20 *et al.*, Talanta 154 (2016) 504–510). Tras la etapa de pre-concentración, el disco circular se introduce en la zona central del dispositivo de análisis en papel y el analito retenido en él se dirige hacia la zona de detección con la consiguiente formación de un producto coloreado que permite su determinación. Si bien ambos sistemas permiten incrementar sustancialmente la sensibilidad del análisis, el tiempo de pre-

25 concentración es elevado y los procedimientos correspondientes resultan complejos. Más recientemente, se ha demostrado que la implementación de dispositivos analíticos en papel en sistemas de pre-concentración tales como la microextracción en capa fina en espacio de cabeza (denominado headspace-thin film microextraction en inglés) (Jiang and Pawliszyn, TrAC - Trends Anal. Chem. 39 (2012) 245–253) permite

30 alcanzar una elevada sensibilidad (y selectividad) en combinación con detección no instrumental por fluorescencia. Esta estrategia ha sido utilizada para la determinación de selenio en orina mediante generación de una forma volátil del analito (seleniuro de hidrógeno) y su microextracción en capa fina en espacio de cabeza (Huang *et al.*, Anal. Chem. 88 (2016) 789–795). Para ello, se utilizan nanocristales semiconductores

35 fluorescentes inmovilizados en sustrato de papel. La disminución de intensidad de fluorescencia producida por interacción del seleniuro de hidrógeno con los nanocristales semiconductores inmovilizados permite la determinación de selenio a

bajos niveles de concentración. La configuración del dispositivo empleado, sin embargo, presenta un problema que limita significativamente su aplicación. Dicho dispositivo es preparado por inmersión del sustrato de papel en una disolución de sustancia reactiva, de modo que ésta se encuentra presente en toda la superficie del sustrato de papel. Así, la inyección del agente derivatizante a través del dispositivo puede afectar e incluso impedir la determinación cuantitativa de los analitos de interés como consecuencia de la posible reacción con la sustancia reactiva presente en el sustrato de papel. Por tanto, la aplicabilidad del sistema depende de la compatibilidad de la sustancia reactiva presente en el dispositivo analítico en papel y el reactivo empleado para generar la forma volátil del analito, dado que la sustancia reactiva no se encuentra separada físicamente de la zona de inyección.

En vista de lo expuesto en los párrafos anteriores, existe la necesidad de utilizar un nuevo dispositivo que permita separar la zona de inyección de la zona de detección para que la aplicación de este tipo de sistemas analíticos en papel pueda ser generalizable. El uso del dispositivo descrito en la presente invención soluciona este problema.

20 **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un dispositivo y al método colorimétrico no instrumental llevado a cabo con el mismo que permite la determinación de analitos mediante formación de derivados volátiles y que solventa las limitaciones de los métodos descritos en el estado de la técnica.

En la presente invención se entiende por “sustancia reactiva” una sustancia que reacciona de modo selectivo con la forma volátil del analito, produciendo una reacción colorimétrica con dicha sustancia en el sustrato de papel, permitiendo así llevar a cabo la determinación del analito presente en la muestra.

Se entiende por “reacción colorimétrica” aquella reacción en la cual se genera un producto cuyo color difiere con respecto al de la sustancia reactiva presente en el sustrato de papel, así como al incremento o disminución de la intensidad de color del producto generado con respecto al de la sustancia reactiva.

Se entiende por “agente derivatizante” aquella sustancia que permite formar, mediante

reacción química con el analito, un producto que presenta propiedades físico-químicas más apropiadas para llevar a cabo el análisis químico.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo para la determinación de derivados volátiles de analitos no volátiles que comprende un sustrato de papel, preferentemente papel de filtro o papel cromatográfico, que a su vez comprende una zona de detección en la cual se inmoviliza la sustancia reactiva, separada físicamente de una zona de inyección mediante una barrera hidrofóbica, dicho sustrato de papel se inserta en el interior de un tapón de rosca con un septum flexible, de tal manera que la zona de detección del sustrato de papel modificado pueda ser expuesta al interior del vial.

El dispositivo de la invención permite llevar a cabo la separación y pre-concentración del analito mediante la generación de una forma volátil del mismo susceptible de dar lugar a una reacción colorimétrica en la zona de detección del sustrato de papel. Cabe destacar que la separación física obtenida mediante la formación de barreras hidrofóbicas permite llevar a cabo la reacción de generación de la forma volátil del analito de modo independiente mediante inyección externa a través de la zona de inyección sin que la sustancia reactiva presente en la zona de detección pueda verse afectada en el proceso.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la determinación de especies volátiles del analito mediante el empleo del dispositivo descrito anteriormente, que comprende las etapas siguientes:

- a) Preparación del sustrato del papel e inmovilización de la sustancia reactiva en la zona de detección;
- b) Introducción de la muestra que contiene el analito a determinar en el vial para su posterior análisis;
- c) Generación de la forma volátil del analito mediante la introducción de la aguja de una jeringa que contiene el reactivo requerido para la generación del derivado volátil del analito a través de la zona de inyección del sustrato de papel modificado e inyección del contenido de la jeringa en el interior del vial;
- d) Simultáneamente a la etapa c) se produce la transferencia de la especie volátil del analito al espacio de cabeza y, posteriormente, a la zona de detección del dispositivo analítico en papel, en la cual se produce la reacción colorimétrica correspondiente;
- e) Digitalización de la zona de detección del dispositivo analítico en papel;

f) Procesado y análisis de la imagen obtenida.

Una realización preferida del método se caracteriza por que la sustancia reactiva empleada puede ser inmovilizada en la zona de detección químicamente (mediante
 5 reacción química con el sustrato de papel) o físicamente (mediante deposición de la disolución de la sustancia reactiva sobre la zona correspondiente del sustrato de papel).

Una realización preferente en la etapa d) de transferencia de los analitos volátiles al
 10 espacio de cabeza se puede favorecer mediante el empleo de sistemas termostatizados, así como mediante sistemas de agitación por vortex, sistemas de ultrasonidos o, preferentemente, mediante agitación magnética. En este último caso es necesario introducir un agitador magnético en el interior del vial junto con la muestra antes de llevar a cabo la etapa de generación de la forma volátil del analito.

15 Otra realización preferente, la digitalización de la zona de detección del dispositivo analítico en papel, se realiza mediante el empleo de dispositivos de captura digital, tales como una cámara digital, un teléfono móvil o un escáner.

20 Otra realización preferida, la etapa de procesado y análisis de la imagen obtenida, se lleva a cabo mediante el empleo de un programa informático de análisis de imagen.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un método de análisis colorimétrico no instrumental mediante el empleo del sistema descrito anteriormente
 25 para la determinación de analitos tales como arsénico, amonio, antimonio, bromuro, bromato, cianuro, hipoclorito, mercurio, metilmercurio, nitrato, nitrito, sulfito, sulfuro, trimetilamonio, yoduro, yodato, etc., mediante formación de sus correspondientes derivados volátiles y reacción selectiva de los mismos con la sustancia reactiva presente en la zona de detección del dispositivo analítico en papel.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una
 35 mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de figuras en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo,

se ha representado lo siguiente:

La Figura 1 muestra los componentes del dispositivo según una realización preferida de la invención.

5

La Figura 2 muestra el dispositivo empleado para la preconcentración de formas volátiles de analitos no volátiles mediante derivatización según una realización preferida de la invención (a) y una vista esquemática que muestra el dispositivo (b).

- 10 La Figura 3 muestra el efecto de las distintas variables experimentales sobre la señal analítica correspondiente a arsénico (As): a) modos de color (RGB); b) masa de nitrato de plata (AgNO_3) presente en la zona de detección; c) concentración de agente reductor (borohidruro de sodio, NaBH_4) empleado para la generación de arsina o hidruro de arsénico (AsH_3); d) concentración de HCl empleado para la generación de AsH_3 a partir de dos especies de As inorgánico (As(III) y As(V)); e) concentración de ácido cítrico empleado para la generación de AsH_3 a partir de dos especies de As inorgánico (As(III) y As(V)); f) tiempo de extracción.
- 15

- La Figura 4 muestra como varía la señal analítica con la concentración para la determinación de As(III) y As inorgánico total: a) relación entre la señal analítica y la concentración de As(III); b) relación entre la señal analítica y la concentración de As inorgánico total.
- 20

- La Figura 5 muestra como varía $K/((I_{\text{max}}/I_{\text{media}}) - 1)$ con la concentración para la determinación de As(III) y As inorgánico total: a) relación entre $K/((I_{\text{max}}/I_{\text{media}}) - 1)$ y la concentración de As(III); b) relación entre $K/((I_{\text{max}}/I_{\text{media}}) - 1)$ y concentración de As inorgánico total.
- 25

30 REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

- En cualquier caso, en todas las posibles realizaciones de la invención, se parte del dispositivo de la invención, representado en la Figura 1 y Figura 2, que comprende un sustrato de papel (1), comúnmente papel de filtro o papel cromatográfico, que a su vez comprende una zona de detección (2) en la cual se inmoviliza (física o químicamente) la sustancia reactiva, separada físicamente de la zona de inyección (3) mediante
- 35

barreras hidrofóbicas (4). El sustrato de papel modificado es insertable en el interior de un tapón de rosca (5) con septum flexible (6), de tal manera que la zona de detección (2) del sustrato de papel modificado queda expuesta al interior de un vial (7). La muestra a analizar (8) se encuentra en el interior del vial (7) acoplable al tapón de rosca (5), de modo que el sistema cerrado comprende un espacio de cabeza (9). El dispositivo de la invención permite la generación de una forma volátil del analito presente en la muestra a analizar (8) mediante inyección externa de una disolución del reactivo correspondiente (11) a través de la zona de inyección (3) del sustrato de papel (1). Los volátiles generados son transferidos al espacio de cabeza (9), y reaccionan con la sustancia reactiva presente en la zona de detección del sustrato de papel (2), de modo que se produce una reacción colorimétrica en la misma.

A continuación se describe una posible realización de la invención para el análisis de especiación de As en matrices acuosas, que incluye: la preparación de un dispositivo analítico en papel para la detección de arsina, la evaluación de distintos parámetros experimentales que afectan a la determinación colorimétrica no instrumental de As, la obtención de las características analíticas, la evaluación de posibles interferencias y la aplicación de la invención a la determinación de As(III) y As inorgánico total en muestras de agua de consumo humano. La aplicabilidad de la presente invención no debe considerarse en absoluto restringida a la descrita en el ejemplo ilustrativo expuesto.

Ejemplo

Preparación de un dispositivo analítico en papel para detección de arsina

Inicialmente se prepara un sustrato de papel (1) de forma y dimensiones equivalentes a las del septum (6) incluido en el interior del tapón de rosca (5) compatible con el vial (7). Las dimensiones de la zona de detección (2) son establecidas en función del diámetro del orificio superior del tapón de rosca (5) compatible con el vial (7). En el ejemplo, el sustrato de papel (1) alberga, en su zona central, un cuadrado de 0,64 cm² perfilado con un rotulador permanente que delimita la zona de detección (2). Los rotuladores permanentes constituyen una opción simple y económica para preparar *in situ* el dispositivo analítico en papel (Nie *et al.*, Anal. Chem. 84 (2012) 6331–6335). Cuando la tinta penetra en los poros del papel, el disolvente se evapora y la resina permanece en el sustrato formando las barreras hidrofóbicas que delimitan físicamente las distintas zonas del papel. Otros métodos de fabricación de dispositivos analíticos en papel, entre los que destaca la impresión con cera, también son aplicables (Cate *et al.*, Anal. Chem. 87 (2015) 19–41; Carrilho *et al.*, Anal. Chem. 81 (2009) 7091–7095;

Jiang and Fan, Annu. Rev. Anal. Chem. 9 (2016) 203–222). Las barreras hidrofóbicas (4) así obtenidas permiten confinar la sustancia reactiva en la zona de detección (2) y, por tanto, separar físicamente la zona de detección (2) de la zona de inyección (3).

- 5 La zona de detección (2) se modifica mediante la adición de 5-10 μL de disolución de AgNO_3 sobre la misma, y se deja secar para su posterior empleo. De este modo, la sustancia reactiva (AgNO_3) se encuentra confinada en la zona de detección (2), separada físicamente de la zona no modificada del sustrato de papel correspondiente a la zona de inyección (3), a través de la cual se puede inyectar un reactivo en
- 10 disolución (NaBH_4) que permita la generación de una forma volátil del analito (en este caso AsH_3) sin que la sustancia reactiva presente en la zona de detección (2) se vea afectada en dicho proceso (por reducción de los iones Ag^+ presentes en la zona de detección).

- 15 *Evaluación de parámetros experimentales que afectan a la determinación colorimétrica no instrumental de arsénico*

- Se realizó una evaluación de las distintas variables experimentales que afectan a la determinación selectiva no instrumental de As mediante el empleo del dispositivo analítico en papel cuya preparación se ilustra en el anterior apartado. El método se
- 20 basa en la generación *in situ* de AsH_3 y posterior reacción del volátil con los iones Ag^+ presentes en la zona de detección (2) del sustrato de papel (1), lo cual resulta en la formación de un producto coloreado (debido a la generación de Ag^0 y As_2O_3). Para obtener la señal analítica correspondiente (intensidad de color) se digitaliza el sustrato de papel con un escáner y se procede a la determinación de la intensidad de color
- 25 correspondiente al canal de color (RGB) más apropiado de la zona de detección (2) de la imagen obtenida.

- En primer lugar, se evaluó la influencia de los distintos canales de color (RGB) en la señal analítica de patrones y blancos (Figura 3a). Los distintos canales permiten
- 30 obtener valores de intensidad de color similares, si bien el canal rojo (R) proporciona los valores de intensidad de color más bajos para el blanco, lo que supone una mayor relación señal/ruido.

- Se evaluó el efecto de la masa de sustancia reactiva (en el ejemplo, masa de AgNO_3)
- 35 presente en la zona de detección (2) del dispositivo analítico en papel (1). La selección de masa en el intervalo 0.5-1.0 mg permite obtener una elevada sensibilidad con un bajo consumo del reactivo (Figura 3b).

Se evaluó el efecto de la concentración de reductor (NaBH_4) para As(III). Como se observa gráficamente en la Figura 3c, se requiere una concentración de NaBH_4 entre 1 y 1.5 % (m/v) para obtener máxima sensibilidad.

5

Se evaluó también el efecto de la concentración y tipo de ácido sobre la señal analítica con As(III) y As(V). Una concentración de HCl 1-2 M es adecuada para obtener una señal analítica equivalente para ambas especies de As (Figura 3d). El uso de ácido cítrico hasta 1 % (m/v) permite generar AsH_3 de modo selectivo a partir de As(III) en presencia de As(V) (Figura 3e). Esto hace posible determinar As(III) utilizando ácido cítrico o As inorgánico total [As(III) + As(V)] mediante el empleo de HCl.

10

La evaluación del tiempo de extracción (Figura 3f) muestra que la señal analítica aumenta significativamente con esta variable, alcanzándose máxima sensibilidad con tiempos de extracción de, al menos, 3 minutos.

15

Características analíticas

En condiciones óptimas se obtuvieron las curvas de respuesta que relacionan la concentración de As con la señal analítica obtenida, tanto para la cuantificación de As(III) (Figura 4a), como para la de As inorgánico total (Figura 4b). Como se puede observar en la Figura 4, al representar la señal analítica frente a la concentración del analito se obtiene una relación hiperbólica rectangular, tal y como se describe en la bibliografía (Chaplan *et al.*, Anal. Methods 6 (2014) 1296–1300; Pena-Pereira *et al.*, Talanta 147 (2016) 390–396). La relación hiperbólica rectangular relaciona la intensidad de color (I) con la concentración (C) de acuerdo a la ecuación:

20

25

$$I = \frac{I_{\max} C}{K + C} \quad (1)$$

Donde $I_{\max}$ es el valor máximo de intensidad de color al que tiende la curva y K es la concentración que corresponde a la mitad de la $I_{\max}$. La ecuación (1) puede expresarse en función de la concentración como sigue:

30

$$C = \frac{K}{\left(\frac{I_{\max}}{I} - 1\right)} \quad (2)$$

35

Idealmente, la representación de $K / ((I_{\max} / I_{\text{media}}) - 1)$ vs C se ajusta a una recta en la cual los parámetros idóneos para la pendiente y ordenada en el origen son 1 y 0,

respectivamente.

La Figura 5 muestra la representación de $K/((I_{max}/I_{media}) - 1)$ frente a la concentración de As(III) (Figura 5a) y As inorgánico total (Figura 5b) de acuerdo con la ecuación (2). En ambos casos se obtiene una respuesta lineal en el intervalo de concentraciones de 5 a 400 ng/mL. El límite de detección alcanzado fue de 1 ng/mL. En consecuencia, la sensibilidad alcanzada es, a diferencia de distintos kits colorimétricos comerciales cuyos límites de detección se encuentran en el intervalo 20-100 ng/mL (Pande *et al.*, Environ. Monit. Assess. 68 (2001) 1–18), suficiente para la determinación de As en muestras de agua de consumo humano, cuya concentración máxima permitida es de 10 ng/mL de acuerdo con el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero (Ministerio de la Presidencia, Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano., Bol. Of. Del Estado. (2003) 7228–7245).

Evaluación de posibles interferencias

Se evaluó la tolerancia del método descrito a la presencia de distintos compuestos que pueden producir un efecto significativo (positivo o negativo) sobre la señal analítica de As. En este estudio se incluyeron distintas sales, metales de transición, elementos generadores de hidruros y ácido húmico. Los elevados niveles de tolerancia obtenidos indican que el método es aplicable al análisis de muestras de agua de consumo humano, dado que los niveles de concentración de los distintos compuestos evaluados son, típicamente, inferiores en dichas muestras.

Aplicación de la invención a la determinación de As(III) y As inorgánico total en muestras de agua de consumo humano

La utilidad de la invención descrita se demuestra, a modo de ejemplo, mediante la aplicación de la misma a la determinación de As(III) y As inorgánico total en muestras de agua de consumo humano. Se analizaron tres muestras acuosas (agua mineral embotellada, agua de fuente y agua de río), obteniéndose en todo caso concentraciones de As(III) y As inorgánico total inferiores al límite de detección. Para la evaluación de la exactitud del método se realizaron estudios de recuperación empleando distintos niveles de concentración de As(III) y As(V). Los resultados obtenidos (Tabla 1) muestran valores de recuperación próximos al valor teórico del 100% tanto para As(III) como para As inorgánico total. Se puede confirmar, por tanto, que la matriz de muestra evaluada no produce un efecto significativo y el método propuesto es aplicable al análisis de especiación de As en matrices acuosas.

Tabla1: Estudios de recuperación.

Muestra	Concentración añadida (ng/mL)		Recuperación (%)	
	As(III)	As(V)	As(III)*	As inorgánico total*
Agua mineral	10	--	96±18	102±11
embotellada	10	10	107±3	105±5
Agua de fuente	10	--	111±1	101±12
	10	10	94±7	101±14
Agua de rio	10	--	102±6	93±6
	10	10	101±5	106±5

* Valor medio ± desviación estándar

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para la determinación colorimétrica no instrumental de derivados volátiles de analitos no volátiles que comprende un vial (7) donde se halla la muestra a analizar (8), al cual se le acopla un tapón de rosca (5) con orificio superior, de modo que en el sistema cerrado se crea un espacio de cabeza (9), **caracterizado por que** en el interior del tapón de rosca (5) se inserta un sustrato de papel (1) que a su vez comprende una zona de detección (2) en la cual se inmoviliza la sustancia reactiva, separada físicamente de la zona de inyección (3) mediante una barrera hidrofóbica (4), dicho sustrato de papel (1) se inserta en el interior del tapón de rosca (5) con un septum flexible (6), de tal manera que la zona de detección (2) del sustrato de papel modificado pueda ser expuesta al interior del vial (7).
2. Dispositivo según reivindicación 1, caracterizado por que en la zona de detección (2) se inmoviliza físicamente o químicamente una sustancia reactiva susceptible de producir una reacción colorimétrica con los derivados volátiles del analito.
3. Dispositivo según reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que las dimensiones de la zona de detección (2) dependerán del diámetro del orificio superior del tapón de rosca (5) compatible con el vial (7).
4. Dispositivo según reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que la forma y dimensiones del sustrato del papel (1) son equivalentes a las del septum flexible (6).
5. Dispositivo según reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el sustrato de papel (1) puede ser papel de filtro o papel cromatográfico.
6. Dispositivo según reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la preparación de la barrera hidrofóbica (3) puede llevarse a cabo mediante impresión con cera, o preferentemente de modo manual con rotuladores permanentes.
7. Método de análisis colorimétrico no instrumental para especies químicas volátiles según reivindicaciones anteriores que comprende:
 - a) Preparación del sustrato de papel (1) e inmovilización de la sustancia reactiva en la zona de detección (2);

- b) Introducción de la muestra (8) en el vial (7) para su posterior análisis;
- c) Generación de la forma volátil del analito mediante introducción de la
 5 aguja de una jeringa (10) conteniendo el reactivo derivatizante (11)
 requerido para la generación del derivado volátil del analito a través de
 la zona de inyección (3) del sustrato de papel modificado e inyección
 del contenido de la jeringa (10) en el interior del vial (7):
- d) Simultáneamente a la etapa c) se produce la transferencia de la especie
 10 volátil del analito al espacio de cabeza (9) y, posteriormente, a la zona
 de detección (2) del dispositivo analítico en papel, en la cual se produce
 la reacción colorimétrica correspondiente;
- e) Digitalización de la zona de detección (2) del dispositivo analítico en
 papel (1);
- f) Procesado y análisis de la imagen obtenida.
- 15 8. Método según reivindicación 7, caracterizado por que la sustancia reactiva
 puede ser inmovilizada en la zona de detección (2) tanto químicamente
 mediante reacción química con el sustrato de papel (1) o bien físicamente
 mediante depósito de la disolución de sustancia reactiva sobre la zona
 correspondiente del sustrato de papel (1).
- 20 9. Método según reivindicaciones 7 a 8, caracterizado por que la etapa d) de
 transferencia de la forma volátil del analito al espacio de cabeza (9) se lleva a
 cabo mediante el empleo de sistemas termostatizados, agitación magnética,
 agitación por vortex, o sistemas ultrasónicos.
- 25 10. Método de análisis colorimétrico según reivindicación 7, caracterizado por que
 la etapa de digitalización de la zona de detección (2) se lleva a cabo mediante
 el empleo de dispositivos de captura digital, tales como una cámara digital, un
 teléfono móvil o un escáner.
- 30 11. Método de análisis colorimétrico según reivindicación 7, caracterizado por que
 la información analítica es obtenida mediante el empleo de un programa
 informático de análisis de imagen.
- 35 12. Uso de un método de análisis colorimétrico no instrumental según
 reivindicaciones anteriores, caracterizado por que puede ser aplicado para la
 determinación de analitos tales como arsénico, amonio, antimonio, bromuro,

5

bromato, cianuro, hipoclorito, mercurio, metilmercurio, nitrato, nitrito, sulfito, sulfuro, trimetilamonio, yoduro, yodato, así como otros analitos que permita la formación de sus correspondientes derivados volátiles y reacción selectiva de los mismos con la sustancia reactiva presente en la zona de detección (2) del dispositivo analítico en papel (1).

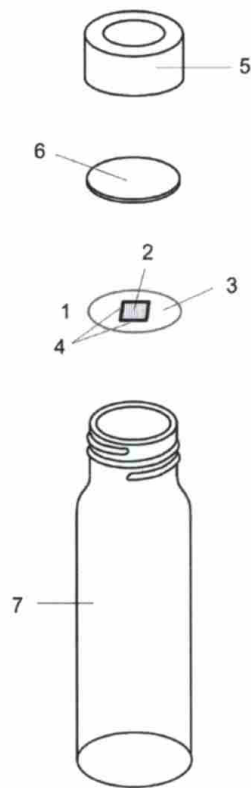


Figura 1

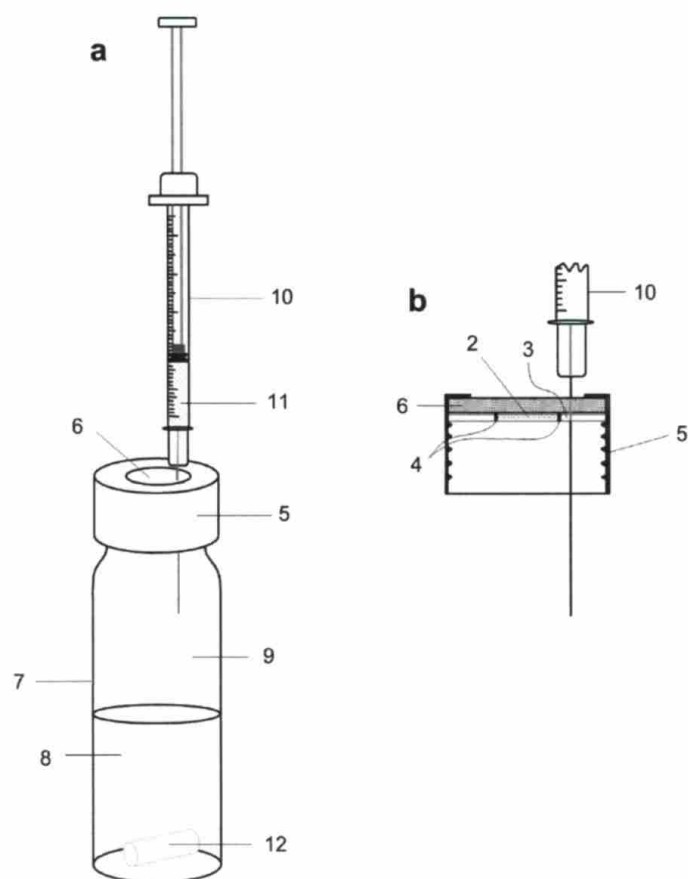


Figura 2

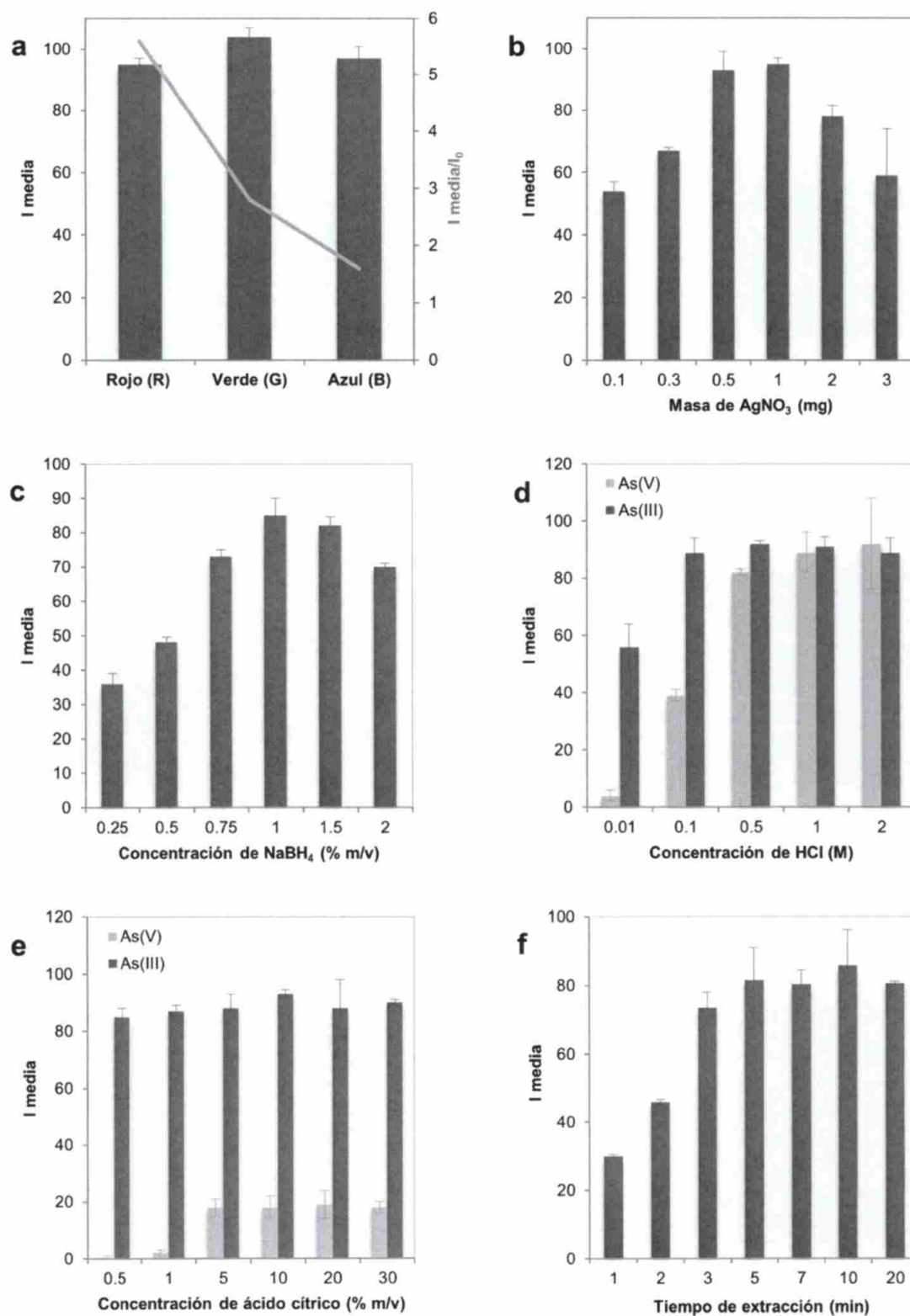


Figura 3

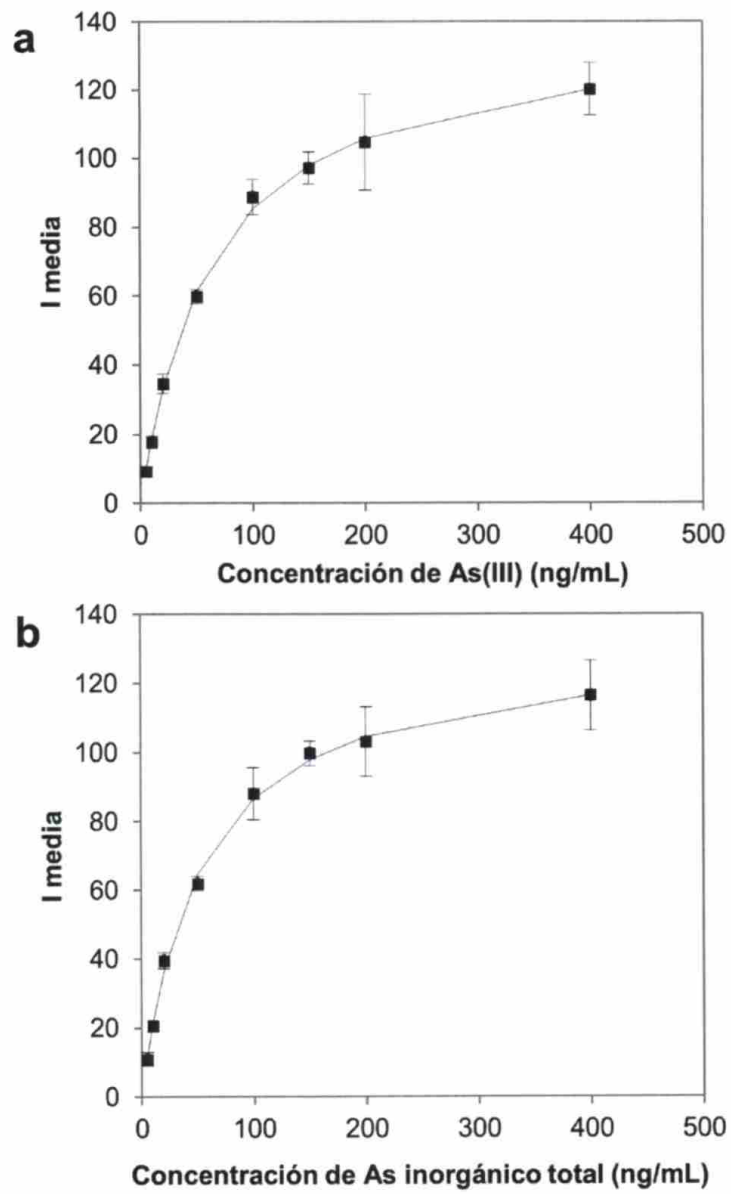


Figura 4

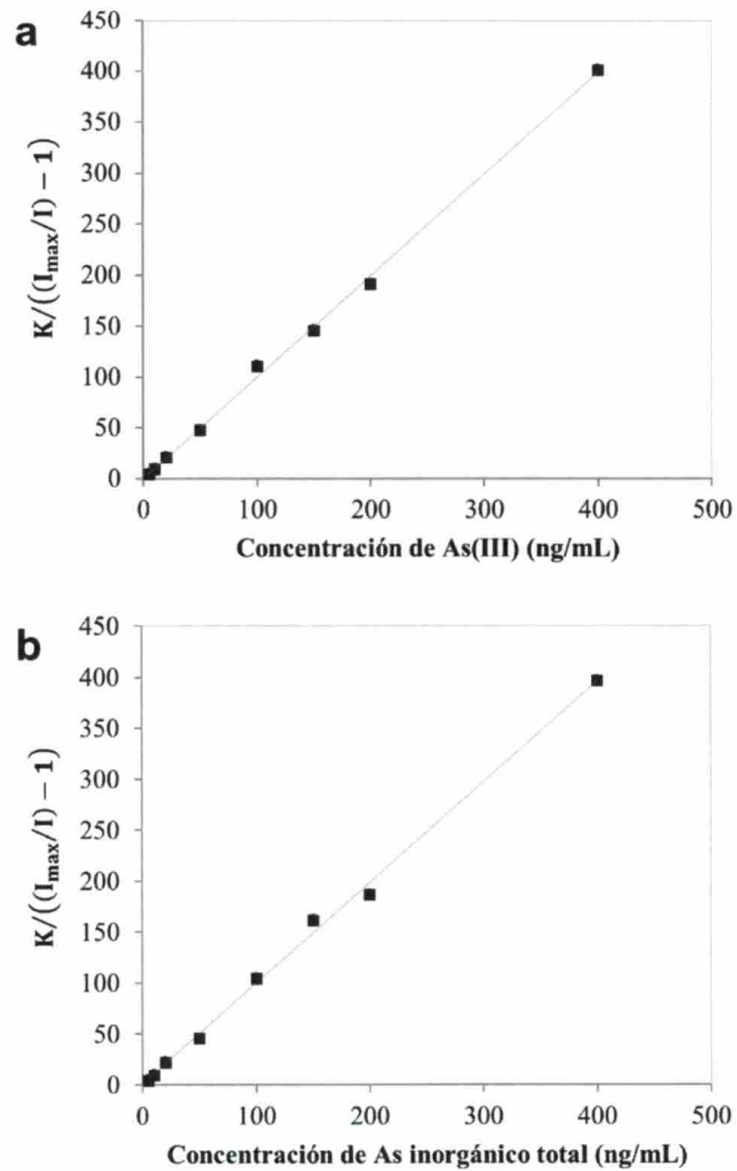


Figura 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ②① N.º solicitud: 201700149
②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.02.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N31/22** (2006.01)
G01N21/78 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 2008145947 A1 (BOGA RAMESHBABU et al.) 19/06/2008, Figura 8, párrafos 0004, 0082.	1-12
Y	US 6397658 B1 (VILLETIAZ JEAN-CLAUDE et al.) 04/06/2002, Figura 6.	1-12

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:

Fecha de realización del informe
13.06.2017

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

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

G01N

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, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.06.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	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	US 2008145947 A1 (BOGA RAMESHBABU et al.)	19.06.2008
D02	US 6397658 B1 (VILLETZ JEAN-CLAUDE et al.)	04.06.2002

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

El objeto de la invención contenido en la reivindicación 1 se refiere a un dispositivo de análisis de una sustancia volátil presente en una muestra no volátil, mediante la generación in situ de la forma volátil, y su detección colorimétrica en un sustrato en papel. El dispositivo comprende un vial, con un tapón de rosca y un septum flexible, quedando en el sistema cerrado un espacio de cabeza. Además comprende un sustrato de papel conteniendo una sustancia reactiva que queda alojada en el interior del tapón y separada por una barrera hidrofóbica de la zona de inyección.

El documento D01 divulga un dispositivo para la cuantificación de componentes volátiles presentes en muestras biológicas como sangre u orina (figura 8, párrafo 0082). Este dispositivo consiste en un frasco donde se coloca la muestra, y una tapa que contiene una tira reactiva donde se coloca el sustrato reactivo. La tapa deja sellado el frasco, el cual se deja un tiempo de equilibrado para permitir que los vapores reaccionen con el sustrato presente en la tira reactiva de la tapa. La tapa puede comprender una abertura transparente que permita detectar el cambio colorimétrico de la tira reactiva, sin necesidad de quitar la tapa. Además divulga un método para detectar formaldehído en una muestra de orina que comprende poner en contacto la muestra con un sustrato, comprendiendo el sustrato al menos un colorante configurado para producir una respuesta espectral cuando se somete a formaldehído, detectar la respuesta espectral y correlacionar la respuesta espectral con la presencia de formaldehído en la muestra (párrafo 0004).

D02 muestra un recipiente para medir sustancias volátiles en una muestra, sin separación previa de los diferentes compuestos, que comprende: una zona donde se aloja la muestra a analizar, quedando disponible un espacio de cabeza sobre la muestra para alojar las sustancias volátiles producidas. Cuenta además con unos medios para recoger las sustancias volátiles después de un tiempo de equilibrado, que incluyen al menos una superficie adsorbente introducida en el espacio de cabeza, en el que los medios para recoger las sustancias volátiles se basan por ejemplo en un sistema de micro-extracción en fase sólida, e incluye un inyector con septum flexible. Comprende además un sistema de desorción espaciado del recipiente para recibir la superficie adsorbente con sustancias recogidas; y un detector para analizar las sustancias volátiles recogidas y producir una señal a partir de las mismas (figura 6, columna 6, reivindicación 7).

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga un dispositivo con las mismas características que el de las reivindicaciones 1-6, ni un método como el de las reivindicaciones 7-12, por lo que el objeto de tales reivindicaciones cumpliría con el requisito de novedad, tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

Tomando D01 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la reivindicación independiente 1, la diferencia entre ambos sería el septum flexible. Luego, el problema que plantearía la invención sería la provisión de un tapón que pueda ser atravesado por una aguja. La solución sería la incorporación de un septum flexible. D02 muestra un vial que contiene un tapón con un septum flexible, por donde se introduce una aguja en el interior del vial. Así pues, para el experto en la materia sería obvio combinar la parte del dispositivo mostrado en D02, con el dispositivo de D01, llegando así al dispositivo de la reivindicación 1. Por tanto, se considera que el objeto de la reivindicación 1 carecería de actividad inventiva, según se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986. Ninguna de las reivindicaciones dependientes 2-6 añadirían característica técnica inventiva alguna al dispositivo de la reivindicación independiente 1, por lo que tampoco cumplirían con lo mencionado en el art.8.

El objeto de la reivindicación independiente 7 se refiere a un método de análisis colorimétrico de sustancias volátiles a partir de analitos no volátiles. Este método se realiza en un sistema de papel donde se inmoviliza un sustrato reactivo, y conlleva la introducción de una muestra en un vial por medio de la inyección de una aguja que contiene un reactivo derivatizante y generador de esa forma volátil. Después de la transferencia de la forma volátil al espacio de cabeza se detecta colorimétricamente por el sustrato inmovilizado en papel. Por último, se digitaliza la señal y se analiza la imagen.

La diferencia entre este método y el método divulgado en D01 (ejemplo 4) sería la inyección de un reactivo generador de la sustancia volátil por inserción de una aguja en el vial de reacción. El efecto técnico de esa diferencia, según menciona el solicitante (página 6, líneas 15-20), sería que la sustancia reactiva presente en la zona de detección no se vería afectada en el proceso. El problema a resolver consistiría en la provisión de un sistema de adición in situ de la sustancia reactiva generadora del elemento volátil, que no afecte al sustrato de detección. El experto, conocedor del dispositivo del documento 2, se sentiría inclinado a añadir el reactivo derivatizante generador de la sustancia volátil mediante una jeringa que atravesase el septum del tapón, con el fin de que no interfiriese con el sustrato de la tira reactiva alojado en el tapón, teniendo altas probabilidades de éxito. Así pues, el objeto de la reivindicación 7 carecería de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8. Las características adicionales presentes en las reivindicaciones 8-12 son realizaciones obvias para el experto en la materia que tampoco suponen una contribución sobre los documentos del estado de la técnica.