

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 975 868**

21 Número de solicitud: 202231013

51 Int. Cl.:

**G01N 27/49** (2006.01)

**G01N 33/14** (2006.01)

**C07C 321/04** (2006.01)

**H01M 4/04** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**24.11.2022**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**16.07.2024**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**19.07.2024**

Fecha de concesión:

**26.05.2025**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**02.06.2025**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE BURGOS (100.00%)**

**C/ Hospital del Rey s/n**

**09001 Burgos (Burgos) ES**

72 Inventor/es:

**PORTUGAL GÓMEZ, Paula;**

**DOMÍNGUEZ RENEDO, Olga y**

**ALONSO LOMILLO, M. Asunción**

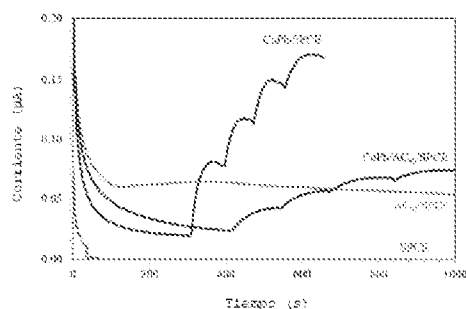
54 Título: **SENSOR DE DETECCIÓN DE MERCAPTANOS EN VINOS Y PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE LOS MISMOS**

57 Resumen:

Sensor de detección de mercaptanos en vinos y procedimiento de determinación de los mismos.

La invención proporciona un sensor de detección de mercaptanos en vinos consistente en un electrodo serigrafado de carbono modificado con ftalocianina de cobalto, en concreto para detectar el defecto organoléptico asociado con la presencia de mercaptanos en vinos, de forma sencilla y evitando el contacto directo del sensor con las muestras a medir, facilitando la realización de análisis rutinarios e in situ, con el objetivo de llevar a cabo diagnósticos precoces de carácter preventivo con el mínimo coste posible.

Figura 1



ES 2 975 868 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.  
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

## DESCRIPCIÓN

### SENSOR DE DETECCIÓN DE MERCAPTANOS EN VINOS Y PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE LOS MISMOS

5

#### CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se engloba en el campo de la electroquímica aplicada al análisis químico, en particular en el análisis de detección de mercaptanos presentes en los vinos.

10

La presente invención se refiere a un sensor de detección de mercaptanos en vinos, así como a un procedimiento de detección amperométrico de mercaptanos en vinos mediante el uso de dicho sensor.

15

Más concretamente, en un primer aspecto, la invención proporciona un sensor de detección de mercaptanos en vinos consistente en un electrodo serigrafiado de carbono modificado con ftalocianina de cobalto. De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona un método de tipo “espacio de cabeza” (“Headspace”) para la detección de mercaptanos en vinos mediante dicho sensor.

20

El sensor y el método de la invención permiten detectar el defecto organoléptico asociado con la presencia de mercaptanos en vinos de forma sencilla y evitando el contacto directo del sensor con las muestras a medir, facilitando la realización de análisis rutinarios e *in situ*, con el objetivo de llevar a cabo diagnósticos precoces de

25

carácter preventivo con el mínimo coste posible.

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

30

En la industria agroalimentaria en general, y en el campo de la enología en particular, existe un creciente interés por la elaboración de productos de elevada calidad. La búsqueda constante de innovación en los procesos productivos es de vital importancia en una industria que pretende consolidar su excelente reputación internacional y mejorar aún más sus perspectivas. El sector vitivinícola es estratégico para la Unión Europea, ya que cuenta con grandes países productores como Italia, Francia o España. Según

35

datos del Ministerio de Agricultura, el valor de la producción vinícola en 2013 fue de

2.143 millones de euros, estando la mitad de la producción dedicada a la exportación con un balance positivo de unos 2.600 millones de euros para el sector. La mano de obra que genera el cultivo del viñedo se aproxima a los 18 millones de jornales. Es, por tanto, un sector de extraordinaria relevancia por su importancia en términos  
5 económicos, pero también sociales y medioambientales, así como por la importancia del vino como imagen del país en el exterior.

El mercado actual del vino exige la obtención de productos de composición armónica, carentes de defectos organolépticos, que permita conservar su sabor y los aromas  
10 positivos del afrutado y del carácter varietal. Reacciones físicas y químicas, así como la captación de sustancias extrañas, pueden ocasionar defectos del vino, como gustos azufrados, defectos metálicos, sabor a tanino y corcho, etc. Generalmente, se pueden atenuar e incluso anular los defectos de un vino dentro de ciertos límites sometiéndolo a los tratamientos idóneos. Por tanto, la identificación rápida y precisa de estos defectos  
15 resulta muy útil para corregir el problema antes de que se convierta en importante e irreversible, con la consecuente repercusión negativa en la reputación y economía de la bodega productora. Por tanto, es de vital importancia la realización de controles exhaustivos del estado sanitario de la uva, de las etapas de la vinificación y del producto final para obtener vinos sin defectos.

20 En general, es posible asociar las desviaciones organolépticas en un vino con el grupo de sustancias químicas responsables, lo que permite su identificación objetiva.

Los compuestos de azufre, formados principalmente durante los procesos de  
25 fermentación, también participan en el aroma característico de cada vino. Cuando algunos de ellos se producen en cantidades superiores a las normales se producen alteraciones del aroma y del sabor. Así, por ejemplo, el  $H_2S$ , que es esencial en la etapa de fermentación, puede reaccionar con etanol o etanal produciendo mercaptanos que aportan el defecto olfativo [C. Flanzy, *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*,  
30 2nd ed., A. Madrid Vicente: Mundi-Prensa, Madrid, 2003; A. Belancic Majcenovic, et al., *Synthesis and Stable Isotope Dilution Assay of Ethanethiol and Diethyl Disulfide in Wine Using Solid Phase Microextraction. Effect of Aging on Their Levels in Wine*, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 6653–6658]. Por otra parte, el dimetil sulfuro participa en el buqué de madurez y en el aroma de recolección tardía, pero puede ser reducido por  
35 levaduras a mercaptanos también. Durante la fermentación se producen también

ésteres del ácido tioacético, con umbrales olfatorios más elevados (200-300 µg/l) que la concentración en el vino (2-20 µg/l), pero que por hidrólisis originan mercaptanos con umbrales más bajos. La formación de trazas de estos compuestos se considera solamente como una pequeña anomalía en la bioquímica de la fermentación, pero su

5 impacto sensorial es notable y perjudicial, puesto que pueden alterar el aroma de los vinos embotellados. El repertorio va desde olor a huevos podridos, a goma quemada y a espárragos cocidos hasta a ajo, cebolla o berza. Este defecto es un concepto bien conocido por cosecheros y consumidores de vino. Debido a la creciente sensibilidad del público consumidor, los olores anómalos a compuestos azufrados constituyen la causa

10 más frecuente de reclamaciones.

Por ello, su detección es de gran interés con el objetivo de realizar diagnósticos precoces de carácter preventivo con el mínimo coste posible.

15 El análisis de mercaptanos generalmente se ha abordado mediante técnicas cromatográficas precedidas de diferentes etapas de preconcentración o separación dada su baja concentración en las muestras, incluyendo extracción en fase sólida [A. Belancic Majcenovic, et al., Synthesis and Stable Isotope Dilution Assay of Ethanethiol and Diethyl Disulfide in Wine Using Solid Phase Microextraction. Effect of Aging on Their

20 Levels in Wine, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 6653–6658; L. Mateo-Vivaracho, et al., Selective preconcentration of volatile mercaptans in small SPE cartridges: Quantitative determination of trace odor-active polyfunctional mercaptans in wine, J. Sep. Sci. 32 (2009) 3845–3853], microextracción en fase sólida del espacio de cabeza [Y. Fang, et al. Sensitive quantification of sulfur compounds in wine by headspace solid-phase

25 microextraction technique, J. Chromatogr. A. 1080 (2005) 177–185], extracción líquido-líquido [C. Pizarro, et al., Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the simultaneous determination of the main compounds causing cork taint and Brett character in wines using gas chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1218 (2011) 1576–1584] o extracción con barra adsortiva [C. Herrera,

30 et al., Development of a stir bar sorptive extraction method for the determination of volatile compounds in orange juices, J. Sep. Sci. 39 (2016) 3586–3593].

Las técnicas electroquímicas, que también se caracterizan por alcanzar buenas capacidades de detección, son más versátiles para la detección de este tipo de

35 compuestos, los cuales pueden sufrir oxidación o reducción electroquímica en el

electrodo de trabajo disponible, teniendo en cuenta el coste considerablemente menor del equipo electroquímico y su tamaño compacto, ideal para análisis *in situ*. Sin embargo, no han sido ampliamente utilizados para la determinación de mercaptanos en vinos. Hasta ahora, solo se han utilizado para la determinación de etanotiol en vinos, representando a los mercaptanos, electrodos de mercurio de gota colgante en el rango de concentración de 200 a 600  $\mu\text{g/l}$  [A. Guarda, et al., Simultaneous Determination of Ethanethiol, Inorganic Sulfide, and Sulfite in Wines by Cathodic Stripping Voltammetry, Food Anal. Methods. 10 (2017) 837–844], electrodos más respetuosos con el medioambiente como electrodos de carbono vitrificado modificados con nanopartículas de oro en el rango de concentración de 7,7 a 36,6  $\mu\text{g/l}$ , electrodos de carbono serigrafiados (SPCE) modificados con nanopartículas de oro en el rango de concentración de 1,6 a 10,9  $\mu\text{g/l}$  [M.A. Alonso-Lomillo, et al., Electrochemical Detection of Mercaptans in Wine Using Gold Nanoparticle-Modified Carbon Electrodes, J. Electrochem. Soc. 168 (2021) y electrodos de carbono vitrificado modificados con polímeros de impresión molecular en el rango de concentración de 300 a 3100  $\mu\text{g/L}$  [O. Domínguez-Renedo, et al., Molecularly imprinted polypyrrole based electrochemical sensor for selective determination of ethanethiol, Talanta 253 (2023) 123936].

En esta matriz compleja, no solo los mercaptanos son especies activas redox clave, sino también fenoles, sulfitos, ácido ascórbico, glutatión, etanol, oxígeno, quinonas, iones metálicos, etc. [P.A. Kilmartin, Electrochemistry applied to the analysis of wine: A mini-review, Electrochem. Commun. 67 (2016) 39–42]. En este contexto, sería ventajoso el uso de sensores basados en ftalocianina de cobalto (CoPh), ya que este material electrocatalítico permite que los tioles se puedan monitorizar a potenciales considerablemente bajos [S. Griveau, M. Gulppi, J. Pavez, J.H. Zagal, F. Bedioui, Cobalt phthalocyanine-based molecular materials for the electrocatalysis and electroanalysis of 2-mercaptoethanol, 2-mercaptoethanesulfonic acid, reduced glutathione and L-cysteine, Electroanalysis. 15 (2003) 779–785].

## 30 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.

De acuerdo con el primer aspecto de la invención, es objeto de la misma proporcionar un sensor de detección de mercaptanos en vinos consistente en un electrodo serigrafiado de carbono modificado con ftalocianina de cobalto, donde el mediador redox ftalocianina de cobalto consiste en 10 µl de una disolución al 4,8% (p/v) en etanol, en concreto para detectar el defecto organoléptico asociado con la presencia de mercaptanos en vinos, de forma sencilla y evitando el contacto directo del sensor con las muestras a medir, facilitando la realización de análisis rutinarios e *in situ*, con el objetivo de llevar a cabo diagnósticos precoces de carácter preventivo con el mínimo coste posible.

10

De acuerdo con el segundo aspecto, la invención proporciona un método amperométrico de tipo “espacio de cabeza” (“Headspace”) para la detección de mercaptanos en vinos mediante dicho sensor, evitando el contacto directo de los dispositivos electroquímicos con la muestra, lo que puede ser sin duda de gran importancia en el análisis en continuo durante las distintas etapas de la vinificación, puesto que no se altera el producto. Asimismo, el número de especies interferentes se ve considerablemente reducido, puesto que únicamente las especies volátiles pueden ejercer algún tipo de influencia en la señal analítica.

## 20 EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un sensor de detección de mercaptanos en vinos consistente en un electrodo serigrafiado de carbono del tipo constituido por un electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar o contraelectrodo, ambos de carbono, y un electrodo de referencia de plata, donde la superficie activa del electrodo de trabajo está modificada con el mediador redox ftalocianina de cobalto.

Los electrodos de carbono serigrafiados, constituidos por un electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar o contraelectrodo, ambos de carbono, y un electrodo de referencia de plata, no están particularmente limitados, pudiendo emplearse, por ejemplo, los electrodos serigrafiados DRP-C11L, suministrados por Dropsens® (Metrohm DropSens, Oviedo, España) o similares.

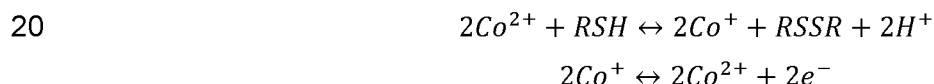
La superficie de trabajo está a su vez modificada con una disolución de ftalocianina de cobalto (II) (CoPh) en etanol, con 10 µl de una disolución al 4,8% (peso/vol) de CoPh en

etanol, la cual se deposita sobre dicha superficie y se deja secar a temperatura ambiente.

De acuerdo con el segundo aspecto, es también objeto de la invención un método tipo  
5 "espacio de cabeza" ("Headspace") para la detección amperométrica de mercaptanos en vinos mediante el sensor aquí descrito.

Así, el método de la invención incluye las etapas de:

- i. disponer una celda sellada que contiene 1 ml de una disolución 0,1 M de KCl y  
10 1 ml de tampón Britton Robinson, pH 2,6, como electrolito de soporte;
- ii. humedecer el sensor de detección antes descrito en el electrolito de soporte, colocarlo en la parte superior de la celda sellada y conectar un potencióstato al mismo;
- iii. aplicar un potencial constante de +0,8 V en condiciones de agitación, hasta  
15 registrar una corriente constante;
- iv. introducir en la celda sellada un volumen de la muestra de vino a analizar;
- v. registrar el incremento de corriente debido al proceso de oxidación que tiene lugar en el electrodo de trabajo en el espacio de cabeza de la celda, de acuerdo con



- vi. correlacionar la corriente registrada en la superficie de trabajo del sensor con la concentración de mercaptanos en la celda.

25

A continuación se describe la invención en referencia a los siguientes ejemplos y figuras.

En las figuras:

- 30 Figura 1: Amperogramas registrados a +0,5 V empleando un electrodo serigrafiado de carbono (SPCE), un electrodo serigrafiado de carbono modificado con ftalocianina de cobalto (CoPh/SPCE), un electrodo de carbono serigrafiado modificado con fullereno C<sub>60</sub> (AC<sub>60</sub>/SPCE) y un electrodo serigrafiado de carbono modificado con ftalocianina de cobalto y fullereno C<sub>60</sub> (CoPh/AC<sub>60</sub>/SPCE) para adiciones sucesivas de 50 µl de una  
35 disolución de etanotiol (representando mercaptanos) de 100 mg/l en 1 ml of electrolito

de soporte a pH 4.

Figura 2: Amperograma registrado a +0,8 V empleando un electrodo serigrafiado de carbono modificado con ftalocianina de cobalto (CoPh/SPCE) para adiciones sucesivas  
5 de 10 µl de una disolución de 1 mg/l de etanotiol (representando mercaptanos) en 1 ml de electrolito de soporte pH 2,6.

### Ejemplos

10 En los siguientes ejemplos, todos los reactivos utilizados fueron de grado reactivo analítico. Todas las soluciones se prepararon en agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Se emplearon disoluciones tampón KCl 0,1 M (Merck, Darmstadt, Alemania) y Britton Robinson (BR), que contienen ácido fosfórico 0,04 M (Panreac, Barcelona, España), ácido acético 0,04 M (VWR Chemical, Fontenay, Francia) y ácido bórico 0,04  
15 M (Panreac, Barcelona, España), como electrolito de soporte para las medidas electroquímicas. Se utilizaron disoluciones de NaOH 1 M (Ecros, Barcelona, España) para ajustar el valor de pH de las disoluciones tampón.

Las soluciones de ftalocianina de cobalto (CoPh) se prepararon disolviendo la cantidad  
20 de ftalocianina de cobalto (II) (Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemania) en etanol (VWR Chemicals, Rosny-sous-Bois, Francia) como disolvente. Se prepararon disoluciones de EtSH (Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemania), representando a los mercaptanos, disolviendo la cantidad adecuada en agua Milli-Q.

25 Se utilizaron electrodos de carbono serigrafiados (SPCE) (DRP-C11L, DRP-110CNT, DRP-110GPHOX, DRP-110RGPHOX, 110CSQD) suministrados por Dropsens (Metrohm DropSens, Oviedo, España) para realizar el electroanálisis de mercaptanos.

Las mediciones electroquímicas se llevaron a cabo utilizando un potenciostato  
30 PalmSens4 (Palmsens BV, Houten, Países Bajos) utilizando SPCE con diferentes modificaciones de la superficie del electrodo de trabajo.

Ejemplo 1: Modificación del electrodo de trabajo con ftalocianina de cobalto

35 La modificación del electrodo de trabajo de diferentes SPCE con CoPh se realizó

mediante drop-casting. Se colocó un volumen de 10 µl de una disolución de CoPh al 4,8% (peso/vol) en etanol sobre la superficie del electrodo, excepto para el proceso de optimización, y se dejó secar a temperatura ambiente.

## 5 Ejemplo 2: Mediciones electroquímicas

Antes de usar los dispositivos, los SPCE se humedecieron con el electrolito de soporte correspondiente, de tal manera que queda precargado por adsorción. A continuación, se colocó en el espacio de cabeza de una celda sellada (Metrohm DropSens, Oviedo, España) que contenía 1 ml de BR pH 2,6, y se realizaron medidas amperométricas aplicando un potencial constante de +0,8 V, excepto para el proceso de optimización, en condiciones de agitación. Una vez que se alcanzó una corriente constante, se agregó a la celda un volumen determinado de la disolución de analito correspondiente, registrando el incremento correspondiente en la corriente registrada debido al proceso de oxidación que tiene lugar en la superficie del electrodo.

En primer lugar se estudiaron las respuestas electrocatalíticas de CoPh en comparación con los electrodos de trabajo desnudos para la detección amperométrica de EtSH utilizando diferentes SPCE: carbono (DRP-C11L), nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con carboxilo (MWCNT-COOH) (DRP-110CNT), óxido de grafeno (DRP-110GPHOX), óxido de grafeno reducido (DRP-110RGPHOX) y electrodos basados en puntos cuánticos ZnS/CdSe (DRP-110CSQD). En la mayoría de los amperogramas registrados se encontró una corriente ruidosa de escasa utilidad analítica, excepto cuando el electrodo de trabajo de carbón estaba modificado con CoPh (CoPh/SPCE) y con CoPh y AC60 (CoPh/AC60/SPCE). La figura 1 muestra la corriente de oxidación mejorada especialmente registrada empleando CoPh/SPCE, por lo que se decidió continuar trabajando con este dispositivo para la cuantificación de mercaptanos.

La selectividad, en amperometría, está relacionada con el potencial redox del analito de interés. Además del potencial aplicado, el pH del electrolito de soporte y la concentración de la disolución de CoPh utilizada para modificar el electrodo, en porcentaje, son variables experimentales de gran influencia en la corriente de oxidación registrada como respuesta analítica. Así, se realizó un diseño en forma de modelo matemático para determinar la relación entre estas variables y la corriente de oxidación de una disolución de EtSH (98 µg/l), tomada como respuesta. Las condiciones aplicadas se muestran en

la siguiente tabla 1:

Tabla 1

|    | pH electrolito de soporte | Concentración de disolución CoPh (%) | Potencial aplicado (V) |
|----|---------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| 1  | 4                         | 15                                   | 0,3                    |
| 2  | 8                         | 15                                   | 0,3                    |
| 3  | 4                         | 45                                   | 0,3                    |
| 4  | 8                         | 45                                   | 0,3                    |
| 5  | 4                         | 15                                   | 0,7                    |
| 6  | 8                         | 15                                   | 0,7                    |
| 7  | 4                         | 45                                   | 0,7                    |
| 8  | 8                         | 45                                   | 0,7                    |
| 9  | 2,6                       | 30                                   | 0,5                    |
| 10 | 9,4                       | 30                                   | 0,5                    |
| 11 | 6                         | 4,8                                  | 0,5                    |
| 12 | 6                         | 55,2                                 | 0,5                    |
| 13 | 6                         | 30                                   | 0,2                    |
| 14 | 6                         | 30                                   | 0,8                    |
| 15 | 6                         | 30                                   | 0,5                    |
| 16 | 6                         | 30                                   | 0,5                    |
| 17 | 6                         | 30                                   | 0,5                    |

Los resultados se evaluaron mediante el programa Statgraphics (STATGRAPHICS, STATGRAPHICS Centurion 19, Statgraphics Technol. Inc.), obteniendo la siguiente ecuación de regresión del modelo ajustado:

Corriente de oxidación EtSH =  $-2,63662 - 0,572209 \times \text{pH} - 0,269559 \times \text{concentración de CoPh} + 37,3274 \times \text{Potencial aplicado} + 0,0709905 \text{ pH}^2 + 0,026476 \times \text{pH} \times \text{concentración de CoPh} - 2,75445 \times \text{pH} \times \text{Potencial aplicado} + 0,00390899 \times \text{concentración de CoPh}^2 - 0,266385 \times \text{concentración de CoPh} \times \text{Potencial aplicado} - 8,94781 \times \text{Potencial aplicado}^2$ .

A partir de estos valores, la combinación que maximizó la corriente de oxidación de EtSH en la región indicada fue:

pH del electrolito de soporte = 2,6, potencial aplicado = +0,8 V y concentración de la

disolución de CoPh = 4,8 % (peso/vol).

Bajo estas condiciones experimentales, se observó una respuesta amperométrica bien definida debido a la oxidación de EtSH en la superficie del electrodo de trabajo (Figura 2).

5

La respuesta de corriente medida en la superficie del electrodo de trabajo depende de la concentración de EtSH. Así, se construyeron diferentes curvas de calibración bajo las condiciones óptimas de las variables experimentales, en el rango de concentración de EtSH de 9,9 a 82,6 µg/l, para validar el método analítico en términos de precisión y capacidad de detección. La precisión, generalmente especificada en términos de desviación estándar relativa (RSD), a menudo varía con la concentración del analito, por lo que considerar las pendientes de tales regresiones evita este inconveniente ya que se evalúan diferentes niveles de concentración simultáneamente. Se obtuvo una RSD de 7 % (n = 5) para la reproducibilidad, lo que destaca la concordancia entre los resultados registrados al utilizar diferentes CoPh/SPCE. En relación a la capacidad de detección (CC $\beta$ ) y el límite de decisión (CC $\alpha$ ), se encontraron valores de 12,5 µg/l y 6,5 µg/l ( $\alpha = \beta = 0,05$ ) respectivamente.

También se estudió la selectividad en la determinación de EtSH mediante el procedimiento descrito, considerando la posibilidad de que otros mercaptanos, como el ácido 4-mercaptobenzoico, o compuestos fenólicos, como el 4-etilfenol o el 4-etilguayacol, interfirieran en las medidas. En las condiciones óptimas de las variables experimentales para la detección de EtSH, no se detectó alteración de la señal amperométrica registrada por la presencia de estos compuestos, incluso en concentraciones superiores a 1 mg/l, por lo que no se consideraron interferentes.

Finalmente, la aplicabilidad del método descrito se validó mediante experimentos de veracidad, en los que los vinos se analizaron tanto en su estado original como después de la adición de una cantidad conocida del analito a la porción de prueba, de acuerdo con M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), Pure Appl. Chem. 74 (2002) 835–855.

Así, se analizaron dos muestras de vino blanco y dos de vino tinto aplicando el método de adiciones de analito a una alícuota de cada muestra de vino, de acuerdo con el

siguiente procedimiento:

- i. disponer la celda sellada con 1 ml de una disolución 0,1 M de KCl y 1 ml de tampón Britton Robinson, pH 2,6, como electrolito de soporte;
- ii. humedecer el sensor de detección en el electrolito de soporte, colocarlo en la parte superior de la celda sellada y conectar un potenciostato al mismo;
- iii. aplicar un potencial constante de +0,8 V en condiciones de agitación, hasta registrar una corriente constante;
- iv. introducir en la celda sellada un volumen de la muestra de vino a analizar, con lo que se registra un incremento de corriente y una vez que vuelve a ser constante, se introduce en la celda un volumen de la disolución madre de EtSH;
- v. repetir la introducción en la celda de un volumen de disolución madre de EtSH varias veces hasta que no se registren más incrementos de corriente;
- vi. correlacionar la corriente registrada en la superficie de trabajo del sensor con la concentración de mercaptanos en la celda.

Los resultados se muestran en la tabla 2:

Tabla 2

| Muestra              | Concentración añadida (ppb) | Concentración encontrada (ppb) | Recuperación (%) |
|----------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------|
| <b>Vino blanco 1</b> | -                           | No detectado                   | -                |
|                      | 9,8                         | $10,0 \pm 0,2$                 | 102,4 %          |
|                      | 19,2                        | $19,3 \pm 0,4$                 | 100,2 %          |
| <b>Vino blanco 2</b> | -                           | No detectado                   | -                |
|                      | 9,8                         | $9,6 \pm 0,2$                  | 97,9 %           |
|                      | 19,2                        | $19,5 \pm 0,3$                 | 101,4 %          |
| <b>Vino tinto 1</b>  | -                           | No detectado                   | -                |
|                      | 9,8                         | $10,1 \pm 1,0$                 | 103,1 %          |
|                      | 19,2                        | $19,4 \pm 0,5$                 | 100,9 %          |
| <b>Vino tinto 2</b>  | -                           | No detectado                   | -                |
|                      | 9,8                         | $9,5 \pm 0,8$                  | 96,8 %           |
|                      | 19,2                        | $19,7 \pm 2,9$                 | 102,5 %          |

Como se puede observar en la tabla anterior, no se encontró presencia de EtSH en ninguno de ellos. A continuación, se realizaron experimentos de recuperación mediante el análisis de dos niveles de muestras de vino enriquecido, obteniendo buenos valores que oscilaron entre el 97 y el 103 %.

5

Ejemplos comparativos:

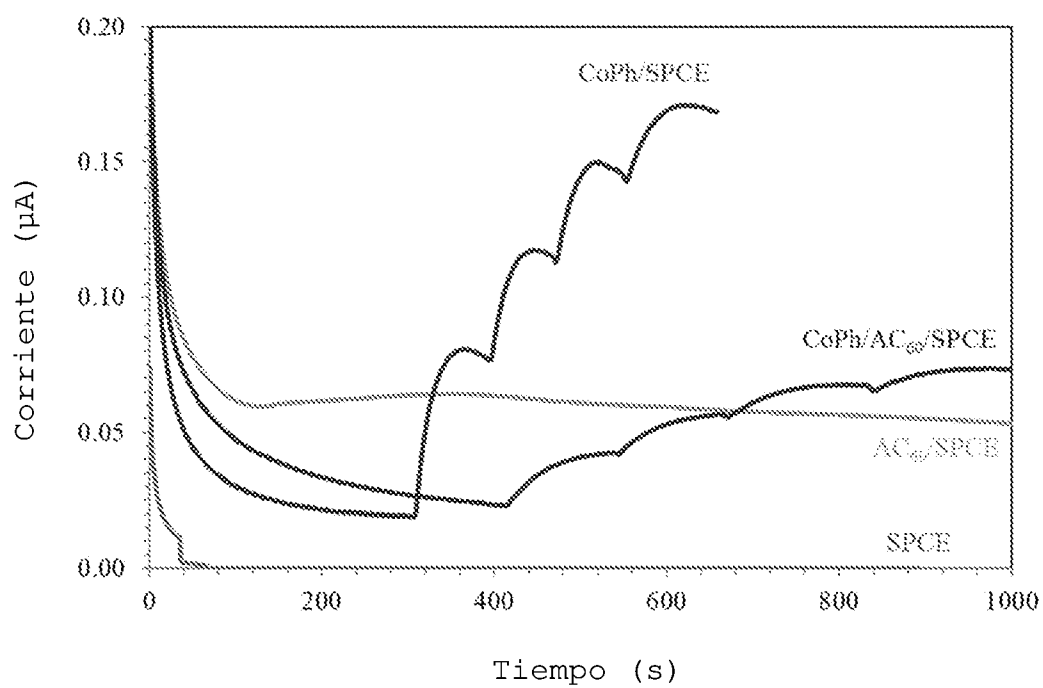
El método descrito supera claramente a los anteriormente descritos para la de detección de EtSH en muestras de vino. En términos de rango de concentración, 9,9 a 82,6 µg/l, el método descrito es del orden de los mejores previamente utilizados con este fin, con la ventaja de que al medir en el espacio de cabeza se reducen las interferencias y, sobre todo, que no se pone en contacto el dispositivo con la muestra de vino, por lo que no se altera el producto.

15 A este respecto, en el método de detección de mercaptanos en vinos utilizando electrodo de mercurio, el rango de concentración es de 200 a 600 µg/l [A. Guarda, et al., Simultaneous Determination of Ethanethiol, Inorganic Sulfide, and Sulfite in Wines by Cathodic Stripping Voltammetry, Food Anal. Methods. 10 (2017) 837–844]. En el caso del método de detección de mercaptanos en vinos utilizando electrodo de carbono vitrificado modificado con AuNP, el rango de concentración es de 7,7 a 36,6 µg/l [M.A. Alonso-Lomillo, et al., Electrochemical Detection of Mercaptans in Wine Using Gold Nanoparticle-Modified Carbon Electrodes, J. Electrochem. Soc. 168 (2021)]. En el método de detección de mercaptanos en vinos utilizando electrodo serigrafiado de carbono modificado con AuNP, el rango de concentración es de 1,6 a 10,9 µg/l [M.A. 25 Alonso-Lomillo, et al., Electrochemical Detection of Mercaptans in Wine Using Gold Nanoparticle-Modified Carbon Electrodes, J. Electrochem. Soc. 168 (2021)]. Finalmente, en el método de detección de mercaptanos en vinos utilizando electrodo de carbono vitrificado modificado con polímero de impresión molecular y AuNP, el rango de concentración es de 300 a 3.100 µg/L [O. Domínguez-Renedo, et al., Molecularly 30 imprinted polypyrrole based electrochemical sensor for selective determination of ethanethiol, Talanta 253 (2023) 123936].

## REIVINDICACIONES

- 1.-Sensor de detección de mercaptanos en vinos consistente en un electrodo serigrafiado de carbono del tipo constituido por un electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar o contraelectrodo, ambos de carbono, y un electrodo de referencia de plata, donde la superficie activa del electrodo de trabajo está modificada con el mediador redox ftalocianina de cobalto; caracterizado por que el mediador redox ftalocianina de cobalto consiste en 10 µl de una disolución al 4,8% (p/v) en etanol.
- 2.-Método tipo espacio de cabeza para la detección amperométrica de mercaptanos en vinos, que consiste en las siguientes etapas:
- i. disponer una celda sellada que contiene 1 ml de una disolución 0,1 M de KCl y 1 ml de tampón Britton Robinson, pH 2,6, como electrolito de soporte;
  - ii. humedecer el sensor de detección de mercaptanos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en el electrolito de soporte, conectando un potencióstato al mismo;
  - iii. aplicar un potencial constante de +0,8 V en condiciones de agitación, hasta registrar una corriente constante;
  - iv. introducir en la celda sellada un volumen de la muestra de vino a analizar;
  - v. registrar el incremento de corriente debido al proceso de oxidación que tiene lugar en el electrodo de trabajo del sensor de detección de mercaptanos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en el espacio de cabeza de la celda;
  - vi. correlacionar la corriente registrada en la superficie de trabajo del sensor de detección de mercaptanos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 con la concentración de mercaptanos en la celda.

**Figura 1**



**Figura 2**

