



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 185 462**

② Número de solicitud: 200002623

⑤ Int. Cl.7: **G01N 31/22**
G01N 33/18

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **31.10.2000**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2003**

Fecha de la concesión: **19.07.2004**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **16.09.2004**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.09.2004

⑦ Titular/es: **Universidad de Granada**
Acera de San Ildefonso, 42
18071 Granada, ES

⑦ Inventor/es: **Capitán Vallvey, Luis Fermín;**
Avidad Castañeda, Ramiro;
Fernández Ramos, María Dolores y
Ariza Avidad, Antonio

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Sensor de un solo uso para la detección y determinación de nitrito en aguas.**

⑦ Resumen:

Sensor de un solo uso para la detección y determinación de nitrito en aguas.

Sensor de un solo uso para la detección y determinación de nitrito en aguas, usado para conocer de forma rápida, simple y económica la presencia y/o concentración de iones nitrito en aguas sin pretratamiento de la muestra y que consta de una lámina de poliéster, en cuyo centro hay una película circular, que constituye la parte activa del sensor; su cambio de color, de incoloro transparente a rojo-violeta, cuando el sensor se introduce en la disolución problema, indica la concentración de nitrito por medida de su absorción de radiación a la longitud de onda de 543 nm. Su principal aplicación es para identificación y determinación de nitrito en aguas de todo tipo. El sensor es una alternativa a los métodos de análisis convencionales.

ES 2 185 462 B1

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

DESCRIPCION

Sensor de un solo uso para la detección y determinación de nitrito en aguas.

Sector de la técnica

Análisis químicos utilizando procedimientos rápidos.

Estado de la técnica

La presencia de compuestos nitrogenados en aguas naturales tanto superficiales como subterráneas es habitual pues intervienen en reacciones bioquímicas necesarias para satisfacer los requerimientos metabólicos de organismos vivos. Sin embargo, el vertido de aguas residuales tanto urbanas como industriales y el abonado agrícola, por citar los factores más importantes, aumenta el contenido en materia nitrogenada en las aguas. Esta materia se puede encontrar en forma de nitrógeno orgánico o inorgánico; principalmente amoníaco, nitrito y nitrato. Bajo condiciones ambientales adecuadas y en presencia de oxígeno, muchos compuestos nitrogenados orgánicos pueden sufrir una serie de reacciones enzimáticas que originan amoníaco, el cual es oxidado a nitrito y nitrato. Estas dos últimas etapas, formación de nitrito y nitrato, constituyen el proceso de nitrificación y es llevado a cabo por bacterias como *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*.

Los nitratos, aparte de otros problemas, pueden reducirse de forma bacteriana en el aparato digestivo de algunos individuos, especialmente lactantes, a nitritos que reaccionan con la hemoglobina dando lugar a una metahemoglobinemia. Por otra parte los nitritos, sea cual sea su origen, reaccionan con aminos secundarias y terciarias de origen alimentario para dar lugar a nitrosaminas; compuestos que tienen reconocida acción carcinogénica.

En consecuencia el análisis de nitrito en agua es necesario no solo por el carácter no deseable que presenta sino porque sirve de indicador de contaminación bacteriana. De hecho la normativa legal española (R.D. 1138/1990; BOE 226, 27488-27497, 20/9/1990 y Directiva relativa a la calidad del agua de consumo. Posición Común, 16,10,97) exige para un agua potable de consumo público una concentración máxima admisible de nitritos de 0,1 mg/L. El análisis de este parámetro en aguas forma parte del denominado análisis mínimo que se debe realizar para toda agua potable de consumo público de forma periódica dependiendo del tamaño de la población abastecida.

La forma habitual de llevar a cabo este análisis exige la toma de muestra, su conservación mediante refrigeración a 4°C o con H₂SO₄ a pH < 2 y su transporte al laboratorio donde se debe realizar el análisis con la menor dilación posible y en cualquier caso en las 24 horas inmediatas a la toma de muestra.

Sin embargo una de las tendencias actuales en la metodología analítica es obtener la información química en el lugar donde el cliente o usuario la necesite sin necesidad de una cuidadosa toma de muestra, conservación, transporte y análisis en un laboratorio realizado por personal preparado.

Una posible solución es el uso de ensayos rápidos, conocidos en inglés como test methods o test kits (Unger-Heumann, M., *Fresenius J. Anal. Chem.* 354, 803 (1996)), los cuales permiten la detección o determinación de analitos sin el concurso de personal adiestrado, tratamiento de muestras, uso de laboratorio o instrumentación convencional (Zolotov, Y., *Annali di Chimica*, 87, 285 (1997)). La información que proporcionan estos procedimientos se puede usar no solo para obtener información rápida, tanto cualitativa como cuantitativa, sino también para establecer la presencia de un constituyente por encima de determinado nivel, lo que reduce el número de muestras a enviar al laboratorio. Se pueden entender este tipo de métodos como un primer escalón en la obtención de información química, racionalizando el uso del laboratorio convencional.

Los métodos rápidos son métodos analíticos (reacciones y procesos) que consisten en una o varias reacciones químicas y en un sistema de evaluación bien ajustados entre sí. Con frecuencia se usan efectos visuales fácilmente observables, por comparación con una carta de colores, o mensurables. La mayoría de los métodos de evaluación se pueden clasificar en: visuales, colorimétricos, fotométricos, reflectométricos, volumétricos, enzimáticos, inmunológicos y bioensayos.

Los análisis mediante ensayos rápidos se pueden llevar a cabo por dos vías: en disolución o en fase sólida. Los primeros se basan en reacciones que se llevan a cabo en una disolución que contiene todos los reactivos necesarios y a la que se añade el problema. Existen una serie de empresas (Merck, Chemetrics, Millipore, Hach) que fabrican y venden los reactivos, materiales e instrumentación necesaria para realizar

estos ensayos, entre los cuales se encuentra el de nitrito.

Los sistemas de fase sólida más habituales son las tiras reactivas, test strips, que consisten en pequeñas láminas de material plástico con matrices o zonas de reacción adheridas mediante adhesivos o termosoldadura. Estas matrices pueden ser papeles celulósicos impregnados de reactivos, películas recubiertas con reactivos conteniendo algún polímero tal como poliuretano o capas especiales conteniendo reactivos. Como soporte sólido se ha utilizado celulosa o sus derivados, fibra de vidrio y diversos polímeros sintéticos tales como polipropileno, tanto en lámina como en pequeñas esferas.

El contacto de esta tira con la muestra problema desencadena un conjunto de reacciones y procesos que permiten la estimación del analito presente. Estimación que se puede hacer visualmente usando una carta de color para obtener una estimación cualitativa o semicuantitativa, o bien usar un pequeño instrumento, usualmente diseñado con ese propósito, con el que se mide alguna propiedad óptica (absorbancia, reflexión) o eléctrica (intensidad, voltaje). Este tipo de sistema analítico se usó mucho a partir de la década de los 70 y 80 en análisis clínicos (Dry Reagent Chemistries ó Química Seca) (Walter, B., *Anal. Chem.*, 55, 498A (1983)) y en menor extensión en análisis ambiental, existiendo diversas empresas que los comercializan (Merck, Macherey-Nagel, Environmental Test Systems, Kyoritsu).

Las tiras reactivas usadas en análisis clínicos son habitualmente piezas de material adsorbente pegadas sobre láminas estrechas de plástico e impregnadas con los reactivos y tampones necesarios para que la reacción analítica tenga lugar después de ser humedecidas por el fluido a investigar (orina, suero sanguíneo). Existe un gran número de tales ensayos rápidos (U.S. Pat. 4,645,744 (1987), U.S. Pat. 5,302,346 (1994), U.S. Pat. 5,824,491 (1998), U.S. Pat. 4,824,640 (1989), PCT WO 34191 (1999)), algunos de los cuales están comercializados para glucosa, proteínas, enzimas y muchos otros analitos (Bayer (Ames), Roche (Boehringer Mannheim), Johnson & Johnson (Eastman Kodak), Menarini).

El uso de materiales opacos y no homogéneos tales como la celulosa en la fabricación de las tiras reactivas introduce una fuente de error en la evaluación de sus propiedades ópticas. Por otra parte, las habituales determinaciones reflectométricas (radiación reflejada) están basadas en métodos aproximados (ecuación de Kubelka-Munk) y no ofrecen la precisión de las medidas de radiación transmitida.

Se han hecho diversos intentos para preparar tiras reactivas transparentes que absorban líquidos mediante el uso de polímeros formadores de películas y un constituyente humectable.

En esta patente hacemos uso de metodologías usadas para la fabricación de sensores tales como las de cloruro de polivinilo (PVC) plastificado, Nafion[®], etc (Seiler, K. y Simon, W., *Analytical Chim. Acta*, 266, 73 (1992)) para desarrollar una base transparente desechable para la tira reactiva.

Existen antecedentes como las propuestas de Kaneko *et al.* (Kaneko E., Tanno H., Yotsuyanagi T., *Mikrochim. Acta*, III, 333 (1988) y Kaneko E., Tanno H., Yotsuyanagi T., *Mikrochim. Acta*, I, 37 (1991)) para la determinación de elementos traza en agua de mar. En ellos se añaden todos los reactivos a la muestra de agua y, tras reaccionar, se añade una lámina de PVC en la que se fija el producto de reacción mediante agitación. Se usa una carta de colores para evaluación semicuantitativa Posteriormente T. Saito propuso la determinación de cobre (Saito, T., *Talanta*, 41, 5, 811 (1994)) usando una membrana de PVC con batocuproina o la de hierro (Saito, T., *Anal. Chim. Acta*, 268, 351 (1992)) en la que la membrana de PVC fija batofenantrolina como reactivo. En ambos casos es necesario la adición previa a la disolución de algunos reactivos, tales como picrato en el caso de cobre y yoduro y sulfato de hidroxilamonio en el de hierro, por lo que en sentido estricto no se deberían considerar sensores. Análogo es el caso de la determinación de alquilbenceno sulfonatos basado en la retención de su par iónico con Violeta Cristal en una membrana de PVC (Tanaka, K. Hiroyuki, K. y A. Kawahara, *Bunseki Kagaku* 23, 650 (1974)).

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado un método para la determinación de cinc en agua mediante un sensor óptico de un solo uso que emplea ditizona como reactivo cromogénico (Capitán-Vallvey, L.F., Avidad Castañeda, R., Fernández Ramos, M.D., Alvarez de Cienfuegos. P. y Ariza Avidad, A., Patente pendiente, No. P9900718).

Existen diversas tiras reactivas comercializadas para la detección y determinación semicuantitativa de nitrito. Entre las que se emplean en el área de análisis ambientales, especialmente para aguas, podemos citar las varillas para análisis rápidos Merckoquant[®] que ofrecen información semicuantitativa por comparación visual entre 1 y 80 mg/L, y RQ Flex[®], ambas de Merck, que mide entre 0,02 y 3 mg/L de nitrito usando un reflectómetro de bolsillo. Similarmente tenemos las tiras semicuantitativas Quantofix[®] de Macherey-Nagel que operan entre 1 y 3000 mg/L de nitrito utilizando una carta de colo-

res.

Sin embargo donde son de uso más común las tiras reactivas para nitrito es en análisis clínico para diagnosticar infecciones del tracto urinario causadas por bacterias tales como *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Stafilococcus* o *Enterococcus*. Esas bacterias son capaces de reducir enzimáticamente los nitratos a nitritos. Dado que la orina vesical de una persona sana no contiene bacterias, la detección de nitritos en orina es indicación de infección bacteriana del tracto urinario (pelvis renal o vejiga) (U.S. Patent 4,631,255 (1986)). También se ha utilizado para distinguir de forma rápida entre alergias e infecciones (U.S. Patent 5,910,421 (1999)). Las más habituales son las tiras multiparamétricas que contienen en una tira de plástico una serie de pequeños cuadrados de material poroso que están impregnados con los reactivos necesarios para responder a diferentes analitos, que pueden ser hasta lo, al ser mojados con orina. Así la sensibilidad de las tiras multiparamétricas de Ames Co. es de 0,6 mg/L de nitrito mientras que la de Boehringer-Mannheim es de 0,75 mg/L (J.M. Guardiola, "Las tiras reactivas y el cribado de orinas para examen de sedimento" en "La orina y su análisis", Q.F. Bayer, Madrid 1995).

Con estas premisas, hemos desarrollado un sensor óptico capaz de detectar la presencia de ion nitrito en aguas naturales en concentraciones que pueden oscilar entre 2,5 y 3000 $\mu\text{g/L}$. Para ello nos basamos en la conocida reacción de formación de azocolorantes por diazotación de la sulfanilamida y posterior copulación con la N-(1-naftil)etilendiamina.

La formación de diazoderivados, colorantes azoicos, fue estudiada en 1858 por J. P. Griess, quien en 1879 sugirió su uso para la determinación de pequeñas cantidades de nitrito, método que con diversas modificaciones se sigue empleando hoy en día con este fin.

El ión nitrito tiene carácter básico débil y se protona con facilidad originando ácido nitroso (pK_a 3,4) que es el que produce las reacciones que permiten su determinación. Esta determinación involucra al menos tres etapas: formación de la especie nitrosante, diazotación y copulación.

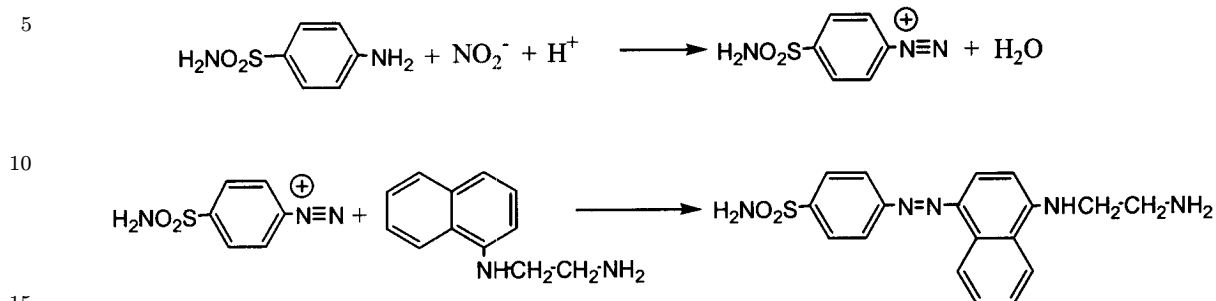
Las reacciones que pueden originar la especie nitrosante (NO^+) a partir de ácido nitroso pueden ser varias y de diferente molecularidad; dependiendo el que se dé una u otra de la acidez, de los aniones presentes, de la concentración de nitrito y de la temperatura (J.B. Fox, CRC, Critical Review Anal. Chem., 15, 1283 (1984)). Las reacciones subsiguientes son asimismo complejas ya que la velocidad de reacción depende no solo de la concentración de especie nitrosante sino de los reactivos a nitrosar. Las aminas aromáticas, anilina y derivados sustituidos, se nitrosan con facilidad y, en condiciones normales, sufren una reorganización interna para formar sales de diazonio o bien nitroso derivados. La velocidad a la que tiene lugar la reorganización interna es función de los sustituyentes presentes en el anillo aromático. Así pues, la velocidad global de formación del ión diazonio es una función compleja de la reactividad de la especie nitrosante y de la amina aromática en la reacción de nitrosación y de la reactividad del N-nitroso derivado en la reacción de reorganización (J.B. Fox, Anal. Chem., 51, 1493 (1979)).

Para formar el subsiguiente colorante azoico, que será el usado con fines analíticos, el ión diazonio reacciona con un reactivo copulante a través de una posición del núcleo aromático que tenga alta densidad electrónica, generalmente el carbono en posición para del anillo. Por otra parte, el reactivo copulante, habitualmente 1-naftilaminas sustituidas, puede ser atacado directamente por la especie nitrosante, pues al igual que el ión diazonio, la especie nitrosante es reactivo electrofílico y ambos reaccionan de forma similar. La reacción de copulación, como vemos, es una reacción compleja con gran número de posibles reacciones laterales que pueden no conducir a la formación del cromóforo o a la de un cromóforo diferente del buscado.

En esta ocasión vamos a usar una modificación de la reacción original de Griess que empleaba como reactivos el ácido sulfanílico y la α -naftilamina. Esta modificación que utiliza sulfanilamida y N-(1-naftil)etilendiamina supone una mejora en la reacción. La copulación de la sal de diazonio del ácido sulfanílico con la α -naftilamina es relativamente lenta (requiere entre 10 y 30 minutos para el desarrollo total del color). Por otra parte estos reactivos son insolubles en agua, por lo que se deben usar disolventes orgánicos apolares o, si se quiere disolver en agua, utilizar ácido acético glacial.

La sulfanilamida sí es soluble en agua (preferentemente a pH inferiores a 7) y su uso disminuye a 2 minutos el tiempo requerido para el desarrollo del color cuando se copula con N-(1-naftil)etilendiamina, manteniéndose el color desarrollado durante varias horas. Además es más estable que el ácido sulfanílico tanto en disolución como en estado sólido. En cuanto a la N-(1-naftil)etilendiamina, es insoluble en agua y disolventes polares, por lo que se usa como cloruro del ácido conjugado, ligeramente soluble en alcohol y muy soluble en éter y moderadamente en benceno.

El mecanismo simplificado de la reacción se puede esquematizar como sigue:



En estado sólido y en las condiciones en las que se utiliza el sensor propuesto en este caso, el azo-compuesto posee un color violeta rojizo intenso, que es fácilmente distinguible de la situación inicial en la que se observa una zona incolora y transparente correspondiente a los reactivos cuando están libres y fijados en la membrana.

La estabilidad del sensor viene limitada por la fotosensibilidad de la amina que sufre procesos de oxidación. De igual forma puede sufrir estos procesos en presencia de agentes de naturaleza oxidante; por lo que su uso queda restringido a matrices exentas de estas sustancias.

25 Explicación de la invención

El sensor está formado por una lámina soporte de poliéster cuyas dimensiones pueden ser 6 cm de largo por 1 cm de ancho, siendo el espesor de la lámina entre 0,125 mm y 0,5 mm. En una de las caras de la lámina (véase Figura 1) se encuentra la zona activa del sensor que se obtiene depositando un volumen de 30 μL de una disolución formada por los siguientes reactivos químicos: 0,7 mg de N-(1-naftil)etilendiamina, 7 mg de sulfanilamida y 0,6 mL de una disolución de Nafion[®] (polímero cambiador iónico perfluorado preparado como copolímero de tetrafluoroetileno y perfluoro-[2-(fluorosulfoniletoxi)propilnileter] en una mezcla de alcoholes alifáticos de bajo peso molecular y agua al 10%). Tras agitar la mezcla hasta su total disolución y homogeneización, se toma el volumen necesario para construir el sensor, depositándolo sobre la lámina de poliéster que se encuentra girando a 90 r.p.m. en un sistema rotatorio preparado al efecto y dejándolo secar posteriormente. La zona activa del sensor obtenido es incolora y transparente.

Para optimizar la composición de la zona activa del sensor se realizó un estudio univariante de la influencia de la proporción de los componentes utilizados para preparar la zona sensora. Este estudio se realizó como sigue:

La influencia de la cantidad de sulfanilamida se estableció preparando sensores a partir de disoluciones conteniendo entre 0,5 y 10 mg de sulfanilamida y manteniendo constantes las proporciones del resto de los componentes.

La influencia de la N-(1-naftil)etilendiamina se estudió siguiendo el mismo procedimiento a partir de disoluciones conteniendo entre 0,1 y 1,5 mg de N-(1-naftil)etilendiamina. La influencia del Nafion[®] se estableció entre 0,4 y 2,0 ml.

Al utilizar estos sensores con disoluciones de ion nitrito se observó que la mejor señal; es decir, la máxima absorbancia se obtenía con los sensores preparados a partir de disoluciones con las siguientes concentraciones: 7 mg de sulfanilamida, 0,7 mg de N-(1-naftil)etilendiamina y 0,6 ml de Nafion[®].

Para optimizar la respuesta del sensor ante la presencia de nitrito en diferentes condiciones de trabajo, se estudió la influencia de los parámetros experimentales pH y fuerza iónica de la muestra.

El rango de pH en el que la respuesta es máxima es el comprendido entre 2 y 2,5. Fuera de este rango de pH la reacción se hace más lenta. La adición de 0,1 mL de ácido clorhídrico concentrado es suficiente para ajustar el pH. La influencia que ejerce el aumento de la fuerza iónica del medio consiste en una disminución de la velocidad de la reacción, en una lixiviación del azocolorante y en una rotura de la membrana. Se ha estudiado esta influencia con cloruro sódico encontrándose que por debajo de 0,5

M la fuerza iónica no influye de manera apreciable. Es posible, en consecuencia, la utilización del sensor para la determinación de nitrito en agua de mar que presenta valores de fuerza iónica en torno a 0,6 M.

5 Se ha observado que el sensor guardado en una bolsa opaca termosellada y a temperatura ambiente se conserva al menos durante treinta días. Por el contrario la acción de la luz solar, la humedad y el oxígeno atmosférico hacen que su estabilidad no sea mayor de 24 horas.

Descripción de los dibujos

10 La Figura 1 indica la forma y las dimensiones del sensor propuesto.

Modo de utilizar la invención

15 El procedimiento para utilizar el sensor es como sigue: en un vaso de precipitado de 25 mL se introducen 20 mL del agua problema o de la disolución que queremos analizar y 0,1 mL, o la cantidad necesaria, de una disolución de ácido clorhídrico concentrado, hasta fijar el pH en el intervalo 2-2,5 que se corroborará con un papel indicador universal. Alternativamente se puede utilizar un tubo de polietileno con tapón de rosca y capacidad 10 ml ajustando el pH de forma similar a la anterior.

20 A continuación se introduce el sensor en la disolución y se agita bien manualmente o con agitación magnética por un tiempo comprendido entre 5 y 90 minutos dependiendo del nivel de nitritos. Transcurrido este tiempo se observa el color desarrollado comparando con una carta de color, o se mide la absorbancia de la zona activa del sensor a 536 nm con ayuda con un fotómetro o un espectrofotómetro.

25 *Características analíticas del sensor para la determinación de nitrito*

Dado que el tiempo de contacto de la tira reactiva con la muestra problema depende de la concentración en nitrito en esta, hemos establecido diversas rectas de calibrado a modo de ejemplo. En general, un aumento del tiempo de reacción permite disminuir el límite de detección; mientras que si el nivel de concentración de nitrito es alto se podrá disminuir el tiempo de espera.

30 Para 5 minutos de tiempo de reacción el rango de concentraciones en el cual se puede utilizar el sensor es desde 100 $\mu\text{g/L}$ hasta 3000 $\mu\text{g/L}$. Para 45 minutos es desde 8,90 $\mu\text{g/L}$ hasta 500 $\mu\text{g/L}$; para 60 minutos desde 4,7 $\mu\text{g/L}$ hasta 200 $\mu\text{g/L}$ y para 90 minutos desde 2,5 $\mu\text{g/L}$ hasta 100 $\mu\text{g/L}$.

35 Teniendo en cuenta que el nivel máximo legal permitido de nitrito en agua potable es de 100 $\mu\text{g/L}$, se podría usar este sensor para control de calidad del aguas de abastecimiento previo al análisis oficial en laboratorio cualificado y con un tiempo de análisis no superior a 20 minutos.

40 Las características analíticas del procedimiento propuesto para un tiempo de contacto de 60 minutos son: sensibilidad: 0,0055 L/ μg ; límite de detección: 1,4 $\mu\text{g/L}$; reproducibilidad (como desviación estándar relativa de 10 medidas): 8,8 %.

45 La interferencia de otros analitos presentes, es pequeña debido a la alta selectividad de la reacción usada. Se ha medido el nivel de interferencia producida por diferentes especies habitualmente presentes en agua; encontrando que: Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Pb(II), Cd(II), Hg(II), Zn(II), Al(III) y Cr(III) se pueden encontrar en concentraciones de hasta 1 mg/L y Mg(II), Ca(II), Na(I), K(I), nitrato, sulfato, carbonato, fosfato y clorato en concentraciones de hasta 100 mg/L sin que se produzcan interferencias.

50 Unicamente interfieren sustancias con carácter oxidante (hipoclorito, dicromato, etc.) debido a la oxidación de las aminas presentes en el sensor. El estudio de la interferencia de hipoclorito, sustancia potencialmente presente en agua de abastecimiento, indica que a partir de una concentración de 0,1 mg/L ocurre una disminución de la señal analítica proporcional a la concentración de interferente. Esta situación se mantiene hasta una concentración de 4,0 mg/L de hipoclorito, a partir de la cual la amina presente en la zona sensora se oxida completamente dando un color parduzco, característico de las aminas oxidadas. En el caso de que exista hipoclorito por encima de 0,1 mg/L será necesario usar uno de procedimientos habituales para eliminarlo.

60

REIVINDICACIONES

1. Sensor de un solo uso para la detección y determinación de nitrito en aguas **caracterizado** por estar compuesto de un soporte sólido constituido por una lámina de material plástico transparente, incolora e inerte sobre la que se encuentra adherida una película sólida que constituye la zona sensora.

2. Sensor de un solo uso para la detección y determinación de nitrito en aguas según reivindicación primera **caracterizado** porque la zona sensora contiene los siguientes reactivos: sulfanilamida (entre un 7 y un 15 %), N-(1-naftil)etilendiamina (entre 0,5 y un 2,5 %) y Nafion[®] (entre 82,5 y 92,5 %).

3. Sensor de un solo uso para la detección y determinación de nitrito en aguas según reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque la fijación de la zona activa sobre la lámina soporte se realiza mediante evaporación de un volumen comprendido entre 15 y 35 μL de la disolución de los reactivos citados en la reivindicación 2.

4. Sensor de un solo uso para la detección y determinación de nitrito en aguas según reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque se produce un cambio de color de la zona activa del sensor de incoloro a violeta rojizo cuando la muestra a analizar se encuentra a un pH comprendido entre 2 y 2,5 y contiene iones nitrito en concentración adecuada.

5. Sensor de un solo uso para la detección y determinación de nitrito en aguas según reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque es capaz de detectar y medir concentraciones de nitrito comprendidas entre 2,5 $\mu\text{g/L}$ y 3000 $\mu\text{g/L}$ semicuantitativamente de forma visual con ayuda de una carta de colores.

6. Sensor de un solo uso para la detección y determinación de nitrito en aguas según reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado** porque es capaz de detectar y medir concentraciones de nitrito comprendidas entre 2,5 $\mu\text{g/L}$ y 3000 $\mu\text{g/L}$ cuantitativamente usando un fotómetro o un espectrofotómetro convencionales o de propósito específico.

7. Sensor de un solo uso para la detección y determinación de nitrito en aguas según reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado** porque mide las concentraciones de nitrito entre 2,5 $\mu\text{g/L}$ y 3000 $\mu\text{g/L}$ sin que produzcan interferencias las siguientes especies y concentraciones: Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Pb(II), Cd(II), Hg(II), Zn(II), Al(III) y Cr(III) en concentraciones de hasta 1 mg/L; Mg(II), Ca(II), Na(I), K(I), nitrato, sulfato, carbonato, fosfato y clorato en concentraciones de hasta 100 mg/L; e hipoclorito hasta concentraciones de 0,1 mg/L.

8. Sensor de un solo uso para la detección y determinación de nitrito en aguas según reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque dicho sensor se protege con una bolsa protectora que está construida con un material barrera multicapa sellada térmicamente.

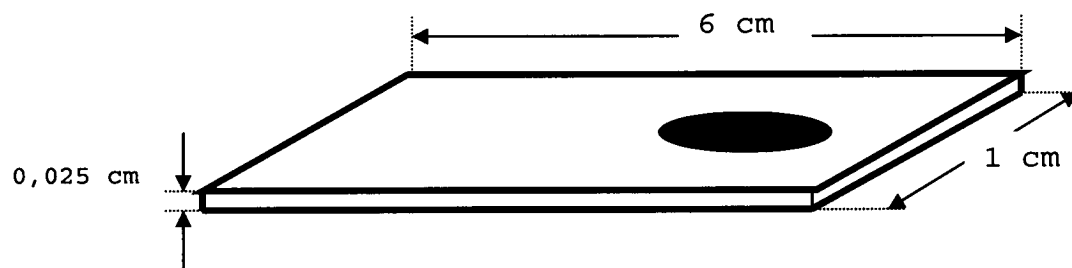


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 185 462

② Nº de solicitud: 200002623

③ Fecha de presentación de la solicitud: 31.10.2000

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: G01N 31/22, 33/18

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 160240 A2 (TERUMO CO.) 06.11.1985, páginas 5,6; página 8, líneas 29-33; reivindicaciones 8,9,10,12.	1-4
E	ES 2165265 A1 (UNIV. GRANADA) 01.03.2002, columna 5, líneas 5-10; reivindicación 7.	1,8
X	FR 2576418 A (AMBROISE-THOMAS) 25.07.1986, resumen; reivindicaciones 1,2.	1
X	WO 9417735 A (SIEWERT) 18.08.1994, resumen.	1
A	FR 2653888 A (WICOLOFF) 03.05.1991, todo el documento.	1-8

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

25.03.2003

Examinador

M. Ojanguren Fernández

Página

1/1