

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 259 541**

21 Número de solicitud: 200500199

51 Int. Cl.:

G01N 31/22 (2006.01)

G01N 33/18 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **24.01.2005**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2006**

Fecha de la concesión: **29.08.2007**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.2007**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es: **Universidad de Granada
Hospital Real, Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES**

72 Inventor/es: **Capitán Vallvey, Luis Fermín;
Fernández Ramos, María Dolores y
Arroyo Guerrero, Eduardo**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Elemento para la determinación de nitrato.**

57 Resumen:

Elemento para la determinación de nitrato en diversos problemas que no exige tratamiento de la muestra o bien que este es mínimo y permite una determinación simple y económica. El elemento se basa en el empleo de receptores sintéticos para nitrato y la señal óptica se consigue mediante el acoplamiento en la membrana sensora hidrófoba de un indicador ácido-base lipotilizado. La medida u observación del cambio de color de rojo a azul dependiendo de la cantidad de nitrato en el problema permite su determinación en un amplio rango de concentraciones con buena precisión y selectividad frente a aniones concomitantes con nitrato. El presente elemento analítico puede ser una alternativa con ventajas en cuanto a rapidez, precisión y costo sobre los métodos analíticos tradicionales y sobre las tiras reactivas comerciales de empleo habitual en análisis de aguas y agrícolas.

ES 2 259 541 B1

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

DESCRIPCIÓN

Elemento para la determinación de nitrato.

5 **Sector de la técnica**

Análisis químicos utilizando procedimientos rápidos.

Estado de la técnica

10 El ión nitrato es una forma oxidada del nitrógeno que se encuentra ampliamente diseminada en varios sistemas ambientales y fisiológicos siendo una especie química habitual en diversas industrias tanto en lo que se refiere a su fabricación como a su uso. Tiene una gran versatilidad química por lo que se emplea en multitud de procesos, muchos de los cuales están presentes en la vida diaria, y que van desde la fabricación de fuegos artificiales hasta la conservación de alimentos, así por ejemplo los aditivos alimentarios E-251 (nitrato sódico) y E-252 (nitrato potásico). Sin embargo y a pesar del gran número de productos en los que aparece esta especie, su mayor interés reside en los problemas medioambientales que su presencia origina. Así podemos citar la aparición de nitrato en la atmósfera a través de procesos de combustión industrial y doméstica, donde las especies gaseosas NOX se convierten fotoquímicamente en nitrato [R.P. Wayne, I. Barnes, P. Biggs, J.P. Burrows, C.E. Canosa-Mas, J. Hjorth, G. Le Bras, G.K. Moortgat, D. Perner, G. Poulet, G. Restelli y H. Sidebottom, Atmos. Environ., 1, 25A (1991)]. No obstante, la mayoría del nitrato procede de la agricultura, pues la alta solubilidad de los diferentes nitratos y su alta movilidad en el suelo hacen que por escorrentía superficial y subterránea puedan alcanzar los acuíferos.

25 El abuso de fertilizantes inorgánicos combinado con una mala gestión de los recursos naturales se ha señalado como la causa de modificaciones tanto locales como globales del ciclo del nitrógeno [United Nations Environment Programme (UNEP) Millennium, Report on the Environment, Global Environmental Outlook (1999)]. Entre las fuentes habituales de nitrato se encuentran: fertilizantes, depósitos naturales, tanques sépticos, aguas residuales, estiércol y desechos animales, aunque también puede producirse contaminación natural por nitratos, especialmente en zonas áridas. Las aguas superficiales no contaminadas no suelen superar los 5 mg/L de nitrato, pero las aguas subterráneas pueden presentar valores altos como consecuencia, principalmente, del abonado de tierras y la filtración de aguas residuales.

35 Se ha descrito que el nitrato puede originar diversos problemas sanitarios [C.S. Bruning-Fann y J.B. Kaneene, Vet. Human. Toxicol., 35, 521 (1993)] de entre los que destaca la metahemoglobinemia infantil, sobre todo en lactantes. Por otra parte, el ión nitrato, además del nitrito, da lugar a nitrosaminas al reaccionar con aminas secundarias de origen alimentario en las condiciones de acidez del estómago. Las nitrosaminas están implicadas en la aparición de cáncer gástrico [M. Espigares García y J.A. Pérez López, Aspectos sanitarios del estudio de las aguas, 1 ed.; Servicio de Publicaciones de la Universidad de Granada: 85], aunque no hay evidencias concluyentes que relacionen la ingestión de nitrato con la aparición de cáncer de estómago [C.S. Bruning-Fann y J.B. Kaneene, Vet. Human. Toxicol., 35, 521 (1993)].

45 En consecuencia, el análisis de nitrato en agua es necesario no solo por el carácter no deseable que presenta para algunas aplicaciones, sino porque el consumo de agua contaminada con ellos conlleva problemas para la salud.

50 Por todo ello, las normativas legales europeas y las correspondientes trasposiciones nacionales relativas a composición físico-química de aguas y niveles máximos permitidos de nitrato consideran a este como un componente no deseable con una concentración máxima tolerable de 50 mg/L. Igualmente se exige el cumplimiento de la siguiente condición referida a nitrato y nitrito (expresadas ambas concentraciones en mg/L): $[\text{NO}_3^-]/50 + [\text{NO}_2^-]/3 \leq 1$ [European Communities, Off.J.Eur.Comm., L330, 32 (1998)]; [European Communities, Off.J.Eur.Comm., L375, 1 (1991)]. En EE.UU. se regula en 10 mg/L, expresado como N, el máximo nivel de contaminación admisible [National Primary Drinking Water Regulations, 2004; <http://www.epa.gov/safewater/mcl.html>].

55 Aparte de esta determinación en aguas, es de interés el análisis de nitrato en suelo y en tejido vegetal P.M. Jemison, Jr. y R.H. Fox, Commun.Soil Sci.Plant Anal., 19, 1569 (1988)] o en savia para determinar necesidades de nitrógeno o programar tratamiento con fertilizantes P.D. Aylsworth, Vegetable Prod. Market. News, 6, 1 (1996)], así como en abonos, compost [E. Koch, Muell und Abfall, 21, 426 (1989)] y forrajes [A.V. Jain, P.F. Ross y M.P. Carlson, J.AOAC, 82, 9 (1999)] o en frutas [W.S. Kim, S.J. Chung, K.Y. Kim y T. DeJong, Small Fruits Rev., 2, 19 (2003)], zumos o alimentos [Al. Rychkov y A.V. Khodos, Pishchevaya Promyshlennost, 19 (1992)].

60 Para la determinación de nitrato se utilizan diversas técnicas analíticas. Los métodos espectroscópicos son los más utilizados por su sencillez de realización y los buenos límites de detección que presentan. De entre los que utilizan la espectrometría de absorción UV-Vis destaca el basado en la absorción intrínseca de nitrato en el UV, con sus conocidos problemas de interferencia de materia orgánica, y los de reducción de nitrato a nitrito y posterior determinación de este mediante alguna de las muchas variantes del ensayo de Griess que mide la absorción de los colorantes azoicos resultantes. Reducción que se puede llevar a cabo con una gran variedad de agentes reductores [M.J. Moorcroft, J. Davis y R.G. Compton, Talanta, 54, 785 (2001)]. La quimioluminiscencia en fase gas debida a NO₂ se ha incorporado a un sistema de inyección en flujo para la determinación de nitrato [T. Aoki, S. Fukuda, Y. Hosoi y H. Mukai, Anal.

Chim. Acta, 349, 11 (1997)]. Otras técnicas espectroscópicas utilizadas presentan menor interés, así MECA, FTIR y Raman o AAS [M.J. Moorcroft, J. Davis y R.G. Compton, Talanta, 54, 785 (2001)].

También se han empleado diferentes técnicas electroquímicas para la determinación de nitrato, siendo las más importantes las voltamétricas y las potenciométricas. Aunque es posible la reducción directa de nitrato, la cinética de transferencia de carga es lenta, por lo que los procedimientos voltamétricos directos muestran mala sensibilidad y precisión, además de la necesidad de tener que aplicar grandes valores de sobrepotencial, lo que afecta a la selectividad de la determinación. Para solucionar ese problema, se han diseñado diversas alternativas entre las que destacan: 1) empleo de electrodos con gran superficie mediante deposición electrolítica *in situ* o *ex situ* de metal (Cu o Cd); 2) incorporación de electrocatalizadores en el electrodo que reduzcan el sobrepotencial [C.M.N. Azevedo, K. Araki, L. Angnes y H.E. Toma, Electroanal., 10, 467 (1998)]; 3) reacción de nitrato y medida del reactivo utilizado o del producto generado; así tenemos reacciones de oxidación, por ejemplo de UO₂(II) [M. Noufi, C. Yarnitzky y M. Ariel, Anal.Chim.Acta, 234, 475 (1990)]; [H. Hemmi, K. Hasebe, K. Ohzeki y T. Kambara, Talanta, 31, 319 (1984)]; reacciones de reducción de nitrato catalizadas por enzimas [J.W. Aylott, D.J. Richardson y D.A. Russell, Analyst, 122, 77 (1997)]; o nitración de compuestos aromáticos y medida electroquímica [A.G. Fogg, S.P. Scullion y T.E. Edmonds, Analyst, 114, 579 (1989)]. Los métodos potenciométricos más usados son los electrodos selectivos de iones. Dentro de ellos, ofrecen buen resultado los basados en membranas de PVC que contienen sales lipofílicas que le confieren propiedades de cambio iónico [I. Isildak y A. Asan, Talanta, 48, 967 (1999)]. Otro grupo de procedimientos habituales para la determinación de nitrato son los cromatográficos y los de electroforesis capilar [M.J. Moorcroft, J. Davis y R.G. Compton, Talanta, 54, 785 (2001)].

Los procedimientos anteriores son una breve reseña de los que se emplean para la determinación de nitrato en el laboratorio, sin embargo en muchas ocasiones es necesaria esta determinación fuera del laboratorio bien por parte de personal técnico que precise de esa información *in situ*, así en una planta depuradora, en una balsa de agua, en pozos de riego, en abonos, suelos, savia u otras muchas situaciones o bien por parte del público en general que desee conocer el nivel de este ión en agua u otra muestra. En estas situaciones u otras que puedan imaginarse es útil disponer de un sistema de análisis rápido de nitrato.

Los métodos rápidos de análisis son métodos analíticos adaptados adecuadamente, tanto en reacciones como en procesos, y consisten en una reacción o un conjunto de reacciones químicas y en un sistema de evaluación bien ajustados entre sí. Con frecuencia estos métodos usan tanto efectos visuales fácilmente observables, como es la comparación con una carta de colores o la longitud de una zona de reacción; como propiedades mensurables, principalmente ópticas y eléctricas.

Los análisis mediante ensayos rápidos se pueden llevar a cabo tanto en disolución como 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; mientras que los sistemas en fase sólida más habituales son las tiras reactivas o sensores desechables, conocidas en inglés como *test strips* o *one-shot sensors*. El procedimiento descrito en esta patente pertenece a este último tipo. Se han propuesto diversos sensores desechables para la determinación de nitrato. De entre los sensores desechables electroquímicos podemos citar el sensor amperométrico basado en un *capillary-fill* device, tipo de sensor desechable patentado por la empresa Unilever y que consiste en una microcélula de capa fina con los electrodos de carbón y de Ag/AgCl serigrafiados en su interior y en la que la solución a analizar se introduce por capilaridad [B.J. Birch y I.W. Burns, Method and apparatus for electrochemical measurements, Patente no. EP 0255291 (1988)]; [B.J. Birch y I.W. Burns, Electrochemical measurements and methods, Patente no. WO 8804048 (1988)]. El dispositivo para nitrato se basa en la reducción de nitrato a -0,90 V sobre un electrodo de cobre preparado *in situ* previamente a partir de Cu(NO₃)₂ y KHSO₄ que se han depositado por serigrafiado [A.G. Fogg, S.P. Scullion, T.E. Edmonds y B.J. Birch, Analyst, 116, 573 (1991)].

Se han propuesto diversos sensores desechables potenciométricos. Un primer grupo son los que se basan en electrodos impresos sobre láminas plásticas usando tintas conductoras mediante la técnica de serigrafiado [R. Koncki, S. Glab, J. Dziwulska, I. Palchetti y M. Mascini, Anal. Chim. Acta, 385, 451 (1999)]; [G. Högg, G. Steiner y K. Cammann, Sensors Act.B, 19, 376 (1994)]. En el electrodo selectivo de iones se usa como elemento de reconocimiento una sal lipofílica, así el nitrato de tridodecilmetilamonio, que interacciona electrostáticamente con nitrato. Un segundo grupo de sensores potenciométricos desechables están contruidos sobre microchips de silicio [M. Knoll, K. Cammann, C. Dumschat, J. Eshold y C. Sundermeier, Sensors Act.B, 21, 71 (1994)].

Los sensores visuales para nitrato suelen basarse en la reducción a nitrito y posterior formación de azoderivados coloreados y en ellos todos los reactivos se encuentran incorporados en una tira reactiva por un procedimiento de inmersión [H. Lange, W. Rittersdorf, H.G. Rey, W. Werner y P. Rieckmann, Stable test strips having a water-soluble paper layer and methods for making same, Patente no. US 4,061,468 (1977)]; [V.M. Ostrovsckaya, Reactive indicating strip for determination of nitrate ions (RIP-Nitrate-Ttest), Patente no. RU 2009486 (1994)]; [C. Guonan, L. Haixia y X. Zenghong, Test paper for fast testing nitrite, azotate in vegetables and its testing method, Patente no. CN 1445531 (2003)]; [Boehringer Mannheim GmbH, Test Strips, Patente no. GB1463434 (1977)] o bien inmovilizados químicamente sobre soportes celulósicos [V.G. Amelin y I.S. Kolodkin, J. Anal. Chem., 56, 182 (2001)]. Mediante estas tiras se obtiene información semicuantitativa permitiendo clasificar el contenido en el analito en grupos preestablecidos de concentraciones. Las técnicas usadas para la estimación de concentraciones son: 1) por comparación con una carta de colores que contiene una serie de zonas coloreadas correspondientes a diferentes concentraciones de analito. En ellos el color de la tira reactiva se desarrolla al ponerla en contacto con el problema, generalmente por inmersión; 2)

por medida de la longitud de la zona coloreada de una tira reactiva sellada mediante una película polimérica excepto por la parte inferior con la que se pone en contacto con la disolución problema; 3) por medida del diámetro de la zona coloreada de forma elíptica de una tira reactiva sellada con una película polimérica que se pone en contacto con el problema mediante un orificio en el centro de la tira [V.G. Amelin y I.S. Kolodkin, J. Anal. Chem., 56, 182 (2001)].

Diversas empresas fabrican y comercializan tiras reactivas para nitrato, así tenemos Merck, Industrial Test Systems, Macherey-Nagel, Orion AQUAFast, Hach, Agri-Screen, CHEMetrics y EnviroEquip entre otras, las cuales se usan para diferentes aplicaciones, tales como nitrato en agua, suelos, savia, tejidos vegetales, forrajes, vinos, zumos de frutas y suero. Todas estas tiras reactivas se basan en la reducción de nitrato a nitrito mediante un reductor incorporado en la tira, así cinc en polvo es muy frecuente, y posterior formación de un azocolorante mediante alguna variante de la reacción de Griess.

Estas tiras reactivas se presentan en diversos formatos comerciales que van desde las de parámetro único para nitrato, a tiras con dos zonas reactivas consecutivas que responden a nitrito y nitrato, típicas para detectar la contaminación de aguas. Dichas zonas se diferencian en la presencia de reductor en la zona para detectar nitrato. Un tercer formato es el multianalito, que permiten determinar un conjunto de analitos para un propósito dado: como ejemplo podemos citar el *Eco-Check* de para nitrato, nitrito, pH, alcalinidad total y dureza total o el denominado *Complete* que determina cloro libre, cloro total, dureza total, pH, alcalinidad total, cobre, hierro, cloruro, sulfato, nitrato, nitrito, sulfuro de hidrógeno y bacterias, ambos comercializados por la empresa EnviroEquip Pty Ltd.

Los sensores desechables de tipo óptico se basan en el mismo tipo de reacciones anteriores (diazotación y acoplamiento) aunque midiendo alguna propiedad óptica que generalmente es la reflectancia difusa. La instrumentación utilizada puede ser de sobremesa [V.G. Amelin y I.S. Kolodkin, J. Anal. Chem., 56, 182 (2001)] o bien dedicada. Este es el caso del reflectómetro digital de bolsillo Nitrachek para la determinación de nitrato en agua, suelo o cosechas en un rango entre 5 y 500 mg/l y una exactitud en la lectura de 1 mg/l [Ijkelkamp, Soil Analysis, www.eijkelkamp.com, 2004] o el sistema Reflectoquant de Merck que permite determinar nitrato usando dos diferentes metodologías entre 3 y 90 mg/L ó entre 5 y 225 mg/L [Merck, Reflectoquant™ Liquid Analysis System, 2004].

El reconocimiento de aniones es un área de gran desarrollo en química supramolecular por el reto que supone comparada con el reconocimiento de cationes, considerando tamaño, forma, geometría, interacciones, dependencia del pH y efectos del disolvente; así como por su importancia en monitorización ambiental, diagnóstico en medicina y análisis biológico [P.D. Beer y P.A. Gale, Angew. Chem. Int. Ed., 40, 486 (2001)].

El nitrato es un anión de carácter tanto básico como coordinante débil; en consecuencia, el reconocimiento de nitrato requiere tanto complementariedad de tamaño como de forma en el receptor. Se han estudiado diferentes receptores sintéticos para el reconocimiento de nitrato, especialmente basados en enlace de hidrógeno. Destacan aquellos en los que los grupos enlazantes están organizados de forma convergente y rígida para ajustarse a la funcionalidad del nitrato usando receptores con simetría C_3 , tales como los receptores basados en amidas [A.P. Bisson, V.M. Lynch, M.K. Monahan y E.V. Anslyn, Angew. Chem. Int. Ed., 36, 2340 (1997)] o los basados tioureas [R. Herges, A. Dikmans, U. Jana, F. Köhler, P.G. Jones, I. Dix, T. Fricke y B. König, Eur. J. Org. Chem., 3004 (2002)]. En otros casos se ha usado para el reconocimiento de nitrato tanto grupos amidas donores de enlace de hidrógeno como contribuciones electrostáticas de un centro metálico [R.B. Chantelle, J.L. Stephen y A.G. Philip, Chem. Comm., 2001, 729 (2001)]; [S. Mason, T. Clifford, L. Seib, K. Kuczera y K. Bowman-James, J. Am. Chem. Soc., 120, 8899 (1998)]. La interacción electrostática se ha usado para el reconocimiento de nitrato utilizando sales de amonio cuaternario como receptores [G.J. Mohr, F. Lehmann, R. Östereich, I. Murkovic y O.S. Wolfbeis, Fresenius J. Anal. Chem., 357, 284 (1997)]; [P.C. Hauser y J.C. Litten, Anal. Chim. Acta, 294, 49 (1994)]; [R. Koncki, S. Glab, J. Dziwulska, I. Palchetti y M. Mascini, Anal. Chim. Acta, 385, 451 (1999)]; [G. Hogg, G. Steiner y K. Cammann, Sensors Act. B, 19, 376 (1994)] o complejos catiónicos [R. Lump, J. Reichert y H.J. Ache, Sensors Act. B, 7, 473 (1992)], aunque la selectividad en este caso esta determinada por la hidrofobicidad del anión de acuerdo con la serie de Hofmeister [F. Hofmeister, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 24, 247 (1888)], lo que origina una fuerte interferencia de aniones con energía de hidratación similar, así nitrato y cloruro. La coordinación con metales o ácidos Lewis es otro tipo de interacción no covalente usada para nitrato [K.C. Dillip, B. Kumar y F. Makoto, Chem. Comm., 2001, 1652 (2001)]; [R.-D. Schnebeck, E. Freisinger y B. Lippert, Angew. Chem. Int. Ed., 38, 168 (1999)].

El uso en análisis químico de estos receptores de nitrato es muy escaso y se puede citar el ensayo competitivo espectrofotométrico propuesto para nitrato y basado en el desplazamiento por nitrato de un colorante aniónico, como rojo de metilo o resorufina, complejado con el receptor [K. Niikura, A.P. Bisson y E. Anslyn, V. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1111 (1999)]; sin embargo, el uso de $CH_3OH/CHCl_2$ (1:1) como disolvente impide su empleo en muestras reales.

En cualquier aplicación de los anteriores receptores de nitrato se debe considerar el importante papel jugado por el disolvente para controlar la fuerza de enlace con el anión, así como la selectividad [A.C. Benniston, Cyclophanes: Endoacidic, Endobasic, and Endolipophilic Cavities, in Atwood, Jerry L. and Steed, Jonathan W. Encyclopedia of Supramolecular Chemistry, Bekker, 2004, p. 424]. Por ello, para cualquier aplicación en muestras reales, que generalmente son acuosas, se debe considerar que la competición entre el receptor, generalmente neutro, y los aniones solvatados en disolución homogénea puede dificultar o impedir la reacción. Por ello, el empleo de esquemas analíticos basados en membranas puede permitir la determinación de aniones en disolución acuosa. Aquí se utiliza una mem-

brana conteniendo el sistema sensor, el cual posee un receptor para el reconocimiento molecular y un vehículo para la producción de la señal analítica.

Explicación de la invención

5

Objeto de la invención

La invención pretende la puesta a punto de un elemento analítico de un solo uso para la determinación cuantitativa de nitrato en muestras acuosas de diverso tipo y a un procedimiento para la medida de la concentración de dicho analito en un medio acuoso, basado en la absorción de radiación de dicho elemento analítico tras el contacto con la disolución problema. Objetivos primordiales de esta invención han sido diseñar un elemento analítico que contenga los reactivos necesarios y presente las características de alta selectividad frente a aniones concomitantes, amplio intervalo de respuesta, larga vida y bajo precio. Los problemas que pretende resolver son: 1) no precisar la reducción a nitrito ni la formación de colorantes, pues además de la toxicidad asociada a dichos nitritos, los reactivos presentes en las tiras reactivas comercializadas incluyen aminos que presentan carácter tóxico; 2) Ampliar el rango dinámico que habitualmente presentan las tiras reactivas para nitrato; 3) Poder determinar la concentración en nitratos con facilidad, pues las mayoría de las tiras comerciales solo ofrecen información semicuantitativa; 4) Presentar carácter reversible por la posibilidad de reutilización que supone así como por la ventaja que supone en cuanto a reducción de errores.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está relacionada con un método tipo tira reactiva o sensor de un solo uso para la determinación cuantitativa de nitrato en disolución acuosa basado en reconocimiento molecular mediante un receptor y en la generación consecuente de una señal óptica. Este sensor puede adoptar diversas configuraciones para situar la zona sensora sobre un soporte que permita su manipulación.

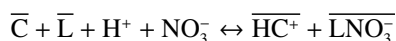
El mecanismo de respuesta de la zona sensora se basa en el empleo de ionóforos o receptores para el reconocimiento de nitrato. Estos ionóforos son moléculas orgánicas no coloreadas de carácter lipofílico que son capaces de formar complejos con diversas especies tanto cargadas como neutras y transportarlas a través de membranas. Para lograr una respuesta de tipo óptico con este ionóforo se ha usado un mecanismo de coextracción a través del acoplamiento de una segunda reacción que actúa como reacción indicadora.

La membrana sensora está compuesta por cloruro de polivinilo y un plastificante que actúa como disolvente permitiendo la movilidad de las especies en la membrana. Dicha membrana contiene además un ionóforo y un cromoióforo, que es un indicador ácido-base lipofilizado. El nitrato presente en una disolución acuosa será extraído a la membrana solamente si simultáneamente se extrae un catión de forma que se mantenga la electroneutralidad de dicha membrana. Ese catión será el hidrogenoión que será reconocido por el cromoióforo con lo que cambiará el color del indicador por protonación.

De los diferentes ionóforos para nitrato descritos se prefiere el ciclofano bicíclico rígido propuesto por el grupo de Anslyn [A.C. Benniston, Cyclophanes: Endoacidic, Endobasic, and Endolipophilic Cavities, in Atwood, Jerry L. and Steed, Jonathan W. Encyclopedia of Supramolecular Chemistry, Bekker, 2004, p. 424] como receptor de nitratos y que se obtiene por condensación entre 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno con tres equivalentes de 2,6-piridinadicarbonil bicloruro. El producto originado, el 2,16,18,32,45,47-hexaetil-5,13,21,29,34,42,44,46,48-nonaazaheptaciclo 15.15.11.1^{3,31}.1^{7,11}.1^{15,19}.1^{23,27}.1^{36,40}]-octatetraconta- 1,3(45),7(48),8,10,15(47),16,18, 23 (46),26,31,36, 37,39-pentadecaeno- 6,12,22,28,35,41-hexona (HNOPH), es un anfitrión con simetría C₃ que presenta seis grupos amida convergentes en el centro de la cavidad enlazante [K. Niikura, A.P. Bisson y E. Anslyn, V. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1111 (1999)]. La organización trigonal prismática de este receptor es capaz de coordinar con el sistema de electrones n del nitrato dentro de la cavidad de la caja formando un complejo de estequiometría 1:1 [A.P. Bisson, V.M. Lynch, M.K. Monahan y E.V. Anslyn, Angew. Chem. Int. Ed., 36, 2340 (1997)].

El proceso que tiene lugar es el siguiente, suponiendo que la estequiometría del producto de reacción del ionóforo con el nitrato es 1:1 y que el cromoióforo acepta un solo protón:

55



En esa ecuación L es el ionóforo y C el cromoióforo en su forma básica, que es neutra, antes de estar en contacto con la disolución que contiene los iones nitrato y protones. Se puede demostrar que la constante que rige ese equilibrio K_{e1} depende de la concentración analítica de ionóforo C_L y de cromoióforo C_C, del grado de desprotonación del cromoióforo α y de las actividades en nitrato a_{NO₃⁻} y en protones a_{H⁺} de la disolución, a través de la expresión:

65

$$K_{e1} = \frac{(1 - \alpha)^2}{\alpha \cdot \left(\frac{C_L}{C_C} - (1 - \alpha) \right) \cdot a_{NO_3^-} \cdot a_{H^+}}$$

ES 2 259 541 B1

El grado de desprotonación del cromoióforo α se determina experimentalmente mediante la medida de la señal óptica, característica de la forma ácida del indicador, originada por el elemento analítico, como podría ser la absorbancia o la reflectancia difusa a una longitud de onda dada o bien fluorescencia o fosforescencia. Para ello, se emplea la ecuación:

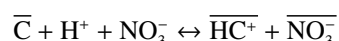
$$\alpha = \frac{A - A_{\text{HC}^+}}{A_{\text{C}} - A_{\text{HC}^+}}$$

donde A es la absorbancia del elemento equilibrado con la disolución problema, A_{HC^+} es la absorbancia de la forma protonada del cromoióforo y A_{C} la absorbancia de la forma desprotonada. Estos dos últimos valores de absorbancia, absorbancia máxima y mínima a esa longitud de onda, se obtienen previa equilibración del elemento analítico con disoluciones reguladora de pH e hidróxido sódico, respectivamente. En consecuencia, el grado de desprotonación es una señal analítica normalizada, así una absorbancia.

Manteniendo el pH constante, el color que muestra el elemento analítico y, por tanto, la absorción de radiación a una longitud de onda dada, depende exclusivamente de la concentración de nitrato presente. Dependencia que es de tipo sigmoideal si se usa en forma logarítmica, tal como muestra la ecuación siguiente:

$$\log a_{\text{NO}_3^-} = \log \frac{(1 - \alpha)^2}{\alpha \cdot \left(\frac{C_L}{C_C} - (1 - \alpha) \right) \cdot a_{\text{H}^+} \cdot K_{e1}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Junto con la anterior reacción de complejación y extracción de nitrato por el ionóforo coexiste otra, que se observa experimentalmente, según la cual el nitrato se extrae directamente junto con un protón para formar un par iónico con el cromoióforo protonado sin necesidad de formar complejo con el ionóforo. La extracción en este caso se basa en el carácter lipofílico del anión nitrato y cumple la secuencia de selectividad de Hofmeister.



Esta reacción cumplirá la expresión siguiente considerando que viene caracterizada por la constante K_{e2} :

$$K_{e2} = \frac{1 - \alpha}{\alpha \cdot a_{\text{H}^+} \cdot a_{\text{NO}_3^-}} \quad (\text{Ec. 2})$$

De entre diversos ionóforos para aniones se prefiere para nitrato el ciclofano bicíclico con simetría C_3 denominado 2,16,18,32,45,47-hexaetil- 5,13,21,29,34,42,44,46,48-nonaazaheptaciclo[15.15.11.1^{3,31}.1^{7,11}.1^{15,19}. 1^{23,27}.1^{36,40}]-octate-traenta-1,3(45),7(48),8, 10,15(47),16,18,23(46),26,31,36,37,39- pentadecaeno-6,12,22,28,35,41-hexona, denotado en adelante con el acrónimo HNOPH. Como cromoióforo se pueden utilizar diferentes indicadores ácido-base lipofílicos, como por ejemplo el N,N-dietil-5-(octadecanoilimino)-5H-benzo[ajfenoxazina-9-amina. Se pueden usar plastificantes de diversos grupos como pueden ser ésteres fosfato, ésteres de ácidos carboxílicos y éteres, prefiriéndose los ésteres fosfato por su menor tiempo de respuesta, así tributilfosfato.

La respuesta del elemento analítico en términos de extensión de la respuesta, tiempo de respuesta y selectividad depende de la composición de la membrana sensora y de las condiciones de reacción.

El pH de la disolución reguladora en la que se produce la reacción es el factor de mayor importancia para determinar la extensión de la respuesta y su selectividad frente a otros iones presentes. Tal como indica el modelo de coextracción indicado, la respuesta del sensor de un solo uso depende de la actividad protónica. Un incremento en dicha actividad desplaza la respuesta hacia menores actividades de nitrato, como indica la Figura 1A, a la vez que también incrementa la coextracción de nitrato en membranas que no contienen ionóforo (Figura 1B), lo cual se explica por los modelos teóricos arriba indicados. Para valores de pH mayores de 6 el sistema sensor presenta suficiente sensibilidad como para determinar nitrato en muestras acuosas a la vez que minimiza la coextracción de nitrato en ausencia de ionóforo. Así, no se observa respuesta para concentraciones de nitrato inferiores a 10⁻² M en estas membranas sin ionóforo, lo cual está de acuerdo con los valores de las constantes de coextracción encontradas experimentalmente: K_{e1} : 9,06±0,04 y K_{e2} : 6,90±0,08. Por otra parte, la pendiente de las funciones respuesta de los sensores desechables conteniendo ionóforo es la mitad que la de aquellos que no lo contienen, lo que permitirá desplazar el rango dinámico hacia menores concentraciones de nitrato cuando se emplee ionóforo. Por otra parte, para valores de pH mayores de 7 la respuesta a nitrato decrece debido a la baja concentración protónica presente, la cual es necesaria para que se dé la coextracción.

La selectividad, expresada como coeficiente de selectividad $K_{\text{NO}_3^-,j}^{\text{opt}}$, definido como el cociente de las respectivas constantes de extracción para ión analito y ión interferente, depende de la presencia de ionóforo en el elemento ana-

ES 2 259 541 B1

lítico, de la proporción de ionóforo y del pH de la disolución reguladora. En ausencia de ionóforo en la membrana sensora la secuencia de selectividad observada es: $\text{ClO}_4^- > \text{SCN}^- > 1 > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{HCO}_3^- > \text{NO}_2^- \cong \text{Cl}^- \cong \text{SO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^-$ que coincide con la secuencia de selectividad de Hoffmaister-, salvo un cambio en el orden habitual: $\text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{CH}_3\text{COO}^-$. En presencia del ionóforo en la membrana sensora la selectividad para nitrato aumenta, siendo la secuencia observada: $\text{SCN}^- \cong \text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{NO}_2^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- \gg \text{HCO}_3^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{SO}_4^{2-}$, lo cual es debido a la interacción selectiva entre el ciclofano y el nitrato, lo cual es consistente con lo reportado en bibliografía previa. Un ejemplo de coeficientes de selectividad encontrados se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1

Coefficientes de selectividad $K_{\text{NO}_3^-j}^{\text{opt}}$ para diferentes aniones

Anión	$\log K_{\text{NO}_3^-j}^{\text{opt}}$	
	Membrana con ionóforo	Membrana sin ionóforo
SCN^-	$0,5 \pm 0,17$	$1,4 \pm 0,14$
ClO_4^-	$0,4 \pm 0,13$	$2,04 \pm 0,02$
NO_3^-	0	0
I^-	$-0,98 \pm 0,01$	$0,79 \pm 0,03$
NO_2^-	$-1,4 \pm 0,13$	$-2,0 \pm 0,13$
Br^-	$-2,9 \pm 0,18$	$-0,97 \pm 0,06$
Cl^-	$-3,8 \pm 0,17$	$-1,97 \pm 0,01$
HCO_3^-	$-4,7 \pm 0,12$	$-1,25 \pm 0,02$
CH_3COO^-	$-6,0 \pm 0,15$	$-4,4 \pm 0,11$
SO_4^{2-}	$-9,1 \pm 0,13$	$-1,99 \pm 0,02$

La cantidad de ionóforo presente en membrana tiene efecto sobre la respuesta de la misma. En la Figura 2 se observa como varía la respuesta con la relación molar ionóforo/cromoionóforo (C_L/C_C). Como predice el modelo de coextracción (Ec. 1) un aumento en dicha relación origina un desplazamiento de la función respuesta a la izquierda, así como un incremento de la pendiente. Adicionalmente, los coeficientes de selectividad aumentan ligeramente con el incremento de la relación molar C_L/C_C , sin embargo, se prefiere usar relaciones molares 1:1 pues aunque reducen ligeramente la selectividad, esta reducción afecta principalmente a aniones no habituales en aguas naturales, como es el caso del perclorato. Otra ventaja de la relación 1:1 es la menor pendiente de la función respuesta originada, lo que permite un mayor rango dinámico para nitrato.

El plastificante empleado para la fabricación de la membrana junto con el material de membrana, que puede ser el cloruro de polivinilo, influye de forma considerable en la respuesta a nitrato, así como la velocidad de reacción y la reversibilidad de acuerdo con el orden: ésteres fosfato > éteres > ésteres carboxílicos. La secuencia de respuesta observada para plastificantes ensayados es: tributilfosfato > tris(2-etilhexil)-fosfato >> nitrofenil octilfenil éter >> bis(2-ethylhexil) sebacato > dioctilftalato, por lo que se prefiere tributilfosfato. El porcentaje de plastificante tiene escasa influencia sobre la selectividad de la respuesta hacia aniones, aunque sí influye en la velocidad de respuesta de nitrato. Se observa que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de elementos analíticos con una disolución de nitrato 10^{-4} M, varía de la forma: 12 min. para membranas conteniendo un 50% de tributilfosfato; 7 min. para un 60%, 5 min. para un 65%, 6,5 para un 70% y 7 min. para un 80%. Adicionalmente, se encuentra que para cantidades mayores del 70% las propiedades físicas empeoran debido a que la membrana se hace menos homogénea y el tiempo de secado aumenta, por lo que se prefiere usar un 65% de tributilfosfato.

60 Ejemplo

Preparación de elementos analíticos transparentes para la determinación de nitrato

65 El sistema analítico descrito más arriba se puede llevar a la práctica de diversas formas conocidas en la bibliografía relacionada con este tema. Así es posible usar procesos de impregnación de un soporte adsorbente, como son los sistemas de fibra impregnada; o bien depositar una disolución de los reactivos sobre un soporte no adsorbente o, alternativamente, fabricar una película depositando un material formador de película junto con los reactivos necesarios

ES 2 259 541 B1

sobre un soporte plástico, lo que se puede lograr mediante técnicas de inmersión, pintado o rociado, entre otras. Alternativamente, se podría depositar como una capa de un elemento multicapa. Como ejemplo de las diversas formas que puede adoptar el elemento analítico de esta invención se muestra su preparación y caracterización sobre un soporte transparente de forma que la señal analítica se obtenga mediante espectrofotometría visible bien usando un instrumento de sobremesa convencional o un instrumento dedicado tipo fotómetro portátil a baterías.

De forma alternativa, se han preparado elementos analíticos usando tanto material celulósico como tejidos sintéticos mediante un sistema de doble impregnación, que permite depositar la disolución reguladora por una parte y el resto de reactivos y materiales de membrana por otra. Sistema que presenta la ventaja de no necesitar disponer de disolución reguladora externa, así como de reducir considerablemente el tiempo de reacción necesario (a menos de 1 min.). Aquí se describe más ampliamente otro tipo de realización de la invención, la preparación de membranas transparentes.

En concreto, una realización para la preparación del elemento para nitrato que consiste en la deposición sobre una lámina de poliéster, cuyas dimensiones pueden ser 40 mm de largo por 14 mm de ancho y 0,5 mm de espesor, de una película compuesta por distintas sustancias químicas en cantidades comprendidas en los intervalos siguientes: 27-36 μg de cloruro de polivinilo, 54-64 μg tributilfosfato, 16-89 μg de HNOPH y 10-20 μg de N,N-dietil-5-(octadecanoilimino)-5H-benzo[a]fenoxazina-9-amina. Para ello, se depositan volúmenes comprendidos entre 10-20 μl de una disolución en tetrahidrofurano recién destilado, de los anteriores productos químicos, sobre una lámina de material plástico transparente, como puede ser poliéster, que se encuentra girando a unos 120 r.p.m. en un sistema rotatorio preparado al efecto. El secado a continuación durante 24 horas en atmósfera saturada de tetrahidrofurano permite obtener elementos analíticos sensibles a nitrato con una zona activa transparente y de color rojo.

El procedimiento preferido para utilizar el elemento analítico para nitrato es el siguiente: en un tubo de vidrio o material plástico se introducen 8 ml de disolución patrón o de problema conteniendo nitrato junto con 2 ml de disolución reguladora dihidrógeno fosfato sódico/monohidrógeno fosfato sódico 1M de pH 6,0, tras lo cual se introduce el elemento analítico y se mantiene allí durante 5 minutos sin agitación. Transcurrido ese tiempo, se saca el elemento de la disolución eliminando las posibles gotas de disolución y mide la absorbancia en las proximidades de 660 nm con ayuda de un fotómetro, un espectrofotómetro o un instrumento portátil diseñado a tal efecto.

Utilizando los sensores desechables de la presente invención se encuentra que hay respuesta a nitrato para concentraciones que varían entre 0,5 M y 10^{-6} M ($2,59 \times 10^{-1}$ M y $8,37 \times 10^{-7}$ M en actividades). La Figura 3 muestra un ejemplo de función respuesta ajustándose la respuesta experimental con una curva teórica de tipo sigmoideal calculada usando la Ec. 1 suponiendo que la estequiometría del complejo es 1:1 de acuerdo con la bibliografía antes reseñada.

El rango de medida de este sensor desechable se define para esta aplicación mediante la relación lineal existente en la zona central de la curva sigmoideal, definida mediante un test estadístico de fallo de ajuste. Como límite de detección se usa la intersección de la anterior función lineal obtenida con la función lineal establecida en la zona de mínima pendiente y menor concentración.

Las especificaciones conseguidas para esta realización en particular son:

Rango de medida de nitrato: 1,63 a 3886 mg/L (0,022 a 45,15 mM en actividades ó entre 0,026 y 62,68 mM en concentraciones).

Límite de detección: 1,63 mg/L (0,022 mM en actividades ó 0,026 mM en concentraciones).

Precisión usando el mismo elemento (desviación estándar relativa) 1,68; 1,39; 2,77% como $\log a_{\text{NO}_3^-}$ para las concentraciones de nitrato: $1,0 \times 10^{-4}$, $2,5 \times 10^{-3}$ y $1,0 \times 10^{-2}$ M, respectivamente.

Precisión usando diferentes elementos (desviación estándar relativa) 0,79; 3,68; 6,25% como $\log a_{\text{NO}_3^-}$ para las mismas concentraciones anteriores.

Tiempo de respuesta: 5 minutos

Coste estimado: 0,04 €/elemento (considerando solo materiales)

Reutilización (usando el mismo elemento): 3 semanas

Tiempo de vida: 6 semanas

Ejemplo

Determinación de nitrato en agua mediante el elemento analítico preparado en el ejemplo anterior

Como un ejemplo que demuestra la utilidad de la invención descrita se recoge su aplicación a determinación de nitrato en diversos tipos de aguas. Los valores de $K_{\text{NO}_3^-}^{\text{opt}}$ antes obtenidos mediante membranas que tienen una composición adecuada, indican que el elemento analítico aquí descrito es del orden de 6.310 veces más selectivo para

ES 2 259 541 B1

nitrito que para cloruro, 50.120 veces más que para hidrógenocarbonato y 1.258.400 más que para sulfato, por solo indicar los aniones mayoritarios en aguas naturales. Aunque el concepto de coeficiente de selectividad requerido no es de aplicación en este caso, pues se trata más de una especie contaminante que natural y su concentración puede variar entre unos márgenes extraordinariamente amplios; se puede utilizar para casos concretos, así, y a título de ejemplo, se ha aplicado al caso de la determinación de nitrito en aguas subterráneas de la vega de Granada. Considerando los valores máximos y mínimos de los aniones habituales en ellas y un error del 5% en la determinación, los valores de los coeficientes de selectividad requeridos son: $K_{NO_3,j}^{opt}$ req.: -3.5 (Cl^-); -3.4 (SO_4^{2-}); -3.7 (HCO_3^-). Comparando con los valores de la Tabla 1, se comprueba que son inferiores a los obtenidos para este elemento analítico para los aniones mayoritarios, por lo que sería aplicable para las aguas citadas.

Para comprobar la utilidad del elemento analítico para nitratos se aplica a la determinación de aguas de diferente tipo (manantial, mineral, grifo) y con diferente contenido en nitrito. Los resultados obtenidos se validaron por comparación con un método voltamperométrico para nitrito usado como referencia, encontrando que estadísticamente no difieren (Tabla 2).

Las características analíticas del elemento descrito para nitrito presentan ventajas sobre los sensores desechables tanto electroquímicos como ópticos recogidos en el estado de la técnica, en lo que se refiere a rango, límite de detección y simplicidad de uso. Así el dispositivo amperométrico tipo *capillary-fill device* opera entre 10^{-3} y 10^{-5} M en nitrito [B.J. Birch y I.W. Burns, Electrochemical measurements and methods, Patente no. WO 8804048 (1988)] y los sensores desechables potenciométricos entre 10^{-2} y 2.5×10^{-5} M [G. Högg, G. Steiner y K. Cammann, Sensors Act. B, 19, 376 (1994)], 10^{-2} y 10^{-5} M [R. Koncki, S. Glab, J. Dziwulska, I. Palchetti y M. Mascini, Anal. Chim. Acta, 385, 451 (1999)] y 10^{-2} y 2.6×10^{-4} M [M. Knoll, K. Cammann, C. Dumschat, J. Eshold y C. Sundermeier, Sensors Act. B, 21, 71 (1994)]; en el caso de los sensores ópticos desechables comercializados, los rangos de respuesta son: 4.8×10^{-5} a 3.6×10^{-3} M (Reflectoquant [Merck, Reflectoquant™ Liquid Analysis System, 2004]) y 8.1×10^{-5} a 8.1×10^{-3} M (Nitratechek [Ijkelkamp, Soil Analysis, www.eijkelkamp.com, 2004]).

TABLA 2

Aplicación del elemento analítico propuesto a la determinación de nitrito en aguas

Origen	Método propuesto (mg/L)	s	Método de referencia (mg/L)	s	Pval (%)
Río Monachil (Monachil, Granada, España)	3,6	0,24	3,3	0,45	29,27
Río Genil (Granada, España)	3,1	0,25	2,8	0,24	31,6
Manantial 1 (Granada, España)	27,3	0,63	29	2,0	20,4
Manantial 2 (Granada, España)	4,1	0,33	4,37	0,02	21,1
Manantial 3 (Haza Grande, Granada, España)	54	2,24	54	4,1	90,6
Manantial 4 (Zujaira, Granada, España)	62	2,78	61	3,57	59,9
Manantial 5 (La Peza, Granada, España)	2,92	1,49	2,7	17,26	39,0
Pozo 1 (Illora, Granada, España)	20,4	0,29	23	1,71	14,3
Pozo 2 (Valderrubio, Granada, España)	201	33,50	200	12,1	96,1
Aljibe (Illora, Granada, España)	104	15,78	87,9	0,94	88,1

Tres réplicas en cada caso

ES 2 259 541 B1

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto del pH sobre la respuesta del elemento analítico (α) de la invención a los siguientes valores: a: pH = 4,0; b: pH = 5,0; c: pH = 6,0; d: pH = 7,0; e: pH = 8,0; f: pH = 9,0. La figura rotulada con A representa el efecto del pH cuando el elemento analítico contiene ionóforo y la figura B en su ausencia.

La Figura 2 señala como varia la respuesta del elemento analítico (α) cuando se modifica la relación molar ionóforo/cromoionóforo usada en su preparación. La curva rotulada con a indica la relación 1:1, con b 2:1 y con c 3:1.

La Figura 3 muestra un ejemplo de función respuesta del elemento analítico (α) a nitrato y de su ajuste a la curva teórica, suponiendo una estequiometría 1:1 para el complejo formado.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 259 541 B1

REIVINDICACIONES

5 1. Elemento analítico para la determinación de nitrato en diferentes matrices de tipo acuoso, basado en la absorción de radiación del mismo debido al cambio de color que experimenta y **caracterizado** por estar compuesto por una membrana hidrófoba depositada sobre un soporte, la cual contiene el material de membrana plastificado, un ionóforo y un cromoióforo.

10 2. El elemento analítico de la reivindicación anterior donde el plastificante usado es tributilfosfato.

10 3. El elemento analítico de la reivindicaciones 1 ó 2, donde el ionóforo es 2,16,18,32,45,47-hexaetil-5,13,21,29,34,42,44,46,48-nonaazaheptaciclo [15.15.11.1^{3,31}.1^{7,11}.1^{15,19}.1^{23,27}.1^{36,40}]-octatetraconta-1,3(45),7(48),8,10,15(47),16,18,23(46)26,31,36,37,39-pentadecaeno-6,12,22,28,35,41-hexona.

15 4. El elemento analítico de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, donde el cromoióforo es N,N-dietil-5-(octadecanoilimino)-5H-benzo[a]fenoxazina-9-amina.

20 5. El elemento analítico de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** por poseer una película sensora situada sobre un soporte inerte conteniendo entre 27 y 36 μg de cloruro de polivinilo, entre 54 y 64 μg tributilfosfato, entre 16 y 89 μg de 2,16,18,32,45,47-hexaetil-5,13,21,29,34,42,44,46,48-nonaazaheptaciclo [15.15.11.1^{3,31}.1^{7,11}.1^{15,19}.1^{23,27}.1^{36,40}]-octatetraconta-1,3(45),7(48),8,10,15(47), 16,18,23(46),26,31,36,37,39-pentadecaeno-6,12,22,28,35,41-hexona y entre 10 y 20 μg de N,N-dietil-5-(octadecanoilimino)-5H-benzo[a]fenoxazina-9-amina.

25 6. Método de preparación de los elementos descritos en las reivindicaciones anteriores, donde la película sensora se ha depositado sobre un soporte inerte, en volúmenes comprendidos entre 5 y 15 μl de una disolución en tetrahidrofurano recién destilado de los compuestos químicos: cloruro de polivinilo, tributilfosfato, 2,16,18, 32,45,47-hexaetil-5,13,21,29,34,42,44,46,48-nonaazaheptaciclo [15.15.11.1^{3,31}.1^{7,11}.1^{15,19}.1^{23,27}.136,40]-octatetraconta-1,3(45),7(48),8,10,15(47),16,18,23(46),26,31,36,37,39-pentadecaeno-6,12,22,28,35, 41-hexona y N,N-dietil-5-(octadecanoilimino)-5H-benzo[a]fenoxazina-9-amina, con posterior secado en atmósfera saturada de tetrahidrofurano, durante al menos 24 horas.

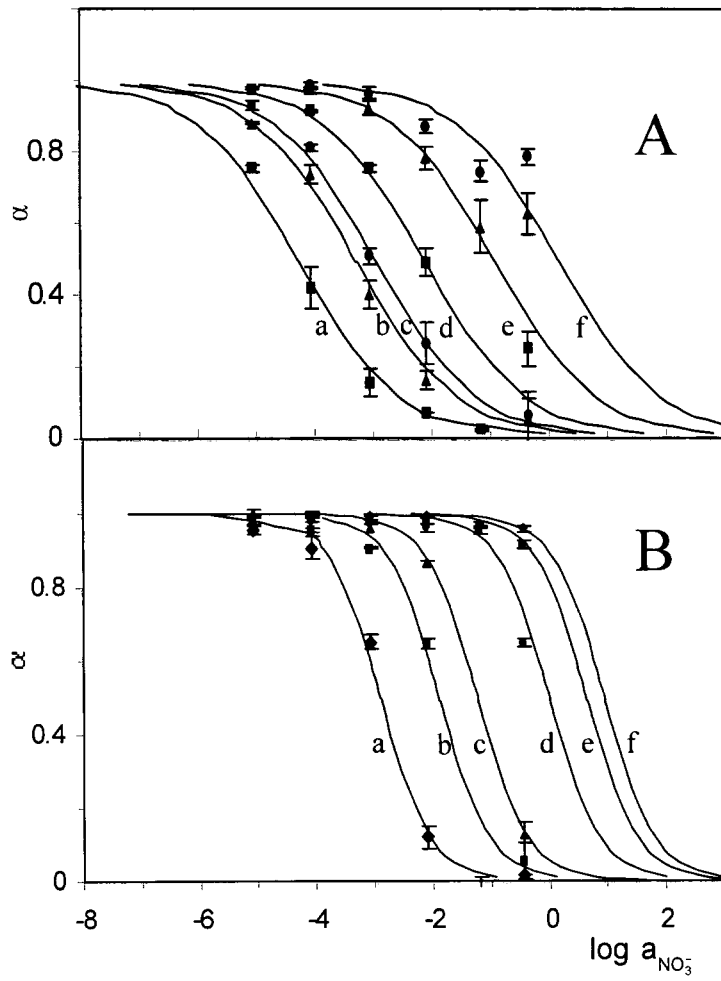


Figura 1

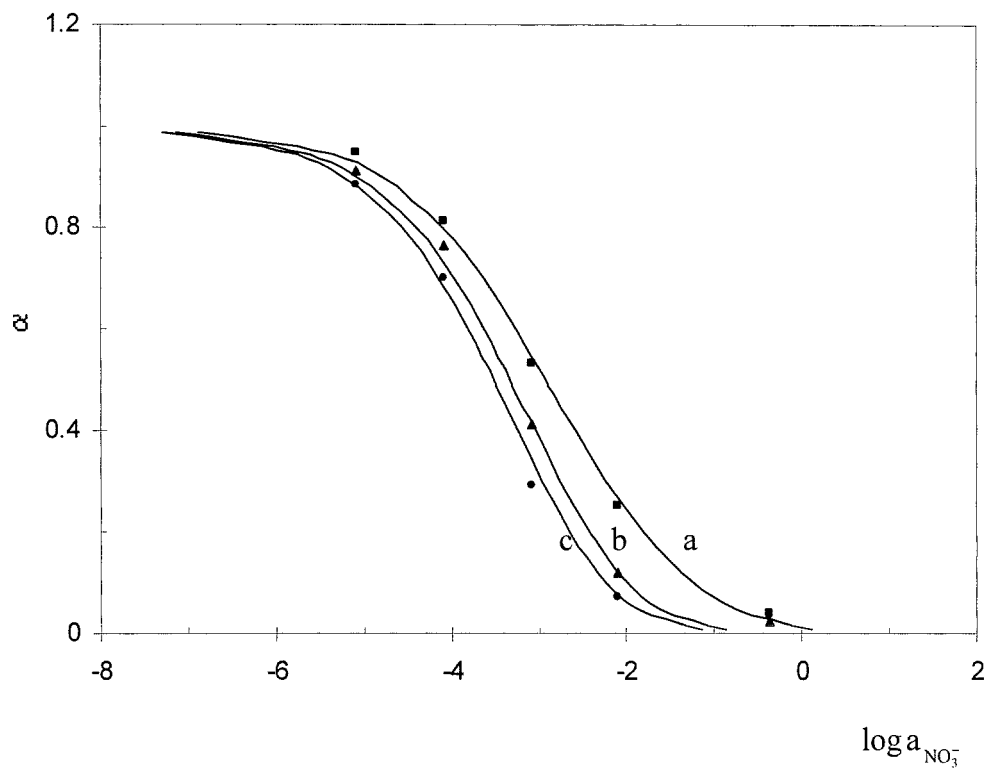


Figura 2

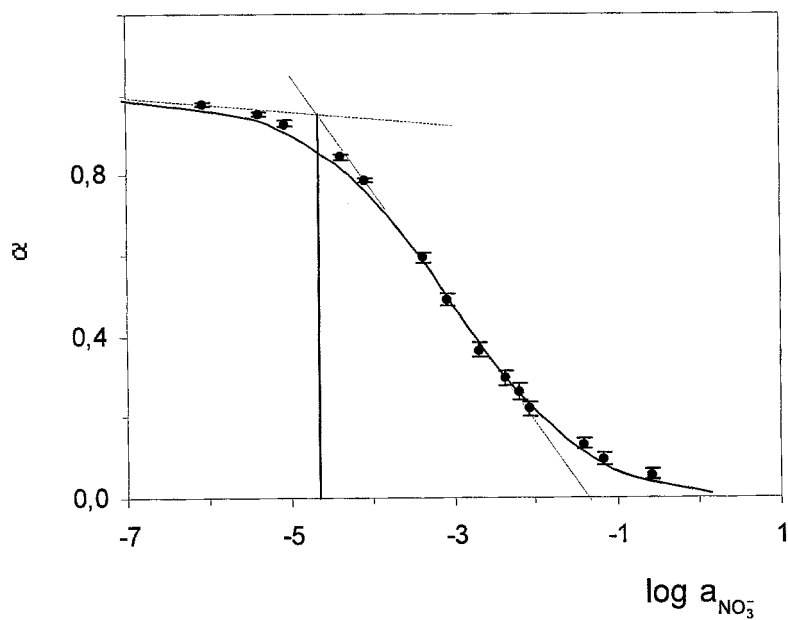


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 259 541

② Nº de solicitud: 200500199

③ Fecha de presentación de la solicitud: **24.01.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 31/22** (2006.01)
G01N 33/18 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MOHR, G.J. et al. "Effects of the polymer matrix on an optical nitrate sensor based on a polarity-sensitive dye" <i>Sensors and Actuators B</i> . Noviembre 1996. Vol. 37, páginas 103-109, todo el documento.	1
X	BADR, I.H.A. "Nitrite-Selective Optical Sensors Based on Organopalladium Ionophores." <i>ANALYTICAL LETTERS</i> . 2001. Vol. 34, Nº 12, páginas 2019-2034, todo el documento.	1
X	WO 9417388 A1 (FCI-FIBERCHEM, INC.) 04.08.1994, página 4, línea 20 - página 5, línea 7; página 14, líneas 3-18; página 19, líneas 15-20.	1
A	CAPITAN-VALLVEY, L.F et al. "Irreversible optical test strip for mercury determination based on neutral ionophore." <i>analytical Chimica Acta</i> . 25.10.2004. Vol. 254, páginas 365-372.	1-4

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

06.09.2006

Examinador

V. Balmaseda Valencia

Página

1/1