



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 337 328**

⑫ Número de solicitud: 200802211

⑬ Int. Cl.:
G01N 27/327 (2006.01)
G01N 27/49 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **24.07.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **22.04.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
22.04.2010

⑰ Solicitante/s: **INBEA BIOSENSORES, S.L.**
c/ Santiago Grisolia, 2
28760 Tres Cantos, Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Reviejo García, Ángel Julio;**
Pingarrón Carrazón, José Manuel;
Campuzano Ruiz, Susana;
Gamella Carballo, María;
Vicente García-Echave, Valentín;
Manso Lorenzo, Javier;
Vázquez de Prada, Ana;
Ferrero Martín, Francisco Javier;
Campo Rodríguez, Juan y
Valledor Llopis, Marta

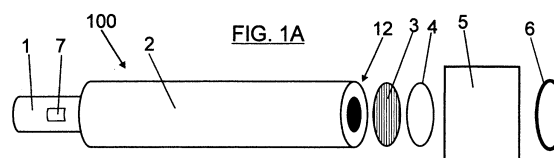
⑳ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

② Título: **Biosensor amperométrico desechable, método de fabricación del mismo y método de determinación de la presencia de analitos en alimentos.**

③ Resumen:

Biosensor amperométrico desechable, método de fabricación del mismo y método de determinación de la presencia de analitos en alimentos.

Biosensor amperométrico desechable (100), método de fabricación del mismo y método de determinación de la presencia de analitos en alimentos, que comprende, básicamente el uso de una fina capa de oro (3) depositada por sputtering en un electrodo.



ES 2 337 328 A1

DESCRIPCIÓN

Biosensor amperométrico desechable, método de fabricación del mismo y método de determinación de la presencia de analitos en alimentos.

Objeto de la invención

El objeto de la presente memoria descriptiva está referido a un biosensor amperométrico desechable para la determinación de, por ejemplo, fructosa en todo tipo de alimentos que contengan el analito a detectar.

Antecedentes de la invención

Se han construido biosensores de fructosa utilizando diferentes estrategias de inmovilización de la FDH: adsorción sobre partículas de oro coloidales que se depositan posteriormente sobre el electrodo de carbono vitrificado [Yabuki, S.; Mizutani, F. *Electroanalysis* 9 (1997) 23-25]; incorporación de la enzima en electrodos de pasta de carbono [Parellada, J.; Domínguez, E.; Fernández, V.M. *Anal. Chim. Acta* 330 (1996) 71-77], [Paredes, P.A.; Parellada, J.; Fernández, V.M.; Katakis, I.; Domínguez, E. *Biosens. & Bioelectron.* 12 (1997) 1233-1243]; encapsulamiento de la enzima en membranas depositadas sobre el electrodo [Xie, X.; Kuan, S.S.; Guilbault, G.G. *Biosens. & Bioelectron.* 6 (1991) 49-54], [Ikeda, T.; Matsushita, F.; Senda, M. *Biosens. & Bioelectron.* 6 (1991) 299-304], [Antiochia, R.; Palleschi, G. *Anal. Lett.* 30 (1997) 683-697], [Tkáč, J.; Voštiar, I.; Šturdík, E.; Gemeiner, P.; Mastihubá, V.; Annus, J. *Anal. Chim. Acta* 439 (2001) 39-46], [Tkáč, J.; Voštiar, I.; Gemeiner, P.; Šturdík, E. *Bioelectrochem.* 55 (2002) 149-151]; atrapamiento de la enzima en películas conductoras (fundamentalmente polipirrol) [Khan, G.F.; Kobatake, E.; Shinohara, H.; Ikariyama, Y.; Aizawa, M. *Anal. Chem.* 64 (1992) 1254-1258], [Khan, G.F.; Kobatake, E.; Ikariyama, Y.; Aizawa, M. *Anal.*

Chim. Acta 281 (1993) 527-533], [Swann, M.J.; Bloor, D.; Haruyama, T.; Aizawa, M. *Biosens. & Bioelectron.* 12 (1997) 1169-1182], [García, C.A.B.; de Oliveira Neto, G.; Kubota, L.T. *Anal. Chim. Acta* 374 (1998) 201-208] y no conductoras [Bassi, A.S.; Lee, E.; Zhu, J.-X. *Food Research International* 31 (1998) 119-127]; inmovilización en sílica-gel [García, C.A.B.; de Oliveira Neto, G.; Kubota, L.T.; Grandin, L.A. *J. Electroanal. Chem.* 418 (1996) 147-151]; adsorción sobre bicapas de fosfolípidos [Kinnear, K.T.; Monbouquette, H.G. *Anal. Chem.* 69 (1997) 1771-1775]; adsorción sobre monocapas autoensambladas de ODTNB [Darder, M.; Casero, E.; Pariente, F.; Lorenzo, E. *Anal. Chem.* 72 (2000) 3784-3792] e inmovilización mediante enlace covalente con glutaraldehído sobre una monocapa de cistamina [Watanabe, S.; Kubo, I. *Electrochem.* 70 (2002) 258-263].

En general, en cuanto a la estabilidad de los biosensores, aquellos que se han construido utilizando un método de inmovilización sencillo, como la adsorción directa sobre electrodos metálicos o de carbono ([Yabuki, S.; Mizutani, F. *Electroanalysis* 9 (1997) 23-25], [Begum, A.; Kobatake, E.; Suzawa, T.; Ikariyama, Y.; Aizawa, M. *Anal. Chim. Acta* 280 (1993) 31-36]), suelen presentar tan baja estabilidad que su aplicación a la determinación de fructosa en muestras reales no es posible. El biosensor en el que la enzima se ha inmovilizado en bicapas de fosfolípidos depositadas sobre el electrodo, presenta mayor estabilidad [Kinnear, K.T.; Monbouquette, H.G. *Anal. Chem.* 69 (1997) 1771-1775], pero la etapa de inmovilización suele ser excesivamente larga, requiriendo procesos de diálisis de varios días de duración (2-6 días). Los mejores resultados se han logrado con biosensores fabricados por modificación de pasta de carbono con la enzima [Ikeda, T.; Matsushita, F.; Senda, M. *Biosens. & Bioelectron.* 6 (1991) 299-304], [Paredes, P.A.; Parellada, J.; Fernández, V.M.; Katakis, I.; Domínguez, E. *Biosens. & Bioelectron.* 12 (1997) 1233-1243], Estos dispositivos se pueden utilizar durante unos 7-15 días, con respuestas del orden del 30-50% de la intensidad inicial. Sin embargo, como todos los biosensores desarrollados sobre pasta de carbono, presentan los inconvenientes de requerir un gasto de enzima elevado y de proporcionar una mala reproducibilidad.

También se ha desarrollado un biosensor de fructosa deshidrogenasa que mejora los anteriores en el que se produce la coinmovilización de la enzima FDH y el mediador redox TTF mediante entrecruzamiento con glutaraldehído sobre un electrodo de oro convencional modificado con una monocapa de ácido mercaptopropiónico (MPA) [Campuzano, O.A.; Loaiza, M.; Pedrero, F. J. Manuel de Villena, J. M., Pingarrón, *Bioelectrochemistry* 63 (2004) 199-206], esta monocapa es necesaria para separar la superficie del electrodo de oro de la enzima para que no se produzca la desactivación de la FDH. Con este biosensor se consiguen tiempos de operatividad de más de 30 días y se pueden realizar más de 150 análisis con el mismo biosensor. Sin embargo, el tiempo requerido para su fabricación es de más de un día, debido a que es necesario este tiempo para depositar la monocapa de MPA necesaria para que no se produzca la desactivación de la enzima.

El oro depositado sobre la superficie de acero inoxidable mediante sputtering tiene una estructura diferente a la del electrodo de oro convencional que no produce la desactivación de la enzima y por tanto no es necesaria la modificación con monocapas de MPA del oro depositado sobre la superficie del electrodo de acero inoxidable. Además el electrodo de acero inoxidable recubierto con oro mantiene todas las demás características del electrodo de oro convencional en aplicaciones electroquímicas.

El recubrimiento de cristales de cuarzo con oro mediante sputtering es una técnica usual en la construcción de biosensores piezoeléctricos. Recientemente también ha sido empleada en la construcción de biosensores electroquímicos principalmente en forma de pistas sobre materiales no conductores poliméricos o sobre otros metales previamente depositados sobre superficies poliméricas como Cr igual que se hace en la construcción de los cristales piezoeléct-

tricos. Se han construido biosensores con oro depositado por sputtering para la construcción de biosensores enzimáticos [Masatoshi Hashimoto, Sanjay Upadhyay, Hiroaki Suzuki, Biosensors and Bioelectronics 21 (2006) 2224-2231; Huaqing Li, Zonghui Guoa, Hui Wang, Dafu Cui, Xinxia Cai; Sensors and Actuators B 119 (2006) 419-424] e inmunosensores [Eva M. Abad-Villar, M. Teresa Fernández-Abedul, Agustín Costa-García, Biosensors and Bioelectronics 17 (2002) 797-780; Eva M. Abad-Villar, M. Teresa Fernández-Abedul, Agustín Costa-García, Analytica Chimica Acta 453 (2002) 63-69] que necesitan modificar la superficie de oro para conseguir una buena estabilidad del biosensor.

Descripción de la invención

Ninguno de los biosensores electroquímicos mencionados anteriormente, se han construido por deposición de oro mediante sputtering sobre superficies de metales como acero inoxidable. La deposición de oro sobre acero inoxidable por sputtering es sencilla y económica para construir electrodos (biosensores) de oro, ya que mediante dicha deposición se inmoviliza la enzima directamente sobre la superficie del electrodo sin que haya una desactivación de la enzima como se ha comentado anteriormente.

La presente invención está referida a un electrodo enzimático desechable para la determinación, preferentemente de fructosa, en todo tipo de alimentos que contengan este analito. De forma más concreta, el biosensor consiste en una matriz electrónica de acero inoxidable o cualquier otro material conductor embebido en un material aislante en el que se ha depositado una película de oro mediante la técnica de "sputtering" sobre una de las superficies de la matriz electrónica, estando la otra superficie en contacto con el potenciostato. Sobre la película de oro se deposita la enzima correspondiente con el mediador adecuado y se encapsula con una membrana de diálisis.

Es un segundo aspecto de la presente invención, el procedimiento para la determinación de la presencia de analitos en alimentos, particularmente fructosa, mediante la medida de la señal amperométrica obtenida de la monitorización del analito en una disolución de trabajo a la que se le ha añadido una alícuota de la muestra.

Este método se basa en el empleo de un dispositivo que comprende el biosensor objeto de la invención, junto con un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de un material conductor. Este dispositivo está sumergido en una disolución de trabajo a la que se añade una alícuota de la muestra del alimento. El biosensor está conectado a un instrumento que además de utilizarse como potenciostato permite, mediante una calibración previa, relacionar la corriente generada en el biosensor con el contenido del analito (en las unidades adecuadas) en la muestra de alimento analizada. En este instrumento de medida se ha diseñado específicamente para el biosensor, solucionando los problemas de comunicación y registro de datos para proporcionar un resultado fiable.

La determinación del contenido de analito en la muestra se puede realizar de dos maneras diferentes: a) mediante calibrado externo y b) empleando el método de adiciones estándar.

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar electrodos enzimáticos amperométricos desechables. El procedimiento se caracteriza por preparar los bioelectrodos según la metodología que se expone a continuación:

Sobre una de las superficies del acero inoxidable (o cualquier otro material conductor) embutido en un material aislante, se coloca una fina capa de oro por *sputtering*, a continuación, sin realizar ningún tratamiento de limpieza o acondicionamiento del oro se colocan la cantidad de enzima adecuada en disolución, se deja secar la disolución, posteriormente se adiciona una alícuota con la cantidad adecuada de mediador, se deja secar la disolución. Por último se coloca sobre la superficie de oro que contiene la enzima y el mediador una membrana de diálisis (o cualquier otra membrana permeable al analito). Además, al biosensor se implementa un dispositivo que permita su reconocimiento individual por el instrumento de medida con el fin de realizar un conteo del número de medidas.

Con este procedimiento de fabricación, el biosensor enzimático se fabrica por simple atrapamiento físico entre la superficie del oro y la membrana, sin necesidad de separar mediante cualquier tipo de procedimiento (normalmente mono-capas auto-ensambladas de tioles) de la enzima, ya que la enzima en contacto con la superficie de electrodos de oro convencionales se desactiva. La no desactivación de la enzima por las partículas de oro depositadas sobre la superficie de acero inoxidable es debido a la diferente estructura a nivel microscópico que tiene con respecto a las superficies de oro convencionales.

Esta metodología diferente a los otros procedimientos de fabricación de biosensores hace que el proceso de fabricación sea más sencillo, rápido y barato sin perder las características de estabilidad y funcionamiento de los electrodos de oro convencionales y sin tener que volver a utilizarlo, es decir una vez que se ha agotado el tiempo de vida del biosensor se puede desechar, ya que el coste por biosensor es mucho menor que los electrodos de oro convencionales que tendrían que ser regenerados para tener un coste por medida aceptable.

La estabilidad del biosensor desechable es buena como se pone de manifiesto cuando se consideran diferentes aspectos: a) Repetibilidad de la respuesta amperométrica para un biosensor, b) Reproducibilidad en la fabricación de diferentes electrodos fabricados de la misma forma y c) Tiempo de vida útil del biosensor que es de 1 mes o 100 medidas, una vez cumplidos estos requisitos el biosensor se desecha.

El biosensor así construido se coloca en la unidad sensora y se sumerge en la disolución de trabajo obteniéndose las medidas de analito en la disolución de trabajo por amperometría, midiendo la corriente cuando se alcanza el estado estacionario a un potencial constante de 150 mV frente a Ag/AgCl.

La electrónica del dispositivo además de ser un potencióstato al que se conecta la unidad sensora, permite correlacionar las corrientes obtenidas en el biosensor con la concentración de analito en la muestra, mediante un calibrado previamente establecido y teniendo en cuenta el factor de dilución para cada muestra en particular.

Breve descripción de las figuras

A continuación se pasa a describir de manera muy breve una serie de dibujos que ayudan a comprender mejor la invención y que se relacionan expresamente con una realización de dicha invención que se presenta como un ejemplo no limitativo de ésta.

Figura 1.- Vista del biosensor amperométrico desechable, objeto de la presente invención, en una vista explosionada (figura 1a) y vista de conjunto (figura 1b).

Figura 2.- Vista del dispositivo de empleo del biosensor amperométrico desechable, objeto de la presente invención.

Realización preferente de la invención

Tal y como puede observarse en la figura 1 el biosensor amperométrico desechable (100) comprende, al menos:

un cuerpo conductor (1) con un eje longitudinal, preferentemente cilíndrico y de acero inoxidable, sobre el que se sitúa un dispositivo de reconocimiento individual de cada sensor amperométrico desechable (7) configurado para que el instrumento de medida, no mostrado en las figuras, realice un conteo del número de medidas;

un cuerpo aislante (2) con un eje longitudinal, preferentemente cilíndrico, situado de manera coaxial sobre el cuerpo conductor (1) de tal forma que dicho cuerpo conductor (1) quede parcialmente rodeado a lo largo de su eje longitudinal por el segundo cuerpo (2);

y donde, sobre la base (12) del extremo del cuerpo conductor (1) rodeado coaxialmente por el cuerpo aislante (2) se sitúan, al menos:

una capa de oro (3) depositada por *sputtering*, sobre la que se deposita la capa de enzima (4) correspondiente con el mediador adecuado;

estando encapsulada, la base (12) con la capa de oro (3) y la capa de enzima (4), con una membrana de diálisis (5) cerrada con un anillo (6).

El biosensor amperométrico desechable (100), objeto de la presente invención, se utiliza mediante un dispositivo mostrado en la figura 2. Dicho dispositivo comprende, al menos:

un primer cuerpo (200) contenedor de las conexiones, incluyendo el elemento conectar (202) con un potencióstato, no mostrado en las figuras, y configurado para la calibración del dispositivo;

un segundo cuerpo (201) situado en la parte inferior del primer cuerpo (200), que en su parte inferior comprende, a su vez:

un primer biosensor amperométrico desechable (100), objeto de la presente invención;

un segundo electrodo de referencia (203) preferentemente de Ag/AgCl; y

un tercer electrodo auxiliar de un material conductor (204);

donde dicho dispositivo está configurado para ser sumergido en una disolución de trabajo a la que se añade una muestra alícuota del alimento.

El procedimiento de fabricación del biosensor, segundo aspecto de la presente invención comprende, al menos, las siguientes etapas:

(i) una primera etapa de colocación de una capa de oro por *sputtering* sobre una superficie de un material conductor embutido en un material aislante;

ES 2 337 328 A1

(ii) una segunda etapa de colocación de la enzima adecuada en disolución, secándose dicha disolución y adicionando una alícuota con la cantidad adecuada de mediador, secando la solución en conjunto; y

5 (iii) una tercera etapa de colocación de una membrana de diálisis u otra membrana permeable al analito sobre la superficie del conjunto formado por la enzima y el mediador junto con el oro.

El método de determinación de la presencia de analitos en alimentos comprende, al menos, las siguientes etapas:

10 (i) una primera etapa de calibrado del dispositivo de medida que incluye el biosensor amperométrico desechable (100), de tal forma que se configure para la relación entre la corriente generada en el biosensor con el contenido del analito en las unidades adecuadas y en la muestra de alimento analizada;

15 (ii) una segunda etapa de inserción del dispositivo en una disolución de trabajo a la que se añade una alícuota de la muestra del alimento; y

(iii) una tercera etapa de medida y muestra de resultados.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Biosensor amperométrico desechable (100) **caracterizado** porque comprende:

5 un cuerpo conductor (1) con un eje longitudinal sobre el que se sitúa un dispositivo de reconocimiento individual de cada biosensor amperométrico desechable (7) configurado para que el instrumento de medida realice un conteo del número de medidas;

10 un cuerpo aislante (2) con un eje longitudinal, situado de manera coaxial sobre el cuerpo conductor (1) de tal forma que dicho cuerpo conductor (1) quede parcialmente rodeado a lo largo de su eje longitudinal por el cuerpo aislante (2);

y donde, sobre la base (12) del extremo del cuerpo conductor (1) rodeado coaxialmente por el cuerpo aislante (2) se sitúan, al menos:

15 una capa de oro (3) depositada por *sputtering*, sobre la que se deposita una capa de enzima (4) correspondiente con el mediador adecuado;

20 estando encapsulada, la base (12) con la capa de oro (3) y la capa de enzima (4), con una membrana permeable al analito (5) cerrada con un anillo (6).

2. Procedimiento de fabricación del biosensor amperométrico desechable (100) de la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende, las siguientes etapas:

25 (i) una primera etapa de colocación de una capa de oro (3) por *sputtering* sobre la base (12) de un material conductor (1) parcialmente rodeado a lo largo de su eje longitudinal por un material aislante (2);

(ii) una segunda etapa de colocación de la enzima (4) adecuada en disolución, secándose dicha disolución y adicionando una alícuota con la cantidad adecuada de mediador, secando la solución en conjunto; y

30 (iii) una tercera etapa de colocación de una membrana de diálisis (5) u otra membrana permeable al analito sobre la superficie del conjunto formado por la enzima (4) y el mediador junto con el oro (3).

35

40

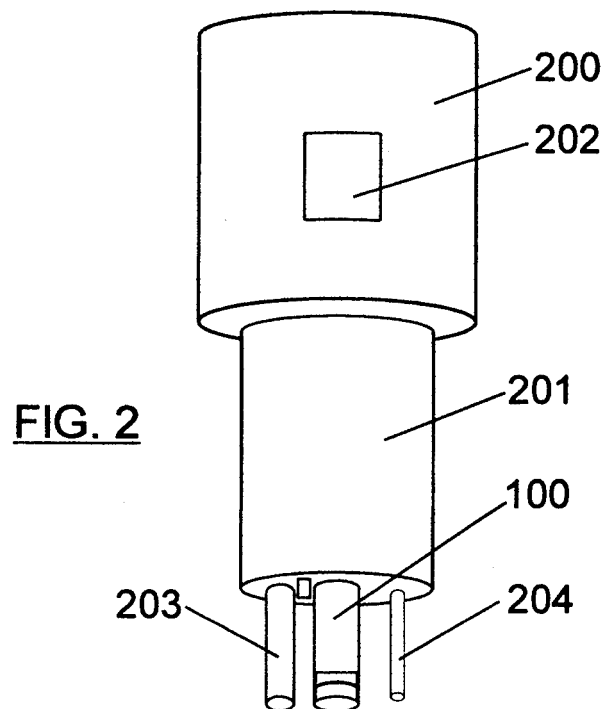
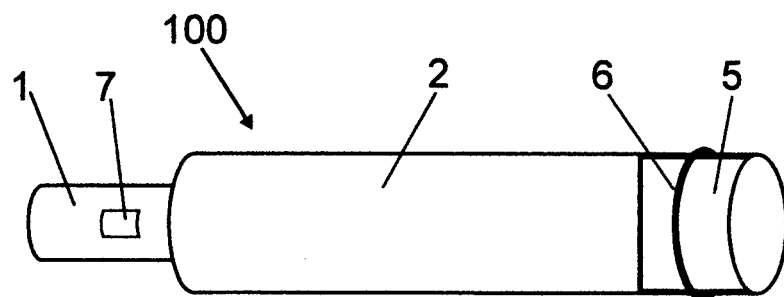
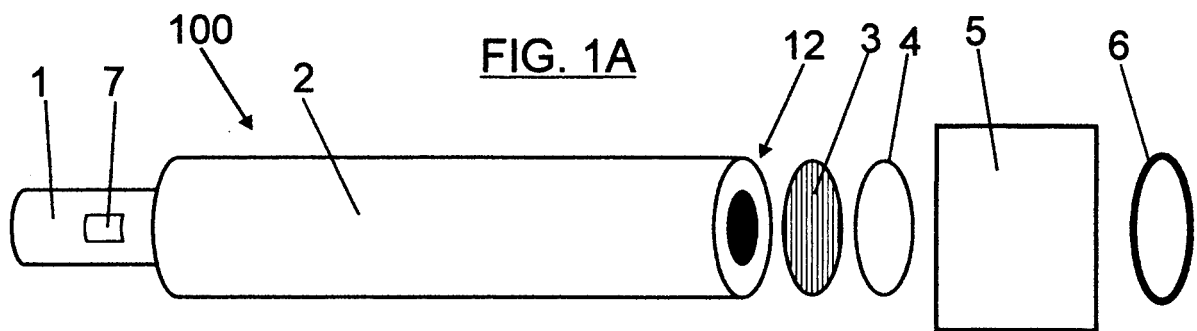
45

50

55

60

65





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 337 328

⑫ Nº de solicitud: 200802211

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **24.07.2008**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 1496354 A1 (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 12.01.2005, párrafos [2-11],[25-53],[60-65]; figuras 1-2.	1,2
A	PALMISANO, F. et al. Flow injection analysis of L-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detection at a disposable biosensor. The Analyst. Junio 2001, Vol. 126, nº 6, páginas 866-870, ISSN 0003-2654 (Print) <DOI: 10.1039/b010180j>.	1,2
A	ES 2255861 B1 (INTECSA INARSA S A) 01.11.2007, todo el documento.	1,2

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

07.04.2010

Examinador

A. Figuera González

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 27/49 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

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

G01N, C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTEN, BIOSIS, COMPDX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE, XPESP, internet

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.04.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-2	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-2	SÍ
	Reivindicaciones		NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 1496354 A1 (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD)	12-01-2005
D02	PALMISANO, F. et al. Flow injection analysis of L-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detection at a disposable biosensor. The Analyst. Junio 2001, Vol. 126, nº6, páginas 866-870, ISSN 0003-2654 (Print) <DOI: 10.1039/b010180j>	2001
D03	ES 2255861 B1 (INTECSA INARSA S A)	01-11-2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**REIVINDICACIONES 1 y 2**

En el documento D01 se describe un biosensor amperométrico que comprende un electrodo de trabajo 2 formado por una capa de oro depositada por sputtering sobre una base laminar de vidrio eléctricamente aislante. Sobre este electrodo de trabajo se deposita una capa que comprende una enzima oxidorreductasa y un mediador. Véase documento D01, párrafos 60 y 61 y figuras 1 y 2.

En el documento D01 se menciona la posibilidad de usar películas que bloqueen la difusión hasta el electrodo de sustancias que puedan interferir con su funcionamiento. Véase documento D01, párrafo 11. Sin embargo esta posibilidad se describe como parte del estado de la técnica y la invención propone una solución diferente para evitar las interferencias.

También existen otras diferencias entre el biosensor objeto de la reivindicación 1 y el biosensor divulgado en el documento D01.

En primer lugar, la estructura del biosensor reivindicado es totalmente diferente de la divulgada en el documento D01.

Tampoco está previsto en el documento D01 que el biosensor tenga un dispositivo de reconocimiento individual tal como el que incorpora el biosensor objeto de la reivindicación 1.

En definitiva, no está claro qué motivación hubiera tenido el experto en la materia para combinar diferentes conocimientos dispersos en el estado de la técnica e incorporarlos al biosensor del documento D01 de forma que se hubiera obtenido el objeto de la reivindicación 1.

Se considera por lo tanto que la reivindicación 1 es nueva y tiene actividad inventiva de acuerdo con el artículo 8 de la Ley de Patentes.

De acuerdo con un razonamiento similar, se considera que la reivindicación 2 también es nueva y tiene actividad inventiva.