

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 790**

21 Número de solicitud: 201631376

51 Int. Cl.:

G01N 31/22 (2006.01)

G01N 33/18 (2006.01)

C08L 33/26 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

26.10.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.04.2018

Fecha de concesión:

08.02.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

15.02.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO / EUSKAL
HERRIKO UNIBERTSITATEA (100.0%)
Barrio Sarriena, S/N
48940 Leioa (Bizkaia) ES**

72 Inventor/es:

**BENITO LÓPEZ, Fernando y
SAEZ CASTAÑO, Janire**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

54 Título: **DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO PORTÁTIL PARA DETECTAR NITRITO-NITRATO**

57 Resumen:

Dispositivo microfluídico portátil para detectar nitrito-nitrato.

La invención describe un ionogel que comprende un hidrogel en un líquido iónico, y un sistema reactivo que cambia de color por reacción con el nitrito. La invención también describe un dispositivo microfluídico que comprende: un sustrato 1 que comprende: reservorios de calibración 2 separados entre sí que comprenden ionogel, un reservorio 3 de calibración del hidrogel en el líquido iónico, un reservorio 6 para depositar muestra a analizar, conectado a través de un canal microfluídico 5 con un agente reductor, a un reservorio 4 de medida que comprende ionogel, y un reservorio 7 de medida que comprende ionogel de la invención donde se deposita muestra a analizar. La invención también describe procedimientos para fabricar el ionogel y el dispositivo así como un método para detectar y determinar colorimétricamente nitrito y nitrato en un agua contaminada utilizando el ionogel y el dispositivo.

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

ES 2 665 790 B1

DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO PORTÁTIL PARA DETECTAR NITRITO-NITRATO

Campo de la invención

La presente invención se encuadra dentro de las técnicas para detección y determinación de contaminación de una masa de agua por nitrato. En particular se refiere a un dispositivo microfluídico portátil capaz de detectar nitrato-nitrato combinado en un agua contaminada de forma rápida y eficaz, y en el mismo lugar de la contaminación.

Antecedentes de la invención

En los últimos años, diversos dispositivos de monitorización ambiental han aparecido en respuesta a la creciente contaminación de las aguas naturales, industriales y municipales con sustancias tóxicas y contaminantes del agua tales como agentes químicos nocivos. Las agencias de monitorización medio-ambiental operan generalmente de forma manual, mediante la toma de muestras en el lugar contaminado, y el transporte de las mismas a las instalaciones correspondientes donde el análisis se lleva a cabo por personal altamente cualificado utilizando instrumentos sofisticados. Esta estrategia tiene beneficios tales como la obtención de resultados muy precisos y exactos y el ajuste a los procedimientos legales de regulación, pero presenta desventajas tales como los elevados costes asociados al mantenimiento de estas instalaciones, la instrumentación y el personal cualificado. Además este tipo de protocolos impide el trabajar *in situ*, alargando pues los tiempos de respuesta en caso de una contaminación inesperada. Otros tipos de métodos permiten el obtener información *in situ*, pero el equipamiento utilizado es generalmente caro y sofisticado, por lo que necesita también de personal cualificado para su utilización.

La determinación de la concentración de nutrientes en una masa de agua es muy importante debido a que la concentración de nutrientes influye y modifica el equilibrio de la vida en el agua. El incremento de la concentración de nutrientes en el agua sin control podría conducir a un desastre ambiental. En particular, el incremento de nitratos provoca el detrimento de la salud humana y la degradación de la vida acuática, tal como la eutrofización de las algas que conduce a la muerte de la fauna y flora.

Las técnicas actuales para la detección de nitrato y nitrito son amperométricas, electroquímicas, biosensoras, o basadas en métodos espectrofotométricos que son las más populares debido a los excelentes límites de detección (nanomolar), rango dinámico y la eficiencia de costes.

Los métodos clásicos colorimétricos se han aplicado tradicionalmente como una herramienta rápida para la determinación y detección de la concentración de analitos en varias matrices. La técnica colorimétrica utiliza la capacidad de los reactivos para ligarse a analitos de interés que generan una reacción coloreada. La intensidad de esta reacción dependerá directamente de la concentración de analito. En particular, se conoce el reactivo de Griess que se utiliza para la determinación y la detección de nitrito en una matriz acuosa. La determinación colorimétrica de nitrito mediante el reactivo de Griess es químicamente robusta, ofrece un excelente rendimiento analítico y se ha aplicado en el desarrollo de varias plataformas analíticas. Sin embargo, estos sistemas son generalmente complicados dispositivos que constan de depósitos de reactivos, bombas y válvulas para el control del flujo de líquidos en el dispositivo y módulos detectores haciendo que resulten caros e inadecuados para su uso en el lugar de la contaminación.

La presente invención surge frente a la necesidad en el estado de la técnica de proporcionar sistemas de detección de nitrito/nitrato combinado, alternativos que superen al menos parte de las desventajas mencionadas de los métodos actuales.

Descripción de las Figuras

Figura 1: esquema de un dispositivo microfluídico de la invención que consta de un sustrato (1), cinco reservorios de calibración (2), un reservorio (6) para depositar muestra a analizar, un reservorio (3) de calibración del "blanco", un reservorio (4) de medida, un reservorio (7) de medida para depositar muestra a analizar, y un canal microfluídico (5) que comunica el reservorio (6) y el reservorio (4), y que comprende un reductor.

Figura 2A: muestra un espectro UV/UV-Vis de un ionogel 1 (IO-1) que comprende un hidrogel en un líquido iónico con reactivo Griess (10) y de dicho hidrogel en el líquido iónico con reactivo Griess y con nitrito (11).

Figura 2B: muestra el espectro UV/UV-Vis de otro ionogel 2 (IO-2) que comprende otro hidrogel en otro líquido iónico con reactivo Griess (12) y dicho hidrogel en dicho líquido iónico con reactivo Griess y con nitrito (13). La máxima Absorbancia para la reacción de Griess con nitrito se encontró a $\lambda = 532$ nm. En esta Figuras 2A y 2B se observan las diferencias de absorbancia.

Figura 3: representa las rectas de un modelo de calibración multivariante (17) formada por los triángulos (15) y de validación (16), formada por los puntos (14), generado después del análisis por imagen de las concentraciones: (0 ppm), (2,5 ppm), (5 ppm), (7,5 ppm) y (10 ppm).

Descripción de la invención

En un aspecto la invención se relaciona con un ionogel, en adelante ionogel de la invención, que comprende:

- un hidrogel en un líquido iónico, y
- un sistema reactivo que proporciona un cambio de color por reacción con el nitrito.

El hidrogel que es una estructura polimerizada y entrecruzada, porosa, y con propiedades hidrófilas capaces de retener una importante fracción de agua dentro de la misma. Mientras que los hidrogeles se preparan generalmente a partir de monómeros hidrófilos, también se pueden utilizar monómeros hidrófobos para regular

las propiedades para aplicaciones específicas.

De acuerdo con la presente invención, el hidrogel se obtiene en un líquido iónico, por polimerización y entrecruzamiento de dos o más monómeros precursores seleccionados de ácido acrílico, acrilatos de metales alcalinos, acrilamida y sus derivados acrílicos, bien conocidos para un experto en la materia, como metil acrilato, metil metacrilato etc. En una realización particular el hidrogel es una poliacrilamida.

En una realización preferida el hidrogel se obtiene por polimerización de N-isopropilacrilamida y N,N'-metilen bis(acrilamida), que además de comonómero es agente de entrecruzamiento. Las proporciones de los monómeros en el polímero hidrogel final varían entre amplios márgenes y se determinan fácilmente por el experto en función de la dureza deseada y el grado de entrecruzamiento. Por ejemplo en el caso de la N-isopropilacrilamida y N,N'-metilen bis(acrilamida), las proporciones pueden variar desde 100:1, hasta 10:1, y por ejemplo pueden ser 90:1, 70:1, 50:1 o 20:1.

El sistema reactivo que proporciona un cambio de color por reacción con el nitrito que puede utilizarse en la presente invención puede ser en principio cualquier sistema reactivo colorimétrico convencional conocido para un experto en la materia. Ejemplos no limitativos de dichos sistemas reactivos son enzimas tales como las nitrito y nitrito reductasas, que se describen por ejemplo el "Nitrite Biosensing via Selective Enzymes—A Long but Promising Route; M. Gabriela Almeida, Alexandra Serra, Celia M. Silveira, and Jose J.G. Moura; Sensors (Basel). 2010; 10(12): 11530–11555", la difenilbenzidina, la minoxidina descrita en "Detection of Nitrite in Water Using Minoxidil as a Reagent, Mario Gonzalez-Jimenez, Jorge Arenas-Valganon, Isaac F. Cespedes-Camacho, Juan Carlos Garefa-Prieto, Emilio Calle, and Julio Casado, J.Chem.Educ; 2013, 90, 1053-1056", o el reactivo de Griess. En una realización preferente de la invención se utiliza el reactivo de Griess.

Los líquidos iónicos son sales orgánicas líquidas a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente, y comprenden un catión orgánico y un anión que puede ser orgánico o inorgánico. Tienen propiedades notables tales como volatilidad cero, una alta conductividad iónica, así como propiedades catalíticas. Se utilizan actualmente en numerosos campos, en particular como electrolitos. Dentro de los posibles cationes orgánicos que pueden emplearse en la presente invención, se encuentran los derivados de imidazolio, piridinio, pirrolidinio, amonio, o fosfonio. Cabe destacar entre otros 1-alkil-3-metilimidazolio, 1-alkilpiridinio, N-metil-N-alkilpirrolidinio, sales de amonio, sales de fosfonio, etc. Ejemplos no limitativos de cationes son: trihexiltetradecil fosfonio [P6,6,6,14]⁺; tributil tetradecil fosfonio [P4,4,4,14]⁺; tetrabutyl fosfonio [P4,4,4]⁺; triisobutil metil fosfonio [P1,4,4,4]⁺; 1-butyl-1-metil pirrolidina, 1-etil-3-metilimidazolio [emim]⁺, 1-Butil-3-metilimidazolio [bmim]⁺, N-propil N-metil-pirrolidinio [C₃mpyr]⁺, N-butyl N-metil-pirrolidinio [C₄mpyr]⁺, trioctil metil amonio [Oct₃NMe]⁺.

Dentro de los posibles aniones que pueden emplearse en la presente invención, se encuentran los sulfonatos, boratos, fosfatos, haluros, etc. Ejemplos no limitativos de aniones son entre otros: tosilato [tos]-, dodecylbencenosulfonato [dbsa]⁻, etil sulfato, bis(trifluorometansulfonil) amida [NTf₂]⁻, dicianoamida [dca]⁻, Tetracianoborato [BCN₃]⁻, hexafluorofosfato [PF₆]⁻, tetrafluoroborato [BF₄]⁻, etil sulfato, tris(penta fluor etil) trifluoro fosfato, cloruro, bromuro, yoduro, fluoruro.

En una realización particular el líquido iónico es etil sulfato de 1-etil-3-metilimidazolio (IO-1). En otra realización particular el líquido iónico es trihexiltetradecil fosfonio dicianoamida (IO-2).

El sistema reactivo se encuentra embebido en el interior del hidrogel en el líquido iónico, cuya estructura permite el almacenamiento del sistema reactivo, por largos períodos de tiempo sin que se deteriore, a la vez que actúa como un sensor colorimétrico como se explica más adelante.

En otro aspecto la invención se relaciona con un dispositivo microfluídico que comprende:

- un sustrato 1 que comprende:
- dos o más reservorios de calibración 2 separados entre sí que comprenden ionogel de la invención,
- un reservorio 3 de calibración que comprende hidrogel en el líquido iónico ("blanco"),
- un reservorio 6 para depositar muestra a analizar, conectado a través de un canal microfluídico 5 que comprende un agente reductor, a un reservorio 4 de medida que comprende ionogel de la invención,
- un reservorio 7 de medida que comprende ionogel de la invención donde se deposita muestra a analizar.

El ionogel de la invención que se utiliza en un dispositivo microfluídico particular es el mismo en todos los reservorios; donde este ionogel comprende un hidrogel determinado en un líquido iónico determinado el cual se utiliza en el reservorio 3 de calibración ("blanco").

El sustrato 1 que sirve de soporte para el dispositivo es una placa de plástico. En principio la placa puede ser de cualquier material siempre que sea inerte a los materiales con los que va a entrar en contacto, es decir, que no reaccione, y no interfiera con la química del dispositivo microfluídico sensor y permanezca inalterado.

Ejemplos de materiales plásticos adecuados para el sustrato son entre otros, polietileno de alta densidad, polietileno de baja densidad, politereftalato de etileno, policloruro de vinilo, polipropileno, poliestireno o policarbonato, polímero o copolímero de olefinas cíclicas o resinas acrílicas. De acuerdo con una realización particular el sustrato es una placa de polimetilmetacrilato. Estas placas pueden obtenerse de forma comercial.

Las dimensiones del sustrato pueden ser variables y no existe ninguna limitación particular al respecto. El tamaño de dispositivo puede variar dependiendo de los requisitos de análisis, el número de muestras que se quieran analizar en un solo dispositivo, el número de repeticiones que se quieran hacer de una determinada muestra, entre otros parámetros. Idealmente el tamaño está definido de tal forma para que sea manejable de una forma sencilla en la mano (portable). En una realización particular el dispositivo presenta 1 mm de espesor y un tamaño de 22 mm x 10 mm.

Asimismo las dimensiones y las formas de los reservorios también pueden variar en el dispositivo, sin que exista tampoco ninguna limitación particular al respecto.

La precisión del dispositivo a la hora de determinar y cuantificar el contenido de nitrito en una muestra va a depender, entre otros factores, del número de reservorios de calibración 2 separados entre sí. En este sentido se prefiere que el dispositivo tenga al menos 3, preferentemente al menos 4, y más preferentemente al menos 5 reservorios de calibración 2. Estos reservorios contienen concentraciones distintas de nitrito (disoluciones patrones) y en ellos se origina un cambio de color por reacción del sistema reactivo con el nitrito que es proporcional en intensidad de color a la concentración de nitrito en un rango lineal.

De acuerdo con una realización particular el canal microfluídico 5 comprende un papel microfluídico. En dicho canal se dispone a su vez un agente reductor, que reduce el nitrato presente en la muestra a analizar que se dispone en el reservorio 6 a nitrito, que es el analito para el que el sistema reactivo del ionogel de la invención muestra sensibilidad. En una realización particular el agente reductor comprende $Zn(0)$, y se dispone por ejemplo en forma de una emulsión de $Zn(0)$ en agua ultrapura. Otros reductores que pueden utilizarse según la presente invención son la nitrato reductasa; agentes reductores en medio ácido como por ejemplo: ácido fórmico, $Fe(0)$, e iones amonio; y reductores en medio básico como por ejemplo: soluciones de Al , Zn y $Fe(II)$ e hidracina, entre muchos otros.

En otro aspecto adicional la invención se relaciona con un procedimiento para fabricar el ionogel de la invención que comprende las etapas siguientes:

A)- preparar una mezcla de los monómeros precursores del hidrogel y en su caso un iniciador de la polimerización en un líquido iónico;

B)-. polimerizar los monómeros en el líquido iónico para obtener el hidrogel en el líquido iónico, e

C)- incorporar el sistema reactivo, que proporciona un cambio de color por reacción con el nitrito, al hidrogel en el líquido iónico.

En función de los monómeros seleccionados en cada realización particular para su polimerización el experto en la materia puede seleccionar en su caso un iniciador adecuado, así como las condiciones de polimerización como luz UV o visible, y/o temperatura y el líquido iónico particular. Como se ha explicado anteriormente al menos un monómero ejerce también de agente de entrecruzamiento en la reacción. En una realización particular los monómeros son N-isopropilacrilamida y N,N'-metilen bis(acrilamida), y se fotopolimerizan con un iniciador de fotopolimerización, tal como 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona y luz UV. La polimerización de la etapa B) se lleva a cabo en un líquido iónico como se ha definido anteriormente y el resultado es un hidrogel en dicho líquido iónico que como se explica más abajo sirve de "blanco" en el reservorio 3 del dispositivo.

En una realización preferente dicho líquido iónico se selecciona de entre etil sulfato de 1-etil-3-metilimidazolio y trihexiltetradecil fosfonio dicianoamida. Puede ser en ocasiones conveniente o incluso necesario, calentar la mezcla de reacción para facilitar la disolución de los monómeros.

Una vez obtenido el hidrogel en el líquido iónico, opcionalmente se lava para eliminar los restos de monómeros que no hayan reaccionado, y de cualquier otro reactivo, con agua ultrapura y/o un disolvente orgánico adecuado por ejemplo un alcohol.

A continuación en la etapa C) se incorpora el sistema reactivo al hidrogel en el líquido iónico, por ejemplo por simple disposición o impregnación del mismo. En una realización particular el sistema reactivo es el reactivo de Griess. A continuación el ionogel resultante se deja secar. En una realización particular se adiciona la misma cantidad en microlitros de reactivo de Griess que de mezcla de ionogel al mismo.

En otro aspecto adicional la invención se relaciona con un procedimiento para fabricar el dispositivo microfluídico de la invención. El procedimiento comprende las etapas de:

- proveer sobre un sustrato 1:

- uno o más reservorios de calibración 2 separados entre sí;

- un reservorio 6 para depositar muestra a analizar,

- un reservorio 3 de calibración ("blanco"),

- un reservorio 4 de medida,

- un reservorio 7 de medida para depositar la muestra a analizar,

- situar un canal microfluídico 5 que comprende un reductor entre el reservorio 6 y el reservorio 4, y

- obtener el ionogel *in situ* en los reservorios 2, 4, y 7, y el hidrogel en el líquido iónico en el reservorio 3, según el procedimiento de fabricación definido anteriormente.

Para la fabricación del dispositivo microfluídico se puede utilizar un láser de forma convencional. Además se dispone un canal microfluídico 5 que conecta los reservorios 6 y 4. Dicho canal consiste en una realización particular de un papel microfluídico que permite el paso a su través por capilaridad de la muestra que se deposita en el reservorio 6 hacia el reservorio 4 de medida. Dicho canal microfluídico 5 comprende un agente reductor capaz de reducir el nitrato de la muestra a nitrito, especie que es la detectada y determinada en la presente invención. En una realización particular dicho agente reductor es Zn(0), y puede incorporarse al canal 5 en forma de emulsión en agua ultrapura. La cantidad de emulsión que se incorpora puede variar en cada caso particular; típicamente se incorporan al canal 5 de 1 a 20 μL , en particular de 5 a 10 μL de suspensión de agente reductor.

El hidrogel en el líquido iónico se obtiene directamente *in situ* en cada reservorio 2, 3, 4, 6 y 7 del dispositivo microfluídico, siguiendo el procedimiento para fabricar el ionogel de la invención expuesto anteriormente (etapas A y B). En los reservorios 2, 4, 6 y 7 se obtienen posteriormente el ionogel incorporando el sistema reactivo (según la etapa C)).

En este sentido para obtener el hidrogel en el líquido iónico, se obtiene primero una mezcla de los monómeros precursores, y en su caso un iniciador de la polimerización, en un líquido iónico. La mezcla puede obtenerse *in situ* en cada reservorio o puede obtenerse en un recipiente aparte y de él tomarse una cantidad de mezcla que se deposita en los reservorios correspondientes. A continuación se lleva a cabo la polimerización *in situ* en el dispositivo. Una vez terminada la reacción de polimerización, el producto resultante se lava, y a continuación se incorpora el sistema reactivo en los reservorios 2, 4, 6 y 7, (pero no en el reservorio 3) y se deja secar. La cantidad de mezcla que se deposita en los reservorios correspondientes es variable y depende en cada caso del diseño del dispositivo microfluídico. Típicamente se trata de volúmenes entre 1 μL -20 μL de mezcla, por ejemplo entre 5-10 μL .

El procedimiento de fabricación del dispositivo microfluídico de la invención puede comprender además una etapa adicional de incorporar al ionogel en los reservorios de calibración 2, disoluciones de calibración con distintas concentraciones de nitrito, (disoluciones patrón), en los cuales se origina un cambio de color por reacción del sistema reactivo con el nitrito, proporcional en intensidad de color a la concentración de cada disolución en un rango lineal. Del procesamiento de los cambios de color en los reservorios de calibración 2 según se explica posteriormente, se obtiene una recta de calibración que se utiliza para determinar colorimétricamente la concentración de nitrito en la muestra analizada. La Figura 3 muestra una realización particular donde se utilizaron disoluciones de calibración con concentraciones distintas de nitrito, modo que en un primer reservorio 2 se dispusieron 0 ppm, en el segundo reservorio 2 se dispusieron 2,5 ppm, en el tercer reservorio 2 se dispusieron 5 ppm, en el cuarto reservorio 2 se dispusieron 7,5 ppm y en el quinto 10 ppm de nitrito.

En otro aspecto la invención se relaciona con un método para detectar y determinar colorimétricamente la concentración de nitrito y/o de nitrato en una muestra, en adelante método de la presente invención. El método de la invención comprende el uso del dispositivo microfluídico de la invención, permite detectar y determinar colorimétricamente la concentración de nitrito en una muestra; y/o la concentración de nitrato en la muestra.

El método se define a continuación en referencia al dispositivo microfluídico fabricado como se ha descrito anteriormente.

El método de la invención comprende las siguientes etapas:

- (i)- depositar cantidades iguales de muestra a analizar en los reservorios 3, 6 y 7 del dispositivo microfluídico de la invención,
- (ii)- reducción del nitrato presente en la muestra depositada en el reservorio 6 a nitrito por la acción del agente reductor a su paso a través por el canal microfluídico 5;
- (iii)- determinación por colorimetría de las concentraciones de nitrito en los reservorios de calibración 2 y establecimiento de la recta de calibración;
- (iv)- detección y determinación por colorimetría de la concentración de nitrito presente en la muestra en el reservorio 7, y de la concentración de nitrito en la muestra en el reservorio 4, y
- (v) determinación de la concentración de nitrato en la muestra por diferencia entre la concentración obtenida en el reservorio 7 y la concentración obtenida en el reservorio 4.

En una realización particular se parte del dispositivo microfluídico al que se le han incorporado ya las soluciones de calibración de distintas concentraciones de nitrito en los reservorios de calibración 2, y por tanto esta etapa no sería una etapa del método de la invención. En otra realización particular se parte del dispositivo microfluídico al que no se le han incorporado aún las soluciones de calibración con distintas concentraciones de nitrito en los reservorios de calibración 2, y por tanto esta etapa se define y entiende como una etapa adicional del método de la invención.

La detección colorimétrica de nitrito y/o nitrato en la muestra puede hacerse a simple vista si los reservorios 4 y 7 desarrollan color. En una realización particular el volumen de muestra a analizar que se dispone en los

reservorios 3, 6 y 7 es la misma.

La determinación de las concentraciones, se realiza analizando el color de los reservorios 2, 4 y 7 de una imagen tomada por medio de una cámara, o video del dispositivo microfluídico 1, y procesamiento de los diferentes reservorios del dispositivo para determinar las concentraciones. En una realización particular del método de determinación de la invención se tiene en cuenta el valor determinado en el reservorio 3 ("blanco").

La muestra que se analiza es líquida, y puede ser cualquiera tomada de cualquier líquido de origen natural, industrial o municipal que pueda presentar estos contaminantes nitrato/nitrato.

En otro aspecto la invención se relaciona con el uso del ionogel de la invención y/o con el uso del dispositivo microfluídico de la invención, para la detección y determinación colorimétrica de la concentración de nitrato y/o de nitrato, en una muestra.

El uso del ionogel y del dispositivo permite en una única unidad llevar a cabo la disposición (por ejemplo por inyección) de la muestra a analizar, las reacciones químicas y la detección y determinación del analito en un único paso. El dispositivo se fabrica a partir de un sustrato de un material flexible, a bajo coste y puede ser fácilmente modificado en función de la estructura deseada. Además su uso presenta otras ventajas entre las que se destaca su fácil almacenamiento, transporte y desechabilidad lo cual resulta muy adecuado para el diagnóstico barato y rápido *in situ* por personal no entrenado, sin necesidad de fuente de energía ni componentes electrónicos, y que puede ser fácilmente interrogado con una cámara fotográfica. Además como se ilustra a continuación en los Ejemplos su uso proporciona alta sensibilidad y fiabilidad.

El dispositivo es de dimensiones muy reducidas, portátil, utiliza pequeños volúmenes de muestra, reduciendo así la cantidad de reactivos y proporcionando una respuesta en un corto periodo de tiempo.

Los puntos de calibración (número de reservorios 2) son variables, y se incluyen en el propio dispositivo. Su manejo es sencillo y requiere una mínima manipulación para la caracterización *in situ* del analito a analizar a partir de muestras reales (por ejemplo, un agua contaminada)

El rango de aplicación puede variarse y seleccionarse en cada caso. Generalmente se determinan los rangos típicos de aguas contaminadas por nitratos que oscilan desde 1 ppb hasta varias ppm.

A continuación se exponen ejemplos ilustrativos de la invención que en ningún caso deben interpretarse como limitantes del ámbito de protección de la invención.

Ejemplos

Para la fabricación de ionogeles se utilizaron: N-isopropilacrilamida, N,N'-metilen-bis(acrilamida), y como fotoiniciador: 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona. Los líquidos iónicos empleados fueron: 1-etil-3-metilimidazolio de sulfato de etilo y trihexiltetradecil-fosfonio dicianamida (Sigma-Aldrich, España).

Reactivo de Griess. El reactivo de Griess es comercial; pero puede prepararse de forma convencional mezclando sulfanilamida, diclorohidrato de naftilendiamina, y ácido fosfórico.

La fuente de luz UV utilizada para la foto-polimerización fue un BONDwand UV-365 nm (Electrolyte Corporation, EE.UU.).

Los espectros de UV-Vis se registraron en un espectrómetro de 900 UV-VIS-NIR de Perkin-Elmer Lambda.

Las fotos fueron tomadas con una cámara modelo Canon EOS 1000D y calibradas mediante el uso de tarjeta de X-Rite (X-Rite Inc., EE.UU.) con el programa Color Checker Passport v. 1.0.2 (X-Rite Inc., EE.UU.) y seguidas por el programa Photoshop CC (Adobe Photoshop CS5 Extended, Adobe Systems Inc., EE.UU.).

Para la caracterización del almacenamiento de reactivo Griess en ionogel, se tomaron espectros de ionogels y con nitrato. Se encontró que el máximo de absorbancia para la reacción de Griess estaba en $\lambda = 532$ nm. Las Figuras 2A y 2B presentan la diferencia entre la absorbancia del ionogel y del ionogel con el nitrato.

Ejemplo 1: Fabricación del dispositivo (ver Figura 1).

El sensor se fabricó a partir de una placa de 1 mm de poli(metil)metacrilato (PMMA) (Goodfellow, Reino Unido) de espesor, que se cortó con un sistema de ablación por láser de CO₂ (Universal Laser Systems, Austria), estableciendo tanto el tamaño del dispositivo (rectángulo) como los diferentes componentes de dicho dispositivo (reservorios) usando diferentes energías del láser.

Cada dispositivo se diseñó con cinco reservorios de calibración 2, un reservorio 3 para calibración del hidrogel en el líquido iónico en contacto con la muestra ("blanco"), un reservorio 6 para depositar la muestra a analizar; un reservorio 4 de medida, y un reservorio 7 de medida y para depositar también la muestra a analizar. El dispositivo presentaba 1 mm de espesor y un tamaño de 22 mm x 10 mm.

Un canal 5 microfluídico que conectaba los reservorios 6 y 4 se fabricó a partir de papel de filtro Whatman Grado con 595 y se dispuso en él una emulsión de Zn metálico (Sigma-Aldrich, España) en agua ultrapura.

Preparación del hidrogel y el ionogel

Se sintetizaron dos hidrogeles en un líquido iónico mediante la mezcla de N-isopropilacrilamida, N,N'-metilen-bis(acrilamida) y un fotoiniciador: (2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona) disueltos en los líquidos iónicos (IL): acetato de sulfato de 1-etil-3-metilimidazolio o dicianamida trihexiltetradecil-fosfonio respectivamente, mediante calentamiento a 45 °C durante 10 min.

5 µl de las mezclas anteriores se depositaron en los reservorios del dispositivo y se conformaron ("drop-casting")

ES 2 665 790 B1

por fotopolimerización *in situ* (1600 mW cm^{-2}) durante 20 y 30 minutos, respectivamente.

Los hidrogeles en IL se lavaron bien con agua ultrapura y etanol, y todos menos el reservorio 3 fueron embebidos con el reactivo de Griess y se dejaron secar durante 12 horas obteniéndose dos ionogels (IO-1 y IO-2).

A los ionogels de los reservorios de calibración 2 se les añadieron $3 \mu\text{L}$ de disoluciones patrón de nitrito preparadas con las siguientes concentraciones en el rango lineal de 0-10 ppm: (ver Figura 3): (0 ppm), (2,5 ppm) (5 ppm), (7,5 ppm) y (10 ppm).

Al cabo de unos minutos de desarrollaron diferentes intensidades de color en cada reservorio de calibración 2, proporcionales en intensidad a cada una de las concentraciones de nitrito.

Se depositó la misma cantidad en microlitros de muestra líquida a analizar en los reservorios 3 y 6 y 7 con una cantidad de nitrato de 2,5 ppm y de nitrito de 2,5 ppm.

La muestra depositada en 6 se movió por capilaridad al reservorio 4 pasando a través del canal microfluídico 5 donde el Zn(0) redujo todo el nitrato presente en la muestra a su paso a nitrito.

Se desarrollaron determinadas intensidades de color en los reservorios 4 y 7 de medida.

A continuación se tomaron fotos del dispositivo con la cámara y se procesaron mediante análisis de imagen.

Se tomaron los parámetros de Luminancia (L), de cromaticidad (C) y el tono (H) mediante PhotoShop CC pixelando cada reservorio y la concentración de nitrato de la muestra se calculó usando un modelo de calibración multivariante (ver Figura 3).

En particular se determinó la concentración de nitrito (determinada en el reservorio 7), la concentración del nitrito más el nitrato reducido a nitrito (determinada en el reservorio 4) y de la diferencia se determinó la concentración de nitrato. Se evaluó también el efecto de la muestra en el hidrogel en el líquido iónico ("blanco") en el reservorio 3.

Los resultados obtenidos mostraron una concentración de $5 \pm 0,5$ ppm de nitrito (en el reservorio 4) que está de acuerdo con la concentración de la muestra de nitrito más la de nitrato, añadida al reservorio 6.

La concentración de nitrito determinada en el reservorio 7 fue de $2,5 \pm 0,5$ ppm.

Por tanto la diferencia entre ambas (reservorio 4 menos reservorio 7) resultó en una concentración de nitrato en la muestra de $2,5 \pm 0,6$ ppm.

La invención no está limitada a las realizaciones concretas que se han descrito sino que abarca también, por ejemplo, las variantes que pueden ser realizadas por el experto medio en la materia dentro de lo que se desprende de las reivindicaciones.

1.- Un ionogel que comprende:

- un hidrogel en un líquido iónico, y
- un sistema reactivo que proporciona un cambio de color por reacción con el nitrito.

2.- Un ionogel de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el hidrogel es una poli(acrilamida).

3.- Un ionogel en el que el hidrogel se obtiene por polimerización de los monómeros: N-isopropilacrilamida y N,N'-metilen bis(acrilamida).

4.- Un ionogel de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3, en el que el sistema reactivo es el reactivo de Griess.

5.- Un ionogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el líquido iónico comprende un catión y un anión en donde el al menos un catión se selecciona de entre: trihexiltetradecil fosfonio, tributil tetradecil fosfonio, tetrabutil fosfonio, triisobutil metil fosfonio, 1-butil-1-metil pirrolidina, 1-etil-3-metilimidazolio, 1-butil-3-metilimidazolio, N-propil N-metil-pirrolidinio, N-butil N-metil-pirrolidinio, trioctil metil amonio, y el al menos un anión se selecciona de entre: tosilato, dodecibencenosulfonato, etil sulfato, bis(trifluorometansulfonil) amida, dicianoamida, tetracianoborato, hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, etil sulfato, tris(penta fluor etil) trifluoro fosfato, cloruro, bromuro, loduro, fluoruro.

6.- Ionogel de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el líquido iónico se selecciona de etil sulfato de 1-etil-3-metilimidazolio y trihexiltetradecil fosfonio dicianoamida.

7.- Un dispositivo microfluídico que comprende

- a)- un sustrato (1) que comprende:
 - b)- dos o más reservorios de calibración (2) separados entre sí que comprenden ionogel,
 - c)- un reservorio 3 de calibración que comprende hidrogel en el líquido iónico,
 - d)- un reservorio (6) para depositar muestra a analizar, conectada a través de un canal microfluídico (5) que comprende un reductor, a un reservorio (4) de medida que comprende ionogel,
 - e)- un reservorio (7) de medida que comprende ionogel, donde se deposita muestra a analizar,
- en donde el ionogel y el hidrogel en el líquido iónico es como se define en las reivindicaciones anteriores.

8.- Un dispositivo microfluídico según la reivindicación 7, en donde los reservorios de calibración 2 separados entre sí son al menos cinco.

9.- Un dispositivo microfluídico según la reivindicación 7 u 8, en donde los reservorios de calibración (2) contiene concentraciones distintas de nitrito y en los que se origina un cambio de color por reacción del sistema reactivo con el nitrito proporcional en intensidad de color a la concentración de nitrito en un rango lineal.

10.- Un dispositivo microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el sustrato (1) es una placa de polimetilmetacrilato.

11.- Un dispositivo microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde el canal microfluídico (5) comprende un papel microfluídico.

12.- Un dispositivo microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde en el canal microfluídico (5) se dispone un agente reductor.

13.- Un dispositivo microfluídico según la reivindicación 12, en donde el agente reductor es Zn(0).

14.- Un procedimiento para fabricar el ionogel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende las etapas siguientes:

A)- preparar una mezcla de los monómeros precursores de un hidrogel y en su caso un iniciador de la polimerización en un líquido iónico;

B)-. polimerizar los monómeros en el líquido iónico para obtener el hidrogel en el líquido iónico, e

C)- incorporar el sistema reactivo, que proporciona un cambio de color por reacción con el nitrito, al hidrogel en el líquido iónico.

15.- Un procedimiento para fabricar el ionogel según la reivindicación anterior en donde los monómeros son N-isopropilacrilamida y N,N'-metilen bis(acrilamida), y se fotopolimerizan con 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona y luz UV.

16.- Un procedimiento para fabricar el ionogel según la reivindicación 14 o 15, en el que el líquido iónico se selecciona de etil sulfato de 1-etil-3-metilimidazolio y trihexiltetradecil fosfonio dicianoamida.

17.- Procedimiento para fabricar el dispositivo microfluídico de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, que comprende:

ES 2 665 790 B1

- proveer sobre un sustrato (1):
- uno o más reservorios de calibración (2) separados entre sí;
- un reservorio (6) para depositar muestra a analizar,
- un reservorio (3) de calibración del hidrogel en el líquido iónico,
- un reservorio (4) de medida,
- un reservorio (7) de medida, para depositar la muestra a analizar,
- situar un canal microfluídico (5) que comprende un reductor entre el reservorio (6) y el reservorio (4), y
- obtener el hidrogel en el líquido *in situ* en los reservorios (2), (3), (4) y (7) y posteriormente el ionogel en los reservorios (2), (4) y (7) por adición del sistema reactivo, según el procedimiento definido en las reivindicaciones 14 a 16.

18.- Un procedimiento según la reivindicación 17, que comprende la etapa adicional de incorporar al ionogel en los reservorios de calibración (2) disoluciones de calibración de distintas concentraciones de nitrito en los que se origina un cambio de color por reacción del sistema reactivo con el nitrito proporcional en intensidad de color a la concentración en un rango lineal.

19.- Método para detectar y determinar colorimétricamente la concentración de nitrito y/o nitrato en una muestra que comprende las etapas de:

- (i)- depositar cantidades iguales de muestra a analizar en los reservorios 3, 6 y 7 del dispositivo microfluídico de la invención,
- (ii)- reducción del nitrato presente en la muestra depositada en el reservorio 6 a nitrito por la acción del agente reductor a su paso a través por el canal microfluídico 5;
- (iii)- determinación por colorimetría de las concentraciones de nitrito en los reservorios de calibración 2 y establecimiento de la recta de calibración;
- (iv)- detección y determinación por colorimetría de la concentración de nitrito presente en la muestra en el reservorio 7, y de la concentración de nitrito en la muestra en el reservorio 4, y
- (v) determinación de la concentración de nitrato en la muestra por diferencia entre la concentración obtenida en el reservorio 7 y la concentración obtenida en el reservorio 4.

20.- Método según la reivindicación 19, en el que la determinación de las concentraciones se realiza analizando el color de los reservorios (2), (4) y (7) de una imagen tomada por medio de una cámara, o video del dispositivo microfluídico 1, y procesando los diferentes reservorios del dispositivo para determinar las concentraciones.

21.- Uso del ionogel y del dispositivo microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 7 a 13 respectivamente para la detección y determinación colorimétrica de la concentración de nitrito y/o de nitrato en una muestra.

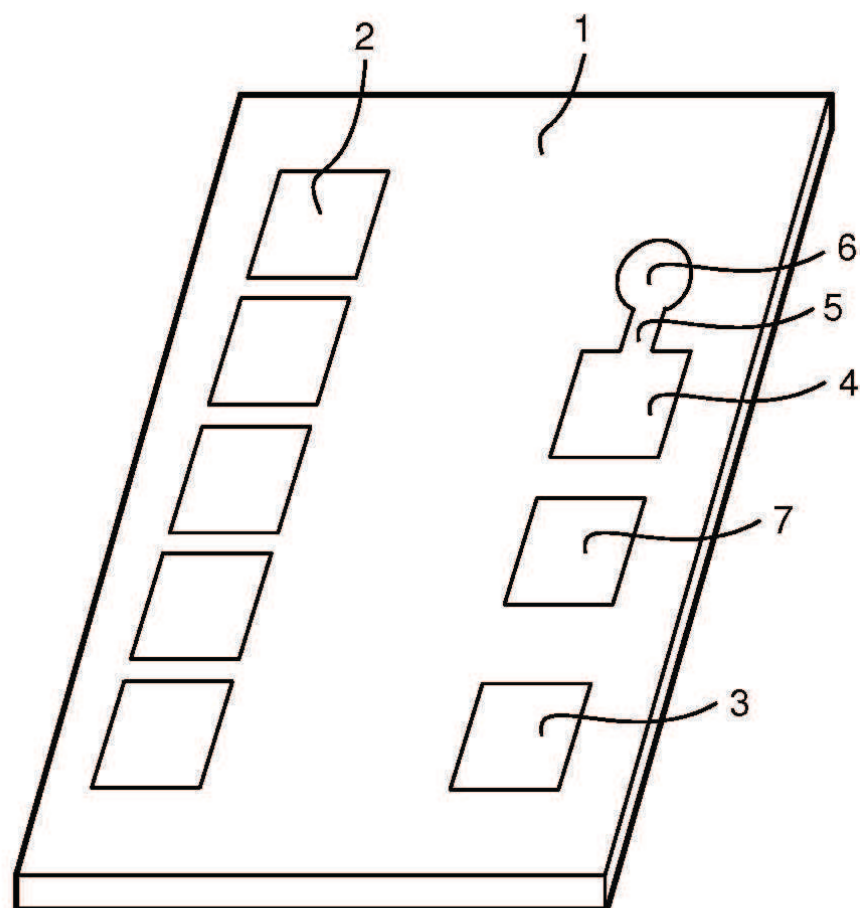


FIG. 1

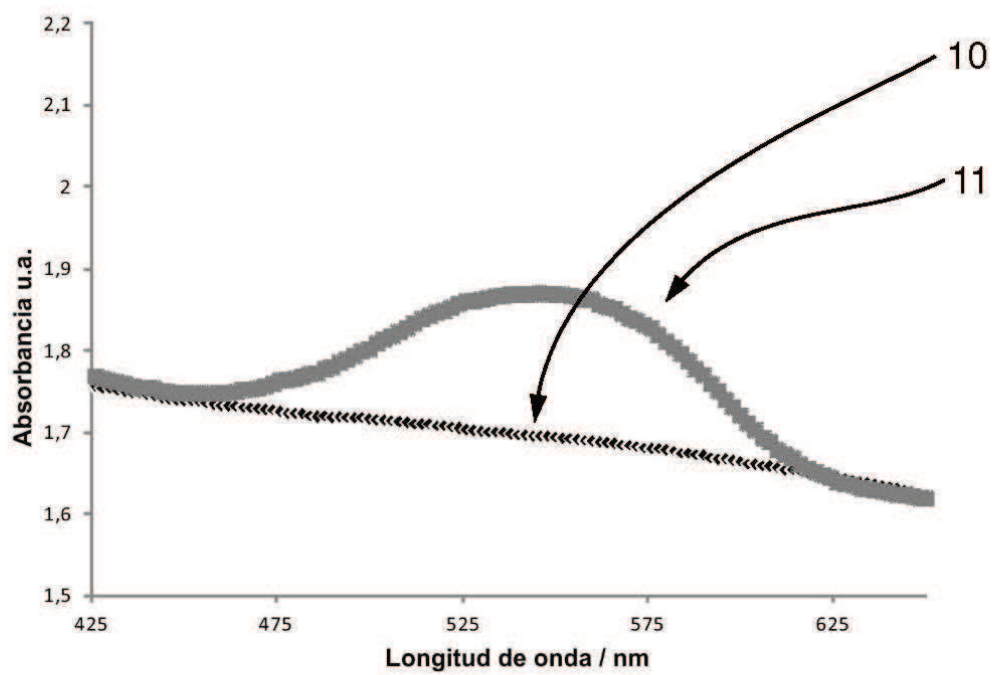


FIG. 2A

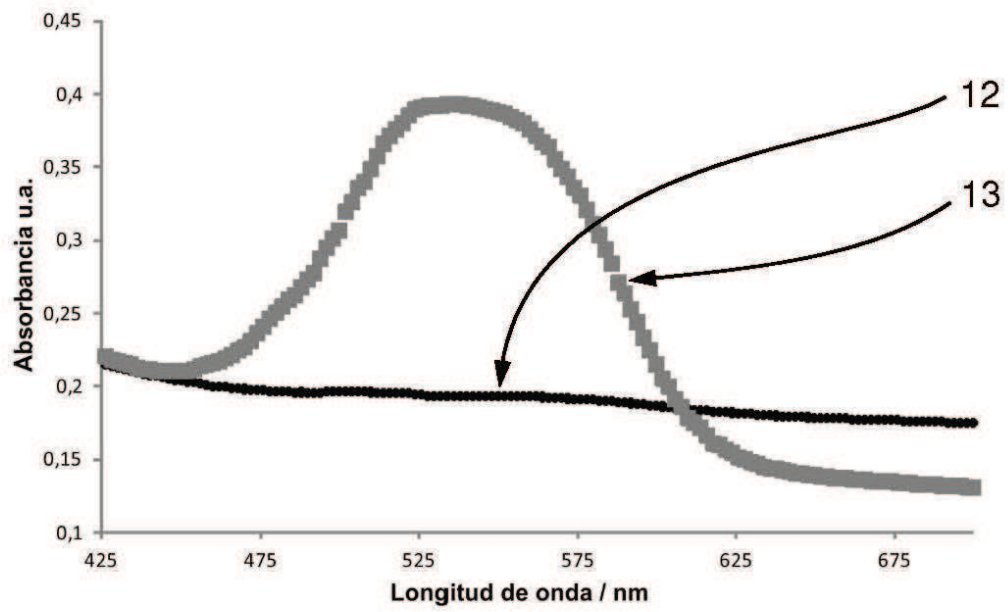


FIG. 2B

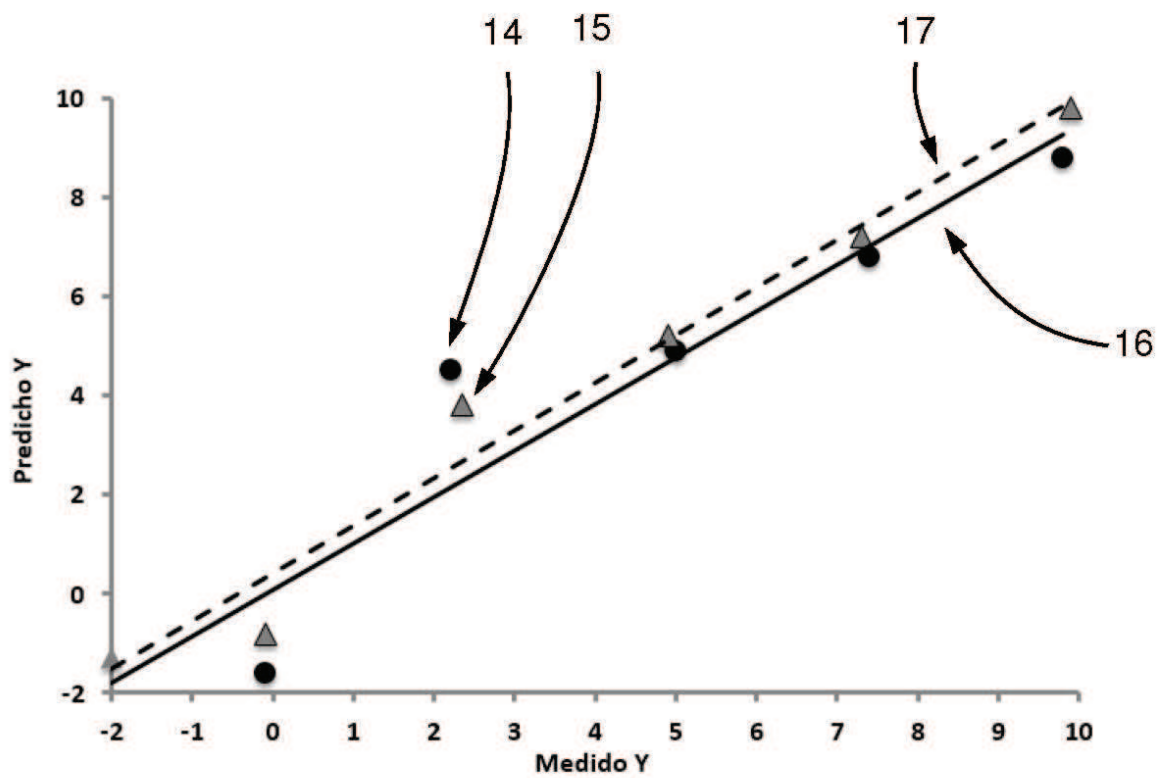


FIG. 3



- ②① N.º solicitud: 201631376
②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.10.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CZUGALA, M. et al. Portable integrated microfluidic analytical platform for the monitoring and detection of nitrite. Talanta 2013, Vol. 116, páginas 997-1004. Ver página 999, figuras 1, 4 y 5.	1-21
A	HAIJUAN ZHANG et al. A sensitive colorimetric method for the determination of nitrite in water supplies, meat and dairy products using ionic liquid-modified methyl red as a colour reagent. Food Chemistry 2014, Vol. 151, páginas 429-434. Ver página 430.	1-21
A	PETR KUBERSK et al. An electrochemical NO ₂ sensor based on ionic liquid: influence of the morphology of the polymer electrolyte on sensor sensitivity. Sensors 2015, Vol. 15, páginas 28421-28434. Ver resumen.	1-21
A	ES 2185462 A1 (UNIV GRANADA) 16/04/2003, Página 5, líneas 27-37.	1-21

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
29.06.2017

Examinador
M. C. Bautista Sanz

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N31/22 (2006.01)**G01N33/18** (2006.01)**C08L33/26** (2006.01)

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

G01N, C08L

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, BD patentes de texto completo, NPL, XPESP, INSPEC, COMPDX, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.06.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	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 se publica.

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CZUGALA, M. et al. Talanta, Vol. 116, páginas 997-1004	2013

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

La invención se refiere a un ionogel y su procedimiento de obtención, a un dispositivo microfluídico y su procedimiento de fabricación así como a un método de determinación colorimétrica de nitrito y/o nitrato mediante el dispositivo microfluídico y el ionogel.

El documento D01, considerado el estado de la técnica más cercano, divulga un ionogel que actúa como válvula en un dispositivo microfluídico para la monitorización y detección de nitrito por un método colorimétrico. El ionogel está formado por una poliacrilamida y un líquido iónico. El dispositivo microfluídico consiste de una placa de polimetilmetacrilato de dimensiones 20x30 mm² que tiene un reservorio para la muestra de agua y otro para el reactivo de Griess colocados en la parte superior de un canal con forma de Y, separados por el ionogel (válvula) de una zona serpenteante donde se produce su mezclado y reacción. El ionogel actúa de válvula que se abre (contracción) mediante luz blanca LED permitiendo el paso de la muestra de agua de la que se quiere determinar la cantidad de nitrito y del reactivo de Griess a la zona de mezclado donde se produce su reacción. Ver página 999 y figuras 1, 4 y 5.

La diferencia entre el documento D01 y el objeto de la reivindicación 1 es que el ionogel de la invención contiene el reactivo para la determinación del nitrito (Griess) mientras que en dicho documento únicamente están en contacto cuando el reactivo llega al lugar de paso de la válvula (ionogel). Por lo tanto, no resultaría obvio para un experto en la materia la preparación de un ionogel como el recogido en la reivindicación 1, donde el compuesto que reacciona con el nitrito está embebido en el hidrogel con el líquido iónico, proporcionando así un medio de almacenamiento estable del reactivo, así como un medio de reacción con la muestra a analizar.

Por lo tanto, el objeto de la reivindicación 1 es nuevo y tiene actividad inventiva (artículos 6.1. y 8.1. Ley 11/1986).

Por los mismos motivos, las reivindicaciones independientes 7, 14, 17, 19 y 21 relativas al dispositivo microfluídico, al procedimiento para fabricar el ionogel, al procedimiento para fabricar el dispositivo, al método para detectar y determinar colorimétricamente la concentración de nitrito y/o nitrato y al uso del ionogel para tal fin, son nuevas y con actividad inventiva.

En conclusión, la invención definida en las reivindicaciones 1 a 21 cumplen con el requisito de novedad y actividad inventiva (artículos 6.1. y 8.1. Ley 11/1986).