

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 011 658**

21 Número de solicitud: 202330838

51 Int. Cl.:

G01N 27/407 (2006.01)
G01N 27/49 (2006.01)
G01N 33/14 (2006.01)
H01M 4/02 (2006.01)
H01M 4/133 (2010.01)
H01M 4/36 (2006.01)
H01M 4/96 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.10.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.04.2025

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE BURGOS (100.00%)
C/ Hospital del Rey s/n
09001 Burgos (Burgos) ES

72 Inventor/es:

PORTUGAL GÓMEZ, Paula;
DOMÍNGUEZ RENEDO, Olga y
ALONSO LOMILLO, M. Asunción

54 Título: **SENSOR DE DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE MERCAPTANOS Y 4-ETILFENOL EN VINOS Y PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE LOS MISMOS**

57 Resumen:

Sensor de detección simultánea de mercaptanos y 4-etilfenol en vinos y procedimiento de determinación de los mismos.

La invención proporciona un sensor de detección simultánea de mercaptanos y 4-etilfenol en vinos consistente en un electrodo serigrafiado de carbono dual donde la superficie activa de uno de los electrodos de trabajo está activada con fullereno C₆₀ y la superficie activa del otro electrodo de trabajo está activada con ftalocianina de cobalto, recubriéndose los cuatro electrodos con una película delgada de un polímero gelificado consistente en una mezcla de fluoruro de polivinilideno (PVDF), 1-metil-2-pirrolidona (NMP) y hexafluorofosfato de 1-metil-3-octilimidazolio ([OMIM]PF₆), como electrolito de soporte sólido.

ES 3 011 658 A1

DESCRIPCIÓN

SENSOR DE DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE MERCAPTANOS Y 4-ETILFENOL EN VINOS Y PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE LOS MISMOS

5

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se engloba en el campo de la electroquímica aplicada al análisis químico, en particular en el análisis de detección simultánea de mercaptanos y 4-etilfenol en fase gaseosa presentes en los vinos.

La presente invención se refiere a un sensor de detección simultánea de mercaptanos y 4-etilfenol en vinos, así como a un procedimiento de detección amperométrico de ambos compuestos simultáneamente, en fase gaseosa, en vinos mediante el uso de dicho sensor.

Más concretamente, en un primer aspecto, la invención proporciona un sensor de detección simultánea de mercaptanos y 4-etilfenol en vinos consistente en un electrodo serigrafado de carbono dual modificado con ftalocianina de cobalto (CoPh) y fullereno (C₆₀). De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona un método de tipo "espacio de cabeza" ("Headspace") para la detección de mercaptanos y 4-etilfenol en vinos mediante dicho sensor.

El sensor y el método de la invención permiten detectar los defectos organolépticos asociados con la presencia de mercaptanos y 4-etilfenoles en vinos de forma sencilla y evitando el contacto directo del sensor con las muestras a medir, facilitando la realización de análisis rutinarios e *in situ*, con el objetivo de llevar a cabo diagnósticos precoces de carácter preventivo con el mínimo coste posible.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la industria agroalimentaria en general, y en el campo de la enología en particular, existe un creciente interés por la elaboración de productos de elevada calidad. La búsqueda constante de innovación en los procesos productivos es de vital importancia

en una industria que pretende consolidar su excelente reputación internacional y mejorar aún más sus perspectivas. El sector vitivinícola es estratégico para la Unión Europea, ya que cuenta con grandes países productores como Italia, Francia o España. Según datos del Ministerio de Agricultura, el valor de la producción vinícola en 5 2013 fue de 2.143 millones de euros, estando la mitad de la producción dedicada a la exportación con un balance positivo de unos 2.600 millones de euros para el sector. La mano de obra que genera el cultivo del viñedo se aproxima a los 18 millones de jornales. Es, por tanto, un sector de extraordinaria relevancia por su importancia en términos económicos, pero también sociales y medioambientales, así como por la 10 importancia del vino como imagen del país en el exterior.

El mercado actual del vino exige la obtención de productos de composición armónica, carentes de defectos organolépticos, que permita conservar su sabor y los aromas positivos del afrutado y del carácter varietal. Reacciones físicas y químicas, así como 15 la captación de sustancias extrañas, pueden ocasionar defectos del vino, como gustos azufrados, defectos metálicos, sabor a tanino y corcho, etc. Generalmente, se pueden atenuar e incluso anular los defectos de un vino dentro de ciertos límites sometiéndolo a los tratamientos idóneos. Por tanto, la identificación rápida y precisa de estos defectos resulta muy útil para corregir el problema antes de que se convierta en 20 importante e irreversible, con la consecuente repercusión negativa en la reputación y economía de la bodega productora. Por tanto, es de vital importancia la realización de controles exhaustivos del estado sanitario de la uva, de las etapas de la vinificación y del producto final para obtener vinos sin defectos.

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

Por ejemplo, la existencia de una tasa elevada de fenoles volátiles es la causa de la enfermedad del vino conocida como sudor de caballo. Los fenoles volátiles constituyen 30 un grupo de sustancias muy variadas, cuyos muchos representantes (por ej., vainillina, eugenol, siringaldehído) influyen positivamente sobre el aroma del vino. En cambio, los etilfenoles en el vino desarrollan una acción ambivalente. Mientras que en concentraciones bajas ejercen un efecto favorable sobre el aroma del vino (ahumado, especiado a clavo, a piel curtida), cuando sobrepasan umbrales críticos de

concentración originan desviaciones del aroma desagradables, de penetrante olor animal. Sustancias características responsables de esta enfermedad del vino son el 4-etilfenol y el 4-etilguayacol, cuando el contenido de 4-etilguayacol sobrepasa la cifra de 70 µg/l o cuando la suma de contenidos de 4-etilfenol y el 4-etilguayacol supera los 5 425 µg/l. Este tipo de compuestos aparecen en los vinos contaminados por la levadura *Brettanomyces*, a partir de la transformación enzimática de los ácidos hidroxicinámicos de la uva (R. Eder, Defectos del vino: reconocimiento, prevención, corrección, Editorial Acribia, 2006; A. Morata, R. Vejarano, G. Ridolfi, S. Benito, F. Palomero, C. Uthurry, W. Tesfaye, C. Gonzalez, J.A. Suarez-Lepe, Reduction of 4-ethylphenol production in 10 red wines using HCDC+ yeasts and cinnamyl esterases, Enzyme Microb. Technol. 52 (2013) 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.11.001>).

Las sustancias azufradas, formadas principalmente durante el proceso de fermentación, son también componentes fijos del aroma típico de cada vino. Cuando 15 las concentraciones de las sustancias son normales, el consumidor percibe la peculiar y deseada impresión de aroma y sabor. Sin embargo, cuando se producen algunos componentes azufrados del aroma en cantidad superior a la ordinaria, se originan alteraciones de olor y sabor que son rechazadas de forma decidida por el consumidor. El defecto del vino causado por gusto azufrado, en sus múltiples formas, es un 20 concepto bien conocido por cosecheros y consumidores de vino. El repertorio va desde olor a huevos podridos, a goma quemada y a espárragos cocidos hasta a ajo, cebolla o berza. Debido a la creciente sensibilidad del público consumidor, los olores anómalos a compuestos azufrados constituyen la causa más frecuente de reclamaciones. El gusto azufrado puede clasificarse por los distintos momentos de 25 aparición del defecto (fermentación, almacenado, botellas) o por el grupo de sustancias olorosas que provocan este gusto, esencialmente sulfuros y tioles, cuando su concentración sobrepasa los 100 µg/l. Si no se detecta y elimina oportunamente el H₂S producido, que es esencial en la etapa de fermentación, puede reaccionar con etanol o etanal produciendo tioles, que aportan el defecto olfativo que recuerda en 30 mayor o menor medida a repollo o cebolla (C. Flanzy, Enología: fundamentos científicos y tecnológicos, 2nd ed., A. Madrid Vicente: Mundi-Prensa, Madrid, 2003; A. Belancic Majcenovic, et al., Synthesis and Stable Isotope Dilution Assay of Ethanethiol and Diethyl Disulfide in Wine Using Solid Phase Microextraction. Effect of Aging on Their Levels in Wine, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 6653–6658). Por otra parte, el

dimetil sulfuro participa en el buqué de madurez y en el aroma de recolección tardía, pero pueden ser reducidos por levaduras a tioles. Durante la fermentación se producen también ésteres de ácido tioacético, con umbrales olfatorios más elevados (200-300 µg/l) que la concentración en el vino (2-20 µg/l). Por hidrólisis se forman a partir de ellos tioles con umbrales más bajos. La formación de trazas de estos compuestos se considera solamente como una pequeña anomalía en la bioquímica de la fermentación, pero su impacto sensorial es notable y perjudicial, puesto que pueden alterar el aroma de los vinos embotellados. Por ello, su detección es de gran interés con el objetivo de realizar diagnósticos precoces de carácter preventivo con el mínimo coste posible.

El análisis de 4-etilfenol y mercaptanos generalmente se ha abordado mediante técnicas cromatográficas que precisan de pretratamientos de preconcentración o extracción, incluida la extracción en fase sólida (A. Belancic Majcenovic, et al., Synthesis and Stable Isotope Dilution Assay of Ethanethiol and Diethyl Disulfide in Wine Using Solid Phase Microextraction. Effect of Aging on Their Levels in Wine, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 6653–6658; L. Mateo-Vivaracho, et al., Selective preconcentration of volatile mercaptans in small SPE cartridges: Quantitative determination of trace odor-active polyfunctional mercaptans in wine, J. Sep. Sci. 32 (2009) 3845–3853), extracción líquido-líquido (C. Pizarro, et al., Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the simultaneous determination of the main compounds causing cork taint and Brett character in wines using gas chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1218 (2011) 1576–1584), extracción de espacio de cabeza (Y. Fang, et al. Sensitive quantification of sulfur compounds in wine by headspace solid-phase microextraction technique, J. Chromatogr. A. 1080 (2005) 177–185) o extracción por sorción con barra de agitación (C. Herrera, et al., Development of a stir bar sorptive extraction method for the determination of volatile compounds in orange juices, J. Sep. Sci. 39 (2016) 3586–3593).

Las técnicas electroquímicas, que también se caracterizan por alcanzar buenas capacidades de detección, son más versátiles para este fin, teniendo en cuenta el coste considerablemente menor del equipo electroquímico y su tamaño compacto, ideal para análisis *in situ*. En este contexto, se han registrado las corrientes

voltamperométricas de 4-etilfenol y etanotiol, representando a los mercaptanos, en electrodos de gota colgante de mercurio (A. Guarda, J. V Maciel, B.A. Wiethan, A. Schneider, P.C. do Nascimento, D. Dias, Simultaneous Determination of Ethanethiol, Inorganic Sulfide, and Sulfite in Wines by Cathodic Stripping Voltammetry, Food Anal. Methods. 10 (2017) 837–844. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0640-1>), de grafito-epoxi (A. González-Calabuig, M. del Valle, Voltammetric electronic tongue to identify Brett character in wines. On-site quantification of its ethylphenol metabolites, Talanta. 179 (2018) 70–74), de carbono vítreo a base de polipirrol impreso molecularmente (M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, Molecularly imprinted polypyrrole based electrochemical sensor for selective determination of ethanethiol, Talanta. 253 (2023) 123936; O. Domínguez-Renedo, A.M.M. Navarro-Cuñado, V. Arnáiz-Lozano, M.A.A. Alonso-Lomillo, Molecularly imprinted polypyrrole based electrochemical sensor for selective determination of 4-ethylphenol, Talanta. 207 (2020) 120351) o en electrodos de carbono serigrafados (SPCE) modificados con nanopartículas de oro (M.A. Alonso-Lomillo, S. López-Gil, F.J. del C. García, O. Domínguez-Renedo, F. Javier del Campo García, O. Domínguez-Renedo, O. del Campo García, F. Javier Domínguez-Renedo, Electrochemical Detection of Mercaptans in Wine Using Gold Nanoparticle-Modified Carbon Electrodes, J. Electrochem. Soc. 168 (2021) 086509), con fullereno activado (A_{C60}) (P. Portugal-Gómez, M. Asunción Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, 4-ethylphenol detection in wine by fullerene modified screen-printed carbon electrodes, Microchem. J. 180 (2022) 107599) y con ftalocianina de cobalto (II) (CoPh) (P. Portugal-Gómez, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, Headspace detection of ethanethiol in wine by cobalt phthalocyanine modified screen-printed carbon electrodes, Talanta. 260 (2023) 124583).

25

En una matriz tan compleja como el vino, no solo los 4-etilfenoles y los mercaptanos son especies activas redox clave, sino también otros fenoles, los sulfitos, el ácido ascórbico, el glutatión, el etanol, el oxígeno, las quinonas, los iones metálicos, etc. (P.A. Kilmartin, Electrochemistry applied to the analysis of wine: A mini-review, Electrochem. Commun. 67 (2016) 39–42). Los sensores de gases electroquímicos, que se basan en la detección de electrones transferidos durante la oxidación o reducción de analitos volátiles en el electrodo de trabajo, son bastante atractivos para este objetivo, ya que se reduce el número de especies que pueden interferir en el análisis. Además, estos sensores suponen una mejora en las prácticas en el análisis

30

del vino, ya que la muestra no se altera puesto que el sensor no entra en contacto directo con ella. Los electrodos de carbono serigrafados modificados con A_{C60} ($A_{C60}/SPCE$) y CoPh ya han destacado por su capacidad de cuantificar 4-etilfenol y etanotiol, utilizando un procedimiento de dos pasos en el que las medidas
5 voltamperométricas se llevan a cabo en disolución después de un proceso de incubación en fase gaseosa o directamente en el espacio de cabeza de una celda sellada, respectivamente, pero aún no simultáneamente en muestras de vino.

Los principales inconvenientes de los sensores ya conocidos están relacionados con
10 su vida útil y tiempo de almacenamiento, limitado debido a la evaporación del electrolito no reactivo en el que se los electrodos deben estar sumergidos (electrolito de soporte), que fue precargado por adsorción en el dispositivo. Como se ha descrito en la bibliografía, el electrolito de soporte acuoso típico se puede reemplazar por materiales de baja volatilidad, como Nafion (P.E. Hayes, J.D. Glennon, A. Buzid, J.H.T.
15 Luong, Simultaneous Electroanalysis of Guaiacol and its Analogs Based on their Differential Complexation with α -Cyclodextrin on Nafion Modified Boron-doped Diamond Electrode, *Electroanalysis*. 32 (2020) 119–127) o líquidos iónicos a temperatura ambiente (RTILs) (L. Xiong, R.G. Compton, Amperometric Gas detection: A Review, *Int. J. Electrochem. Sci.* 9 (2014) 7152–7181. www.electrochemsci.org
20 (accessed March 5, 2022); A. Rehman, X. Zeng, Methods and approaches of utilizing ionic liquids as gas sensing materials, *RSC Advances*. 5 (2015)58371-58392).

Hasta ahora se han adoptado diversos enfoques para la implementación de electrolitos de soporte sólidos en dispositivos electroquímicos, partiendo del uso directo de Nafion,
25 RTIL o mezclas de RTIL/etanol vertido sobre la superficie del sensor y secado a 60 °C durante 1 día hasta mezclas de RTIL, fluoruro de polivinilideno (PVDF) y disolventes orgánicos como 1-metil-2-pirrolidona (NMP) o N,N-dimetilformamida (DMF) (P. Kuberský, J. Altšmíd, A. Hamáček, S. Nešpůrek, O. Zmeškal, An Electrochemical NO_2 Sensor Based on Ionic Liquid: Influence of the Morphology of the Polymer Electrolyte
30 on Sensor Sensitivity, *Sensors*. 15 (2015) 28421–28434; J. Gao, Z. Hua, S. Xu, H. Wan, Z. Zhi, X. Chen, S. Fan, Amperometric gas sensors based on screen printed electrodes with porous ceramic substrates, *Sensors Actuators B Chem.* 342 (2021) 130045).

En este contexto, el uso de sensores basados en CoPh y AC₆₀ sería ventajoso para la detección simultánea de mercaptanos y 4-etilfenoles en vinos, ya que estos materiales electrocatalíticos permiten monitorizar selectivamente los mercaptanos y 4-etilfenoles en vinos, tal y como se ha descrito previamente en la bibliografía. Además, la
5 realización de las medidas en espacio de cabeza evita el contacto directo de los dispositivos electroquímicos con la muestra, lo que es sin duda de gran importancia en el análisis en continuo durante las distintas etapas de la vinificación, puesto que no se altera el producto. Asimismo, el número de especies interferentes se ve considerablemente reducido, puesto que únicamente las especies volátiles pueden
10 ejercer algún tipo de influencia en la señal analítica.

Sin embargo, la determinación electroquímica simultánea de mercaptanos y 4-etilfenoles en vinos directamente en fase gaseosa no tiene precedentes en la bibliografía.

15

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención queda establecida y caracterizada en las reivindicaciones independientes, mientras que las reivindicaciones dependientes describen otras
20 características de la misma.

De acuerdo con el primer aspecto de la invención, es objeto de la misma proporcionar un sensor de detección simultánea de mercaptanos y 4-etilfenol en vinos consistente en un electrodo serigrafiado de carbono dual modificado con CoPh y AC₆₀, en concreto
25 para detectar los defectos organolépticos asociados con la presencia de estos compuestos en vinos, de forma sencilla y evitando el contacto directo del sensor con las muestras a medir, facilitando la realización de análisis rutinarios e *in situ*, con el objetivo de llevar a cabo diagnósticos precoces de carácter preventivo con el mínimo coste posible.

30

De acuerdo con el segundo aspecto, la invención proporciona un método amperométrico de tipo “espacio de cabeza” (“Headspace”) para la detección simultánea de mercaptanos y 4-etilfenol en vinos mediante dicho sensor, evitando el contacto directo de los dispositivos electroquímicos con la muestra, lo que puede ser

sin duda de gran importancia en el análisis en continuo durante las distintas etapas de la vinificación, puesto que no se altera el producto. Asimismo, el número de especies interferentes se ve considerablemente reducido, puesto que únicamente las especies volátiles pueden ejercer algún tipo de influencia en la señal analítica.

5

EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un sensor de detección simultánea de mercaptanos y 4-etilfenol en vinos consistente en un electrodo dual serigrafiado de carbono del tipo constituido por dos electrodos de trabajo, un electrodo 10 auxiliar o contraelectrodo, los tres de carbono, y un electrodo de referencia de plata, donde la superficie activa de uno de los electrodos de trabajo está activada con AC_{60} y la superficie activa del otro electrodo de trabajo está activada con CoPh con el fin de obtener un sensor sensible y selectivo de 4-etilfenol y etanotiol, recubriéndose los 15 cuatro electrodos con una película delgada de un polímero gelificado consistente en una mezcla de PVDF, NMP y hexafluorofosfato de 1-metil-3-octilimidazolio ([OMIM]PF₆), como electrolito de soporte.

Los electrodos de carbono serigrafiados duales, constituidos por dos electrodos de 20 trabajo, un electrodo auxiliar o contraelectrodo, los tres de carbono, y un electrodo de referencia de plata, no están particularmente limitados, pudiendo emplearse, por ejemplo, el electrodo dual (ED-D2PE-C10), comercializado por MicruX Technologies (Gijón, Asturias).

25 La superficie activa modificada con fullereno C_{60} de uno de los electrodos de trabajo está modificada con 40 μ l de una disolución de fullereno C_{60} a una concentración de 0,1 mg/ml en diclorometano, disponiéndose la disolución sobre dicha superficie activa gota a gota y dejándola secar a temperatura ambiente, de acuerdo con P. Portugal-Gómez, et al., 4-ethyphenol detection in wine by fullerene modified screen-printed 30 carbon electrodes, Microchem. J. 180 (2022). Dado que es conocido que estas capas inmovilizadas de C_{60} presentan una actividad electroquímica baja, sobre esta superficie se depositan 50 μ l de una disolución de KOH 1,0 M y mediante voltamperometría cíclica entre 0 y -1.5 V a 10 mV/s. Debido a la reducción parcial que se produce en presencia de los iones potasio, el electrodo $AC_{60}/SPCE_1$ se aumenta su

conductividad (A. Szucs, et al., Fullerene film electrodes in aqueous solutions Part 1. Preparation and electrochemical characterization, J. Electroanal. Chem. 397 (1995) 191–203; R.N. Goyal, et al., Fullerene-C60-modified electrode as a sensitive voltammetric sensor for detection of nandrolone-An anabolic steroid used in doping, 5 Anal. Chim. Acta. 597 (2007) 82–89; R.N. Goyal, et al., Electrochemical sensor for the determination of dopamine in presence of high concentration of ascorbic acid using a fullerene-C60 coated gold electrode, Electroanalysis. 20 (2008) 757–764).

10 La superficie del otro electrodo de trabajo está modificada con una disolución de CoPh en etanol, preferentemente con 10 μ l de una disolución al 5,0% (peso/volumen), la cual se deposita sobre dicha superficie y se deja secar a temperatura ambiente (CoPh/SPCE₂).

De acuerdo con el segundo aspecto, es también objeto de la invención un método tipo 15 “espacio de cabeza” (“Headspace”) para la detección amperométrica simultánea de mercaptanos y 4-etilfenol en vinos mediante el sensor aquí descrito.

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

- 20 i. Disponer en una celda sellada que contiene 1 ml de tampón Britton Robinson, pH 5,0, el sensor antes descrito
- ii. Colocar el electrodo serigrafiado dual modificado con la membrana gelificada construida a partir del RTIL [OMIM]PF₆ en la parte superior de la celda, evitando en todo momento el contacto con la disolución de Britton Robinson.
- 25 iii. Aplicar un potencial de +0,86 V al electrodo de trabajo AC₆₀/SPCE₁ y de +0,40 V al electrodo de trabajo CoPh/SPCE₂, hasta registrar una corriente constante;
- iv. Introducir en la celda sellada un volumen de la muestra de vino a analizar;
- v. Registrar el incremento de corriente debido al proceso de oxidación que tiene lugar en la superficie de ambos electrodos de trabajo en el espacio de cabeza de la celda,
- 30 vi. Correlacionar la corriente registrada en las superficies de trabajo del sensor con la concentración de mercaptanos y 4-etilfenol en la celda.

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

En las figuras:

Figura 1: Mediciones amperométricas del espacio de cabeza realizadas para la detección simultánea de 4-etilfenol y etanotiol en tampón Britton Robinson pH 5 usando sensor de la invención dual AC₆₀/SPCE₁ (potencial aplicado, +0,86 V) y CoPh/SPCE₂ (potencial aplicado, +0,40 V) modificado con un electrolito polimérico gelificado a base de [OMIM]PF₆. Cada adición corresponde a 10 µl de una disolución de 5 mg/l de 4-etilfenol y, a partir de los 1000 s, a 10 µl de una disolución de 5 mg/l de etanotiol.

10

Figura 2: Mediciones amperométricas del espacio de cabeza realizadas para la detección simultánea de 4-etilfenol y etanotiol en tampón Britton Robinson pH 5 usando sensor de la invención dual AC₆₀/SPCE₁ (potencial aplicado, +0,86 V) y CoPh/SPCE₂ (potencial aplicado, +0,40 V) modificado con un electrolito polimérico gelificado a base de [OMIM]PF₆. Cada adición corresponde a 50 µl de una disolución 500 µg/l de 4-etilfenol y de etanotiol.

15

Ejemplos

20 En los siguientes ejemplos, todos los reactivos utilizados fueron de grado reactivo analítico. Todas las disoluciones se prepararon en agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Se emplearon disoluciones tampón KCl 0,1 M (Merck, Darmstadt, Alemania) y Britton Robinson, que contienen ácido fosfórico 0,04 M (Panreac, Barcelona, España), ácido acético 0,04 M (VWR Chemical, Fontenay, Francia) y ácido bórico 0,04

25 M (Panreac, Barcelona, España). Se utilizaron disoluciones de NaOH 1 M (Ecros, Barcelona, España) para ajustar el valor de pH.

Se prepararon disoluciones estándar de 4-etilfenol (Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, USA) y etanotiol (VWR Chemicals, Rosny-sous-Bois, Francia)

30 disolviendo la cantidad adecuada de cada reactivo en agua Milli-Q.

Las disoluciones de fullereno C₆₀ (Acros Organics, Geel, Bélgica) y CoPh se prepararon utilizando diclorometano (Panreac, Barcelona, España) y etanol (VWR Chemicals, Rosny-sous-Bois, Francia) respectivamente. Se utilizó una disolución de

hidróxido potásico 1,0 M (Carlo Erba, Val de Reuil, Francia) para activar el fullereno C_{60} .

5 Para la generación del electrolito de soporte sólido se emplearon [OMIM]PF₆ (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA), PVDF (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y NMP (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA).

10 Las mediciones electroquímicas se llevaron a cabo utilizando un potenciostato PalmSens4 (Palmsens BV, Houten, Países Bajos) y electrodos serigrafiados de carbono duales (ED-D2PE-C, MicruX Technologies, Gijón, España) presentando un electrodo de referencia, un electrodo auxiliar y dos electrodos de trabajo.

Ejemplo 1: Preparación del SPCE dual modificado

15 Las superficies de los dos electrodos de trabajo se modificaron individualmente con fullereno C_{60} (AC₆₀/SPCE₁) y CoPh (CoPh/SPCE₂) con el fin de obtener un sensor selectivo tanto para 4-etilfenol como para etanotiol.

20 La superficie de trabajo de un electrodo de trabajo se modificó con 40 μ l de una disolución de fullereno C_{60} , 0,1 mg/ml en diclorometano, y se secó a temperatura ambiente. Dada la baja actividad electroquímica del fullereno C_{60} en disolución acuosa, se realizó un paso de activación de la superficie de este electrodo para mejorar su capacidad de transferencia de electrones. Para ello, se vertieron 50 μ l de una disolución de KOH 1 M sobre el sensor y se registró un voltamperograma cíclico entre
25 0 y -1.5 V a 10 mV/s. De esta forma el electrodo modificado parcialmente reducido (AC₆₀/SPCE₁) mejoró su conductividad.

30 La modificación del segundo electrodo de trabajo con CoPh se realizó mediante "drop-casting". Se colocó un volumen de 10 μ l de una disolución de CoPh al 5,0 % en etanol sobre la superficie del electrodo y se dejó secar a temperatura ambiente (CoPh/SPCE₂).

Ejemplo 2: Revestimiento de los electrodos de trabajo modificados

Los cuatro electrodos deben sumergirse en un electrolito de soporte para completar la celda electroquímica. El electrolito de polímero gelificado se preparó dispersando
5 PVDF en NMP en una proporción en masa 1:10 y agitando a 500 rpm durante 10 min a 60 °C. Luego, esta mezcla se añadió a [OMIM]PF₆ en una proporción en masa 1:2, agitando hasta homogeneización durante unos minutos a 60 °C. Finalmente, 3 µl de esta mezcla gelificada se depositaron sobre los cuatro electrodos, formando una película delgada y reproducible. Los dispositivos obtenidos se mantuvieron a
10 temperatura ambiente hasta su uso.

Ejemplo 3: Mediciones electroquímicas

Los SPCE duales modificados se dispusieron en la parte superior de una celda sellada
15 (espacio de cabeza) que contenía 1 ml de tampón Britton Robinson pH 5,0, excepto para el proceso de optimización, evitando el contacto. La celda, no disponible comercialmente, se fabricó empleando una resina UV para impresoras 3D con un orificio lateral que permite la introducción de muestras. Las medidas amperométricas se realizaron aplicando un potencial de +0,86 V a AC₆₀/SPCE₁ y de +0,40 V a
20 CoPh/SPCE₂, excepto para el proceso de optimización, empleando un potenciómetro PalmSens. Una vez que se alcanzaron corrientes constantes, se agregó a la celda un volumen determinado de una disolución de analito correspondiente (mezcla de etanotiol y 4-etilfenol o vino), registrando el incremento correspondiente en la corriente registrada debido al proceso de oxidación que tiene lugar en la superficie de ambos
25 electrodos.

Se llevó a cabo una cuantificación amperométrica simultánea en el espacio de cabeza empleando el sensor dual antes descrito. La cuidadosa elección de la composición del electrolito de soporte debería mejorar el rendimiento de este sensor en términos de
30 estabilidad operativa y de almacenamiento, por lo que se estudiaron materiales de baja volatilidad para reemplazar los electrolitos de soporte acuosos típicos. Se prepararon diferentes membranas combinando diferentes proporciones de RTIL, PVDF como matriz polimérica y NMP como disolvente, agitando hasta obtener una mezcla homogénea que se dejó secar a 100 °C durante 60 min. Se observó que cuanto mayor

era la cantidad de polímero empleado en la mezcla, peor era la adhesión de la membrana al sensor. En muchas ocasiones, esta membrana incluso acabó cayendo a la disolución. En los casos en que la membrana estaba bien adherida a la superficie, no se registraron señales de oxidación cuantificables para ambos analitos, lo que se atribuyó a una escasa difusión de los analitos gaseosos hacia los electrodos de trabajo. Es sabido que el tratamiento térmico de electrolitos de polímeros sólidos basados en PVDF influye en la sensibilidad, ya que una mayor temperatura de cristalización resulta en una menor porosidad (P. Kuberský, J. Altšmíd, A. Hamáček, S. Nešpůrek, O. Zmeškal, An Electrochemical NO₂ Sensor Based on Ionic Liquid: Influence of the Morphology of the Polymer Electrolyte on Sensor Sensitivity, *Sensors*. 15 (2015) 28421–28434; J. Lee, G. Hussain, N. López-Salas, D.R. MacFarlane, D.S. Silvester, Thin films of poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene)-ionic liquid mixtures as amperometric gas sensing materials for oxygen and ammonia, *Analyst*. 145 (2020) 1915–1924; S. Ramesh, C.W. Liew, K. Ramesh, Evaluation and investigation on the effect of ionic liquid onto PMMA-PVC gel polymer blend electrolytes, *J. Non. Cryst. Solids*. 357 (2011) 2132–2138).

Así, se construyó un electrolito de polímero gelificado basado en el RTIL [OMIM]PF₆ utilizando una concentración más baja de PVDF y una temperatura de secado inferior, según el procedimiento antes descrito. Para obtener la mejor señal para la detección simultánea de ambos analitos, se estudiaron diferentes valores de pH en el rango de 2 a 5 y potenciales aplicados de +0,1 V a +1,0 V. Los valores óptimos de las variables experimentales que condujeron al registro de máximas intensidades de oxidación fueron tampón Britton Robinson de pH 5 y potencial aplicado de +0,86 V para AC₆₀-SPCE₁ y +0,4 V para CoPh-SPCE₂ (Fig. 1). En estas condiciones, se registraron mayores corrientes de oxidación con concentraciones crecientes de etanotiol en CoPh-SPCE₂, mientras que AC₆₀-SPCE₁ solo pudo registrar el efecto de la adición de la disolución en la celda electroquímica. Por el contrario, se produjeron corrientes de oxidación crecientes con concentraciones crecientes de 4-etilfenol en AC₆₀-SPCE₁, pero no se registraron señales en CoPh-SPCE₂.

Se construyeron diferentes curvas de calibración para estudiar el desarrollo de este proceso en términos de precisión y capacidad de detección bajo estas condiciones óptimas, añadiendo 4-etilfenol y etanotiol simultáneamente a la celda electroquímica

en una concentración que oscilaba entre 23,8 y 83,3 $\mu\text{g/l}$ (ver Figura 2). En el caso de la reproducibilidad, las pendientes de las curvas de calibración registradas utilizando diferentes SPCE duales modificados con AC_{60} y CoPh recubiertos con un electrolito polimérico gelificado basado en $[\text{OMIM}]\text{PF}_6$ se evaluaron en términos de desviación estándar relativa (RSD), alcanzando un valor de 7,6 % ($n = 3$) para $\text{AC}_{60}/\text{SPCE}_1$ y 6,6 % ($n = 3$) para $\text{CoPh}/\text{SPCE}_2$. Cuando este tipo de mediciones se llevaron a cabo utilizando un único SPCE dual modificado con AC_{60} y CoPh recubierto con un polímero gelificado basado en $[\text{OMIM}]\text{PF}_6$ polimérico, se observó ya una disminución en la pendiente de la tercera curva de calibración. Aunque la repetibilidad de estos dispositivos fue ligeramente peor que su reproducibilidad, esto no se consideró un inconveniente importante considerando su naturaleza desechable y su facilidad de construcción. También se estimaron el límite de decisión ($\text{CC}\alpha$) y la capacidad de detección ($\text{CC}\beta$) en base a las curvas de calibración validadas, según la norma ISO 11843, utilizando el programa DETARCHI (L. Sarabia, M.C. Ortiz, DETARCHI: A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 1–6). Brevemente, $\text{CC}\alpha$ se define como la concentración más baja a la cual el proceso discrimina si el analito de interés está en la muestra con una probabilidad $1 - \alpha$, siendo α la probabilidad de falso positivo y $\text{CC}\beta$ se estima como la concentración más baja de analito que el método puede detectar con una probabilidad de $1 - \beta$, siendo β la probabilidad de falso negativo. Así, se obtuvieron límites de decisión de 1,3 $\mu\text{g/l}$ y 9,2 $\mu\text{g/l}$ para 4-etilfenol y etanotiol, respectivamente. Cuando se emplearon valores $\alpha = \beta = 0,05$, ambos resultados estaban por debajo de la concentración del primer estándar, 23,8 $\mu\text{g/l}$, de forma que este valor se tomó como capacidad de detección para ambos analitos. Este resultado es tan bueno como el logrado utilizando sensores de gas electroquímicos individuales (véase la Tabla 1), con la gran ventaja de que el sensor de la invención permite la detección simultánea de ambos analitos y su uso durante más tiempo, debido al uso de electrolitos poliméricos gelificados. De hecho, era posible utilizar estos sensores al menos 15 días después de su fabricación, habiendo sido almacenados a temperatura ambiente.

Tabla 1

	4-etilfenol ($\mu\text{g/l}$)	Etanotiol ($\mu\text{g/l}$)	Reproducibilidad	$\alpha = \beta = 0,05$	Límite de decisión
AC ₆₀ -SPCE	700 - 1300	n.d.	5,4 % (n = 3)	700 $\mu\text{g/l}$	-
CoPh-SPCE	n.d.	9,9 – 82,6	7 % (n = 3)	12,5 $\mu\text{g/l}$	6,5 $\mu\text{g/l}$
SPCE dual según la invención	23,8 – 83,3	23,8 – 83,3	7,6 % (n = 3) 4- etilfenol 6,6 % (n = 3) etanotiol	23,8 $\mu\text{g/l}$ 4-etilfenol y etanotiol	1,3 $\mu\text{g/l}$ 4- etilfenol 9,2 $\mu\text{g/l}$ etanotiol
n.d. = no detectado					

Se estudió la selectividad del método de la invención, considerando la posibilidad que otros fenoles y tioles volátiles presentes en la matriz del vino pudieran alterar la respuesta amperométrica de 4-etilfenol y etanotiol. Para ello, se seleccionaron dos fenoles volátiles (4-etilguayacol, con una estructura similar al 4-etilfenol, y 4-vinilfenol, un precursor de 4-etilfenol) y un tiol, ácido 4-mercaptobezoico. Bajo las condiciones óptimas de medición para la determinación simultánea de 4-etilfenol y etanotiol, no se obtuvo alteración en la respuesta amperométrica debido a la presencia de estos compuestos, por lo que no fueron considerados interferentes.

Se verificó la aplicabilidad del método de la invención mediante la determinación simultánea de 4-etilfenol y etanotiol en diferentes muestras de vino de cuatro marcas diferentes. Se estudiaron muestras de diferentes variedades de uva sin encontrar la presencia del analito en cualquiera de ellos. También se realizaron experimentos de recuperación mediante el análisis de muestras de vino fortificadas en dos niveles por el método de adición estándar (Ver Tabla 2), obteniendo buenos valores analíticos del 91 al 105 %, lo que corrobora la aplicabilidad del método analítico de la invención para su uso rutinario de control analítico rápido en bodegas.

20

Tabla 2

Muestra de vino	Analito	Concentración añadida (ppb)	Concentración encontrada (ppb)	Recuperación (%)
Blanco 1	4-etilfenol	23,8	22,3 ± 1,7	93,7
	Etanotiol	23,8	22,8 ± 2,0	95,6
	4-etilfenol	46,7	44,8 ± 2,2	96,0
	Etanotiol	46,7	43,0 ± 3,8	92,1
Blanco 2	4-etilfenol	23,8	22,0 ± 2,0	92,4
	Etanotiol	23,8	21,8 ± 2,8	91,6
	4-etilfenol	46,7	46,8 ± 2,4	100,2
	Etanotiol	46,7	47,8 ± 3,4	102,4
Tinto 1	4-etilfenol	23,8	23,92 ± 1,6	100,4
	Etanotiol	23,8	23,08 ± 1,7	96,9
	4-etilfenol	46,7	44,3 ± 3,3	94,9
	Etanotiol	46,7	42,6 ± 4,4	91,2
Tinto 2	4-etilfenol	23,8	24,5 ± 1,1	102,9
	Etanotiol	23,8	24,9 ± 3,3	104,6
	4-etilfenol	46,7	46,0 ± 3,3	98,5
	Etanotiol	46,7	46,2 ± 3,0	99,0

REIVINDICACIONES

1.-Sensor de detección simultánea de mercaptanos y 4-etilfenol en vinos consistente en un electrodo dual serigrafiado de carbono del tipo que incluye dos electrodos de trabajo, un electrodo auxiliar o contraelectrodo, ambos de carbono, y un electrodo de referencia de plata, caracterizado porque la superficie activa de uno de los electrodos de trabajo está activada con AC₆₀ y la superficie activa del otro electrodo de trabajo está activada con CoPh, recubriéndose los cuatro electrodos con una película delgada de un polímero gelificado consistente en una mezcla de PVDF, NMP y [OMIM]PF₆, como electrolito de soporte sólido.

2.-Sensor de detección simultánea de mercaptanos y 4-etilfenol en vinos según la reivindicación 1, caracterizado porque la superficie activa del electrodo de trabajo modificada con AC₆₀ está modificada con 40 µl de una disolución de fullereno C₆₀ a una concentración de 0,1 mg/ml en diclorometano y 50 µl de una disolución de KOH 1,0 M para su reducción electroquímica.

3.-Sensor de detección simultánea de mercaptanos y 4-etilfenol en vinos según la reivindicación 1, caracterizado porque la superficie activa del electrodo de trabajo modificada con una disolución de CoPh en etanol está modificada con 10 µl de una disolución al 5,0 % (peso/volumen).

4.-Método tipo “espacio de cabeza” para la detección amperométrica simultánea de mercaptanos y 4-etilfenol en vinos mediante el sensor según la reivindicación 1, que incluye las etapas de:

- i. Disponer en una celda sellada que contiene 1 ml de tampón Britton Robinson, pH 5,0, el sensor según la reivindicación 1,
- ii. Aplicar un potencial de +0,86 V al electrodo de trabajo modificado con AC₆₀ y de +0,40 V al electrodo de trabajo modificado con CoPH, hasta registrar una corriente constante;
- iii. Introducir en la celda sellada un volumen de la muestra de vino a analizar;
- iv. Registrar el incremento de corriente en el espacio de cabeza de la celda debido al proceso de oxidación que tiene lugar en la superficie de ambos electrodos de trabajo,

- v. Correlacionar la corriente registrada en las superficies de trabajo del sensor con la concentración de mercaptanos y 4-etilfenol en la celda.

Figura 1

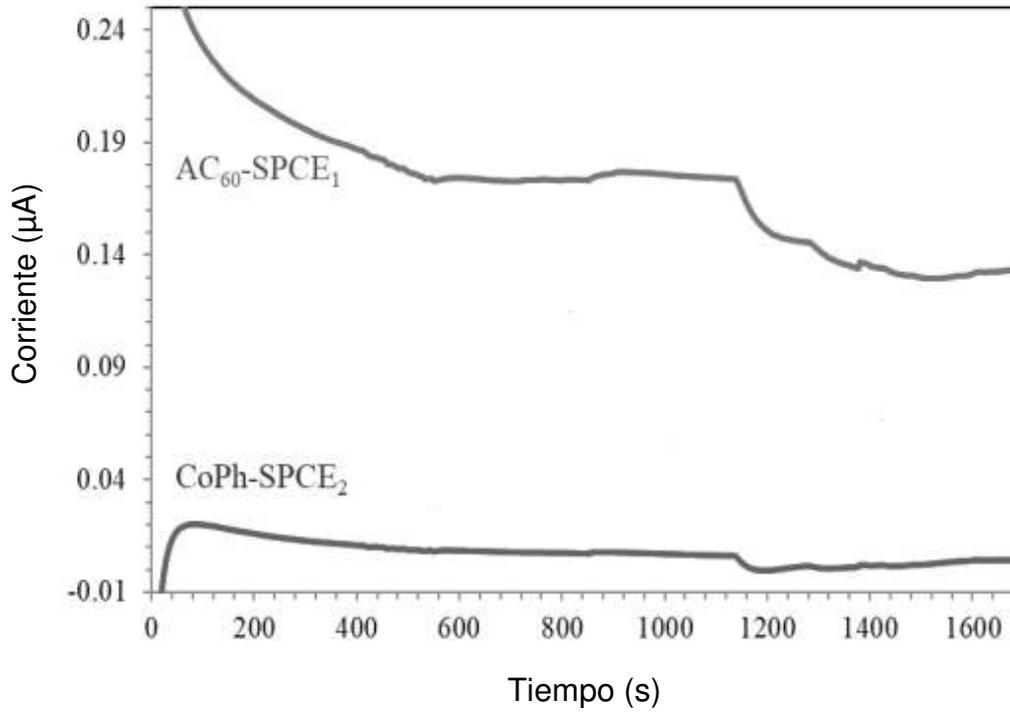
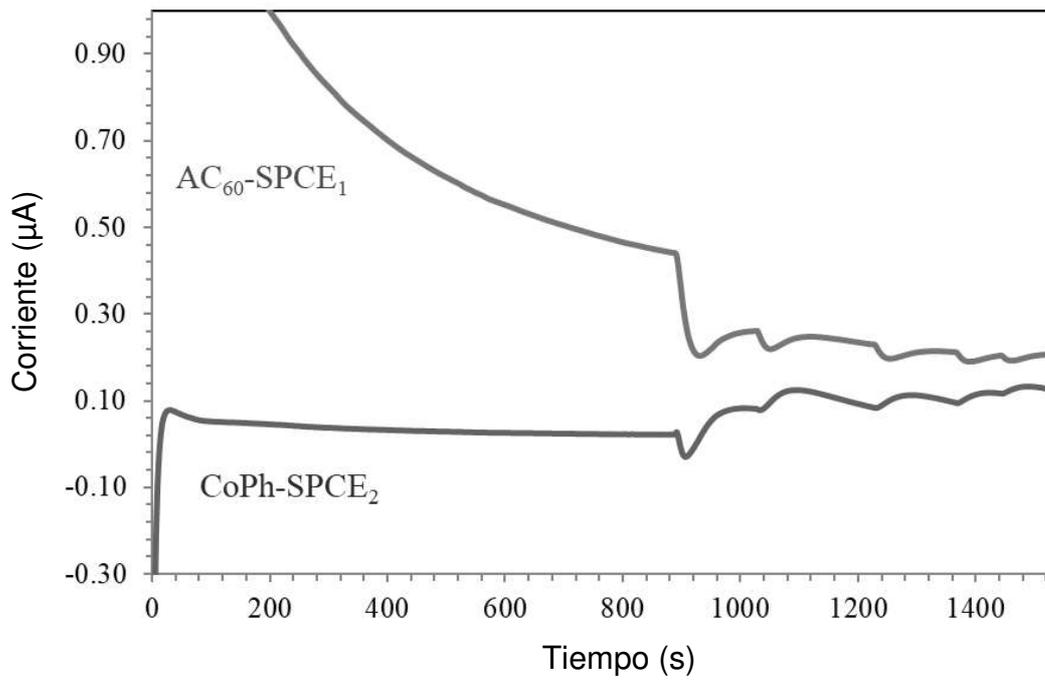


Figura 2





- ②① N.º solicitud: 202330838
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.10.2023
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	PORTUGAL-GOMEZ PAULA et al. "Headspace detection of ethanethiol in wine by cobalt phthalocyanine modified screen-printed carbon electrodes". Talanta Netherlands, 01/08/2023, Vol. 260, Páginas 124583, ISSN 1873-3573 (Electronic), <DOI: doi: 10.1016/j.talanta.2023.124583 pubmed:37105081>. Ver resumen; apartados 2 y 3.	1-4
A	PORTUGAL-GOMEZ PAULA et al. "4-ethyphenol detection in wine by fullerene modified screen-printed carbon electrodes". Microchemical Journal, 31/08/2022, Vol. 180, Páginas Article No.: 107599, ISSN 0026-265X(print) ISSN 1095-9149(electronic), <DOI: doi: 10.1016/j.microc.2022.107599>. Ver resumen, apartado 2.	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
18.09.2024

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N27/407 (2006.01)

G01N27/49 (2006.01)

G01N33/14 (2006.01)

H01M4/02 (2006.01)

H01M4/133 (2010.01)

H01M4/36 (2006.01)

H01M4/96 (2006.01)

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

G01N, H01M

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, TXT-DB, NPL, XPESP, CAS