

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 527**

21 Número de solicitud: 201530995

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/26**

(2006.01)

12

## PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**09.07.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**09.02.2017**

Fecha de concesión:

**10.01.2018**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**17.01.2018**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2016/070279**

73 Titular/es:

**BIOLAN MICROBIOSENSORES, S.L. (100.0%)  
Parque Científico y Tecnológico de Bizkaia,  
Edificio 409  
48170 ZAMUDIO (Bizkaia) ES**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ RIOJA , Roberto;  
MAZA DEL RÍO , Sonia;  
SALLERES ALONSO , Sandra;  
JAUREGUIBEITIA CAYROLS , Arrate;  
GONZALEZ URQUIDI , Iruñe y  
ARANTZAMENDI EGIGUREN , Alai**

74 Agente/Representante:

**URÍZAR BARANDIARAN, Miguel Ángel**

54 Título: **SISTEMA PARA MEDIR SULFITO EN MUESTRAS ALIMENTARIAS MEDIANTE BIOSENSOR; MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFITO EN MUESTRAS ALIMENTARIAS UTILIZANDO EL CITADO BIOSENSOR; Y USO DEL CITADO BIOSENSOR PARA MEDIR LOS VALORES DE SULFITO EN MUESTRAS ALIMENTARIAS**

57 Resumen:

Sistema para medir sulfito en muestras alimentarias mediante biosensor; método para la determinación de sulfito en muestras alimentarias utilizando el citado biosensor; y uso del citado biosensor para medir los valores de sulfito en muestras alimentarias.

El sistema utiliza un biosensor amperométrico que comprende un sistema bi-enzimático; un electrodo de trabajo; un contra-electrodo; y un electrodo de referencia.

El sistema bi-enzimático está compuesto por las enzimas sulfito oxidasa humana y peroxidasa; y la inmovilización de las enzimas en el electrodo de trabajo se lleva a cabo mediante simple retención física. La mezcla de las enzimas se mezcla a su vez con un mediador químico.

El método comprende las fases de aplicación de una muestra al biosensor amperométrico; cambio de corriente eléctrica al entrar en contacto con el analito a detectar; y medir amperométricamente dicha corriente eléctrica en soluciones con agitación continua, utilizando un potencial constante.

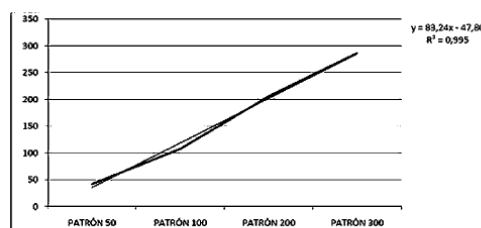


Fig. 2

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

**DESCRIPCIÓN**

SISTEMA PARA MEDIR SULFITO EN MUESTRAS ALIMENTARIAS MEDIANTE BIOSENSOR; MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFITO EN MUESTRAS ALIMENTARIAS UTILIZANDO EL CITADO BIOSENSOR; Y USO DEL CITADO BIOSENSOR PARA MEDIR LOS VALORES DE SULFITO EN MUESTRAS ALIMENTARIAS

**5 ESTADO DEL ARTE**

Los sulfitos son aditivos alimentarios con propiedades antioxidantes y antimicrobianas que se utilizan en la industria alimentaria para mejorar la calidad, la apariencia y extender la vida útil de los alimentos y bebidas. En los crustáceos, los sulfitos se aplican después de la cosecha y durante todo el proceso de producción para evitar la melanosis. La adición de sulfitos inhibe la formación de manchas negras causadas por la oxidación enzimática de los monofenoles a melanina. La melanosis no tiene incidencia en el sabor de los crustáceos y no es perjudicial para los consumidores. Sin embargo, dichas manchas pueden afectar drásticamente la aceptabilidad del consumidor de los productos y disminuir significativamente su valor de mercado.

La legislación comunitaria sobre aditivos alimentarios se basa en el principio de que sólo los aditivos que están autorizados explícitamente se pueden utilizar. La mayoría de los aditivos alimentarios sólo se pueden usar en cantidades limitadas en determinados productos alimenticios y se enumeran en el Reglamento N° 1129/2011, que modifica la CE n° 1333/2008. Este Reglamento enumera los aditivos alimentarios con niveles máximos permitidos diferentes de *quantum satis*. Para crustáceos y cefalópodos frescos y congelados la concentración máxima de sulfito (E220-E228) admitida es de 150 mg/kg.

Por otra parte, la Comisión del Codex Alimentarius nombra a los sulfitos como alérgenos prioritarios e indica que el control de la utilización de sulfito es importante para proteger a los consumidores sensibles al sulfito.

En alimentos y bebidas, el sulfito se encuentra unido reversiblemente en forma de aductos con compuestos carbonilo e hidroxisulfonados. Estos aductos son estables a bajo e intermedio pH y se disocian completamente a sulfito libre por encima de pH 9. A las formas libre y reversible de sulfito unido se las refiere como sulfito total. Tanto en forma libre como total, ambos son de interés para la industria alimentaria.

Un punto crítico de control en el procesamiento de crustáceos se establece para garantizar que el producto final no contiene una excesiva concentración de sulfito. Los límites críticos deben establecerse en todo el proceso para asegurar que el producto final cumple con los límites regulatorios y la supervisión periódica de la eficacia del tratamiento y los controles deben ser

requeridos. Por lo tanto, la monitorización de sulfito debe ser una parte integral de un programa de la Firma de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP).

5 El HACCP necesita ser rápido y conveniente para ser aplicado diariamente, pero los métodos actuales para la determinación de sulfito son complicados, consumen mucho tiempo y son subjetivos.

Dichos métodos tales como tiras de prueba, métodos enzimáticos o métodos basados en la valoración tienen grandes limitaciones, falsos positivos, y poca reproducibilidad y exactitud.

10 El método Monier-Williams optimizado (AOAC 962.16) ha sido ampliamente utilizado para determinar la concentración de sulfitos totales en los productos alimenticios. Sin embargo, este método conlleva mucho tiempo de análisis, mano de obra, requiere personal técnico y muestra falsos positivos.

15 Por lo tanto, uno de los grandes retos de la industria de los crustáceos es lograr un sistema altamente sensible, rápido y portátil para la determinación de sulfito en crustáceos a fin de evitar que los productos contaminados lleguen al mercado. Los biosensores enzimáticos son soluciones adecuadas que se aplicarán para la determinación de los sulfitos en los alimentos, más concretamente en los crustáceos, como herramientas de costo simples, precisas, y rápidas.

## **OBJETO DE LA INVENCION**

20 El objeto del invento es un sistema para medir sulfito en muestras alimentarias, de forma simple y rápida mediante la utilización de un biosensor amperométrico enzimático. Dicho sistema es bi-enzimático compuesto por dos enzimas: sulfito oxidasa humana (EC 1.3.8.1) y peroxidasa, con simple retención física sobre una base conductora, de una alícuota líquida de estas enzimas mediante una membrana de diálisis junto con un mediador químico.

También es objeto del invento el biosensor enzimático, para la determinación de sulfito en muestras alimentarias.

25 También es objeto del invento el método para la determinación de sulfito en muestras alimentarias utilizando el citado biosensor.

También es objeto del invento el uso del sistema descrito, para medir los valores de sulfito en muestras alimentarias.

Particularmente, las muestras alimentarias son crustáceos.

También es objeto del invento el dispositivo de medida resultante, que ha demostrado satisfactoria selectividad y estabilidad al sulfito como sustrato en matrices tales como los crustáceos.

Hoy en día no existe un biosensor comercial de sulfito aplicado a la industria agroalimentaria y ninguna enzima comercial está disponible.

- 5 El sistema objeto del invento ofrece unos resultados tanto o más fiables que el método de referencia (Monier-Williams) hoy utilizado, pero con unas características/particularidades ventajosas respecto a él que se reflejan de forma resumida en la siguiente tabla:

|                    | Método Monier-Williams optimizado (AOAC 962.16)             | Objeto del invento                                        |
|--------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Procedimiento      | Destilación ácida seguida de valoración                     | Oxidación enzimática del sulfito, detección amperométrica |
| Tiempo de análisis | 1 hora                                                      | 3 Minutos                                                 |
| Simplicidad        | Baja                                                        | Media                                                     |
| Interpretación     | Comparación con los estándares al comienzo de la valoración | Resultado en pantalla                                     |
| Limitación         | Cuantificación limitada                                     | Calibración diaria                                        |

## DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 Para comprender mejor el objeto de la invención, se representa en las figuras adjuntas una forma preferente de realización, susceptible de cambios accesorios que no desvirtúen su fundamento. En este caso:

La figura 1 representa el esquema de reacción para la determinación de sulfito.

La figura 2 representa la curva de calibrado para ver el rango de respuesta del biosensor al sulfito.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 15 La presente invención preconiza un sistema para medir sulfito en muestras alimentarias mediante biosensor; un método para la determinación de sulfito en muestras alimentarias utilizando el citado biosensor; y el uso del citado biosensor para medir los valores de sulfito en muestras alimentarias.

Particularmente, las muestras alimentarias son crustáceos.

El biosensor utilizado es un biosensor amperométrico que comprende un sistema bi-enzimático; que está compuesto por dos enzimas: sulfito oxidasa humana (EC 1.3.8.1) y peroxidasa.

5 El citado biosensor amperométrico se compone de un sustrato, un electrodo de trabajo, un contra-electrodo y un electrodo de referencia. Preferiblemente, el biosensor se compone de un electrodo de trabajo de oro, un contra-electrodo de acero inoxidable y de un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl).

10 Las enzimas se depositan en la superficie del electrodo de trabajo con simple retención física. Antes de depositarlas, sobre la superficie del electrodo de trabajo se deposita el mediador químico que puede comprender mediadores tales como Azul de Metileno, Azul de Meldola, Tetratiafulvaleno, Ferricianuro y Ferroceno, disueltos en solventes orgánicos tales como isopropanol, propanol, metanol y cloroformo. Preferiblemente, el mediador químico es Ferroceno disuelto en isopropanol.

El método objeto del invento comprende las fases de

- 15 a) aplicación de una muestra al biosensor amperométrico;
- b) cambio de corriente eléctrica al entrar en contacto con el analito a detectar; y
- c) medir amperométricamente dicha corriente eléctrica en soluciones con agitación continua, utilizando un potencial constante.

20 Antes de depositar las enzimas en el electrodo de trabajo, éstas se disuelven en un tampón carbonato/bicarbonato y/o CAPS y/o CAPSO 0,1M en un rango de pHs de 8,0-11,1, siendo el pH óptimo de 10. Para dicha preparación, se trabaja con relaciones sulfito oxidasa:peroxidasa de 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4 en términos de unidades enzimáticas, siendo la relación óptima 1:3.

A su vez, dicha combinación bi-enzimática comprende una solución de secado compuesta por trehalosa y/o glutamato sódico en el rango de 10-40%, siendo el valor óptimo del 30%.

25 Las enzimas depositadas sobre el electrodo de trabajo, se recubren mediante una membrana permeable u osmótica como las usadas en diálisis, previamente hidratada, con un peso molecular nominal límite en el rango de 5-50 kilodaltons (kDa), siendo el óptimo 6-10 kDa.

Posteriormente, para su uso, el biosensor se hidrata en la solución de medida que corresponde al tampón carbonato/bicarbonato 0,1M en un rango de pHs de 8,0-11,1, siendo el pH óptimo de 10.

El esquema biocatalítico para la determinación del sulfito en crustáceos sería el siguiente:

A pH 10 todo el dióxido de azufre presente en la muestra (tanto el libre como el combinado) está en forma de  $\text{SO}_3^-$  (forma sulfito).

5 La enzima sulfito oxidasa media en la oxidación del sulfito a sulfato generando peróxido de hidrogeno en presencia de oxígeno. La subsecuente reducción catalítica del peróxido generado mediante la peroxidasa (HRP), es la medida indirecta del sulfito oxidado. El ferroceno se usa como mediador químico para esta última reacción enzimática, por tanto, la señal amperométrica que se usa para la lectura de este esquema de reacciones corresponde a la reducción de dicho mediador, tal y como se indica en la figura 1, que representa un esquema de reacción para la  
10 determinación de sulfito.

El nivel de sulfito en una muestra se determina aplicando la muestra al biosensor y midiendo la señal de corriente a un potencial que se encuentra en el rango de 0 a 50 mV. Preferentemente, el voltaje de la corriente eléctrica utilizada para la determinación de sulfito es aproximadamente 0 mV.

15 El pH para la determinación de sulfito se encuentra en el rango de 8,0 a 11,1. Preferentemente, el pH para la determinación de sulfito es aproximadamente 10,0.

Dicho biosensor en conjunto con una cubeta de medida y un agitador es a lo que denominamos celda electroquímica que consta de los siguientes elementos:

- Electrodo de trabajo;
- 20 - Contraelectrodo;
- Electrodo de referencia;
- Cubeta de medida; y
- Agitador

25 El biosensor tiene un rango de respuesta de 50-300 ppm de sulfito; y además la respuesta lineal es total en dicho rango, tal y como se muestra en la figura 2, que representa el rango de respuesta del biosensor (curva de calibrado de 50 a 300 mg/kg). De esta manera, se cubre el rango marcado por el Reglamento N° 1129/2011, que enumera los aditivos alimentarios con niveles máximos permitidos para crustáceos y cefalópodos frescos y congelados; siendo dicho valor 150 ppm.

Se construye una recta de calibrado de 5 puntos (sin incluir el blanco), y de 3 réplicas para cada concentración. Se evalúa la linealidad comprobando el coeficiente de regresión  $r^2$  y el Factor Respuesta/Concentración.

- 5 Una vez comprobada la linealidad en el rango de 50 a 300 mg/kg, se estudia si las calibraciones rutinarias realizadas por el biosensor (2 puntos) son lo suficientemente estables para garantizar la exactitud y precisión durante la vida útil del biosensor. Para ello se realizaron 23 calibraciones con 5 biosensores distintos, de modo que se comprobó la estabilidad de la pendiente (m), del coeficiente de regresión lineal ( $r^2$ ). Los criterios de aceptación propuestos son los siguientes:

- El % RSD de la pendiente no excederá del 15 %
- 10 - Ninguna recta tendrá un  $r^2 < 0,995$  ( $R < 0,99$ )

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

| BIOSENSOR   | $r^2$  | PENDIENTE<br>(m) | PUNTO DE CORTE<br>(b) |
|-------------|--------|------------------|-----------------------|
| Biosensor 1 | 0,9986 | -268451,72       | -9,19                 |
| Biosensor 1 | 0,9998 | -216795,02       | -2,08                 |
| Biosensor 1 | 0,9997 | -212064,04       | -3,3                  |
| Biosensor 1 | 0,9997 | -213370,52       | -3,38                 |
| Biosensor 1 | 0,9999 | -216305,44       | -1,96                 |
| Biosensor 2 | 0,9999 | -252625,28       | -1,21                 |
| Biosensor 2 | 0,9997 | -238793,58       | -3,21                 |
| Biosensor 2 | 0,9997 | -260319,96       | -3,89                 |
| Biosensor 2 | 0,9999 | -160476,95       | -0,16                 |
| Biosensor 2 | 0,9998 | -162145,8        | 1,92                  |
| Biosensor 3 | 0,9994 | -158693,02       | -3,36                 |
| Biosensor 3 | 0,9998 | -199188,24       | -2,5                  |
| Biosensor 3 | 0,9999 | -200175,32       | -1,59                 |
| Biosensor 3 | 0,9987 | -207896,84       | -6,96                 |
| Biosensor 3 | 0,9994 | -175763,08       | 3,96                  |
| Biosensor 4 | 0,9999 | -165459,56       | 0,9                   |
| Biosensor 4 | 0,9999 | -241312,66       | -0,55                 |
| Biosensor 4 | 0,9999 | -224968,14       | 1,14                  |
| Biosensor 4 | 0,9999 | -225537,96       | -0,47                 |
| Biosensor 5 | 0,9998 | -254172,28       | -2,75                 |
| Biosensor 5 | 0,9998 | -240394,24       | -3,07                 |
| Biosensor 5 | 0,9992 | -226618,6        | -5,68                 |
| Biosensor 5 | 0,9989 | -217246,88       | -6,48                 |
| MEDIA       | 0,9996 | -214729,35       | -2,34                 |
| SD          | 0,0004 | 32738,83         | 3                     |
| RSD (%)     | 0,04   | 15               | -                     |

|        |        |            |       |
|--------|--------|------------|-------|
| MÁXIMO | 0,9999 | -158693,02 | 3,96  |
| MÍNIMO | 0,9986 | -268451,72 | -9,19 |

El método se considera preciso en todo el rango de trabajo, desde 50 a 300 mg/kg y en las matrices objeto de ensayo (langostino crudo y cocido), de acuerdo a los criterios de RSD HORWITZ

Durante la vida útil del biosensor, la estabilidad de las rectas de calibrado se considera adecuada.

- 5 La exactitud es el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado. Dicha exactitud se obtiene mediante el estudio de recuperaciones, en todo el rango de trabajo, desde 50 hasta 300 mg/kg, de modo que en cada nivel de concentración se analizan las dos matrices de estudio (langostino crudo y cocido). Se considera el método de buena exactitud si la recuperación media en todos los niveles de concentración, cumple los criterios establecidos por
- 10 AOAC. La siguiente tabla muestra los resultados:

| PLANIFICACIÓN Y RESULTADOS  |                   |             | EXACTITUD    |          |            |
|-----------------------------|-------------------|-------------|--------------|----------|------------|
|                             |                   |             | RECUPERACIÓN |          |            |
| VALOR DE REFERENCIA (mg/kg) | MATRIZ            | Nº Réplicas | % REC. MEDIO | CRITERIO | Aceptación |
| 50                          | LANGOSTINO CRUDO  | 4           | 84           | 80-110   | SI         |
|                             | LANGOSTINO COCIDO | 4           |              |          |            |
| 100                         | LANGOSTINO CRUDO  | 4           | 96           | 90-107   | SI         |
|                             | LANGOSTINO COCIDO | 4           |              |          |            |
| 200                         | LANGOSTINO CRUDO  | 4           | 92           | 90-107   | SI         |
|                             | LANGOSTINO COCIDO | 4           |              |          |            |
| 300                         | LANGOSTINO CRUDO  | 4           | 96           | 90-107   | SI         |
|                             | LANGOSTINO COCIDO | 4           |              |          |            |

El método se considera exacto en todo el rango de concentración, desde 50 a 300 mg/kg, en las matrices objeto de ensayo (langostino crudo y cocido), de acuerdo a los intervalos de recuperación aceptables establecidos por AOAC.

- 15 Por otra parte, se determina el grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones predeterminadas. Dicha precisión se suele expresar como imprecisión mediante el cálculo de desviaciones estándar relativas y/o el cociente Horrat. Para obtener la máxima imprecisión se ha considerado en todos los niveles de concentración, la máxima variabilidad de matrices (especies, productos frescos y elaborados,...), medidas a lo largo de la vida del biosensor, etc.

- 20 La siguiente tabla muestra los resultados:

| Muestra | Biosensor | Monier-Williams<br>modificado | Intervalo de incertidumbre<br>Monier-Williams modificado | Aceptación |
|---------|-----------|-------------------------------|----------------------------------------------------------|------------|
| 1       | 180,9     | 214                           | 166-262                                                  | Sí         |
| 2       | 195,5     | 224                           | 176-272                                                  | Sí         |
| 3       | 216       | 236                           | 184-288                                                  | Sí         |
| 4       | 104,76    | 115                           | 90-140                                                   | Sí         |
| 5       | 112,06    | 128                           | 100- 156                                                 | Sí         |
| 6       | 137,06    | 127                           | 99-155                                                   | Sí         |
| 7       | 131,5     | 117                           | 92-142                                                   | Sí         |
| 8       | 183,82    | 194                           | 150-238                                                  | Sí         |
| 9       | 81        | 96                            | 74-118                                                   | Sí         |
| 10      | 68        | 81                            | 62-100                                                   | Sí         |
| 11      | 156       | 165                           | 130-200                                                  | Sí         |
| 12      | 155       | 190                           | 146-234                                                  | Sí         |
| 13      | 97        | 121                           | 96-146                                                   | Sí         |
| 14      | 121       | 143                           | 112-171                                                  | Sí         |
| 15      | 120       | 131                           | 103-159                                                  | Sí         |
| 16      | 226       | 222                           | 174-270                                                  | Sí         |
| 17      | 181       | 241                           | 189-293                                                  | No         |
| 18      | 96        | 122                           | 94-150                                                   | Sí         |
| 19      | 155       | 176                           | 137-215                                                  | Sí         |
| 20      | 117       | 163                           | 128-198                                                  | No         |
| 21      | 127       | 162                           | 127-197                                                  | Sí         |
| 22      | 165,96    | 202                           | 158-246                                                  | Sí         |
| 23      | 124,16    | 154                           | 119-189                                                  | Sí         |
| 24      | 117,16    | 130                           | 102-158                                                  | Sí         |
| 25      | 107       | 135                           | 107-163                                                  | Sí         |
| 26      | 60,28     | 55                            | 42-68                                                    | Sí         |
| 27      | 75,28     | 67                            | 51-83                                                    | Sí         |
| 28      | 75,18     | 92                            | 73-111                                                   | Sí         |
| 29      | 294,8     | 337                           | 265-409                                                  | Sí         |
| 30      | 86,12     | 84                            | 65-103                                                   | Sí         |
| 31      | 58,16     | 63                            | 50-76                                                    | Sí         |
| 32      | 61,02     | 75                            | 59-91                                                    | Sí         |
| 33      | 88,02     | 102                           | 80-124                                                   | Sí         |
| 34      | 22,34     | 21                            | 16-26                                                    | Sí         |
| 35      | 41,58     | 46                            | 35-57                                                    | Sí         |
| 36      | 76,1      | 84                            | 65-103                                                   | Sí         |
| 37      | 132,2     | 166                           | 131-201                                                  | Sí         |
| 38      | 172,54    | 206                           | 162-250                                                  | Sí         |
| 39      | 70,6      | 90                            | 71-109                                                   | Sí         |
| 40      | 72,52     | 84                            | 65-103                                                   | Sí         |
| 41      | 65,26     | 75                            | 59-91                                                    | Sí         |
| 42      | 64,6      | 78                            | 62-94                                                    | Sí         |
| 43      | 79,84     | 88                            | 69-107                                                   | Sí         |

|    |    |    |       |    |
|----|----|----|-------|----|
| 44 | 70 | 64 | 51-77 | Sí |
|----|----|----|-------|----|

El método se considera preciso en todo el rango de trabajo, desde 50 a 300 mg/kg y en las matrices objeto de ensayo (langostino crudo y cocido), de acuerdo a los criterios de RSD HORWITZ.

- 5 Para asegurar que los resultados obtenidos son adecuados se realizó un estudio comparativo con el método modificado Monier Williams para determinación de sulfitos en muestras en las que se encuentren presentes otros compuestos volátiles de azufre. Se basa en la transformación de los sulfitos en  $\text{SO}_2$ . El  $\text{SO}_2$  es oxidado a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  que finalmente es valorado con una disolución estandarizada de NaOH. El método modificado Monier Williams está basado en el método de la AOAC, Sulfurous Acid (Total) in Food, Optimized Monier-Williams Method. 990.28, pp29, 1995.
- 10 Este método se emplea con frecuencia en el control oficial de sulfitos en alimentos.

Para ello se analizaron un total de 44 muestras de langostinos cocidos y crudos tanto por el método de Monier-Williams modificado como por el método objeto del invento. Los resultados obtenidos se muestran en la anterior tabla.

- El estudio comparativo con el método modificado de Monier-Williams, muestra un valor de
- 15 fiabilidad del 95%.

Por último, se determina la vida útil del biosensor en relación a su almacenamiento y número de medidas que puede soportar. Para ello, se testan una serie de biosensores con 0, 15, 30, 60 y 90 días de secado almacenados a 3-8°C, e hidratados a día 1, 7 y 15 tras su secado. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

|                                                 |                            |                           |                           |
|-------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| lote<br>calibración<br>nº de medidas acumuladas | T0                         |                           |                           |
|                                                 | H1                         | H7                        | H15                       |
|                                                 | Biosensor 1<br>R = 0,9996  | Biosensor 1<br>R = 0,9999 | Biosensor 1<br>R = 0,9999 |
|                                                 | 110                        | 105                       | 108                       |
| lote<br>calibración<br>nº de medidas acumuladas | T15                        |                           |                           |
|                                                 | H1                         | H7                        | H15                       |
|                                                 | Biosensor 2<br>R=0,9999    | Biosensor 2<br>R=0,9999   | Biosensor 2<br>R=0,9998   |
|                                                 | 107                        | 110                       | 104                       |
| lote<br>calibración<br>nº de medidas acumuladas | T30                        |                           |                           |
|                                                 | H1                         | H7                        | H15                       |
|                                                 | Biosensor 3<br>R = 0, 9999 | Biosensor 3<br>R=0,9999   | Biosensor 3<br>R = 0,9998 |
|                                                 | 104                        | 110                       | 120                       |
| T60                                             |                            |                           |                           |

|                          |             |             |             |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                          | H1          | H7          | H15         |
| lote                     | Biosensor 4 | Biosensor 4 | Biosensor 4 |
| calibración              | R=0,9993    | R=0,9999    | R=0,9993    |
| nº de medidas acumuladas | 105         | 105         | 110         |
|                          | T90         |             |             |
|                          | H1          | H7          | H15         |
| lote                     | Biosensor 2 | Biosensor 2 | Biosensor 2 |
| calibración              | R=0,9999    | R=0,9999    | R=0,9999    |
| nº de medidas acumuladas | 115         | 105         | 108         |

siendo:

T0= 0 días de almacenamiento en seco

T15= 15 días de almacenamiento en seco

T30= 30 días de almacenamiento en seco

T60= 60 días de almacenamiento en seco

T90= 90 días de almacenamiento en seco

H1= 1 día hidratado

H7= 7 días hidratado

H15= 15 días hidratado

Los biosensores son capaces de aguantar un mínimo de 100 medidas en cualquiera de las condiciones anteriormente mencionadas mostrando una perfecta calibración.

## EJEMPLOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

- 5 Para una mejor comprensión de la presente invención, se exponen los siguientes ejemplos, descritos en detalle, que deben entenderse sin carácter limitativo del alcance de la presente invención.

### **Ejemplo 1.** Determinación se sulfito total en gamba cruda

- 10 Limpiar y desechar el caparazón, el cefalotórax y otras partes no comestibles del exoesqueleto y tracto digestivo visible. A continuación, homogeneizar la muestra con ayuda de una picadora. Pesar 2 gr del homogeneizado y mezclarlo con 18 ml de solución de extracción (tampón 0,1M CAPS pH 9,5). Agitar vigorosamente 30 segundos y aplicar ultrasonidos de alta intensidad durante 20 minutos con pulsos de 20 segundos y una amplitud del 60%; dejar atemperar antes de procede al análisis.
- 15 Añadir 1 mL del homogeneizado a la celda electroquímica con 10 mL de tampón 0,1M CAPS pH 9,5, con agitación constante y comenzar la medida amperométrica en el biosensor a un potencial de 0 mV.

### **Ejemplo 2.** Determinación se sulfito total en langostino cocido

Limpiar y desechar el caparazón, el cefalotórax y otras partes no comestibles del exoesqueleto y tracto digestivo visible. A continuación, homogeneizar la muestra con ayuda de una picadora. Pesar 5 gr del homogeneizado y mezclarlo con 40 ml de solución de extracción (tampón 0,1M CAPSO pH 10,0). Agitar vigorosamente 30 segundos y aplicar ultrasonidos de baja intensidad durante 30 minutos a 45°C; dejar atemperar antes de procede al análisis.

Añadir 1 mL del homogeneizado a la celda electroquímica con 10 mL de tampón 0,1M CAPSO pH 10,0, con agitación constante y comenzar la medida amperométrica en el biosensor a un potencial de 0 mV.

**Ejemplo 3. Determinación se sulfito total en langostino crudo**

10 Limpiar y desechar el caparazón, el cefalotórax y otras partes no comestibles del exoesqueleto y tracto digestivo visible. A continuación, homogeneizar la muestra con ayuda de una picadora. Pesar 2 gr del homogeneizado y mezclarlo con 10 ml de solución de extracción (tampón 0,1M carbonato/bicarbonato pH 10,0). Agitar vigorosamente 30 segundos y aplicar ultrasonidos de baja intensidad durante 20 minutos a 40°C; dejar atemperar antes de procede al análisis. Para eliminar  
15 las trazas de muestra en suspensión, se procederá a filtrar/centrifugar la muestra antes de inyectarla en el equipo.

Añadir 1 mL del homogeneizado a la celda electroquímica con 10 mL de tampón 0,1M carbonato/bicarbonato pH 10,0, con agitación constante y comenzar la medida amperométrica en el biosensor a un potencial de 0 mV.

20

## REIVINDICACIONES

- 1.- Sistema para medir sulfito en muestras alimentarias mediante biosensor, caracterizado porque utiliza un biosensor amperométrico que comprende:
- a) un sistema bi-enzimático;
  - 5 b) un electrodo de trabajo;
  - c) un contra-electrodo; y
  - d) un electrodo de referencia
- 2.- El biosensor de la reivindicación 1, caracterizado porque el electrodo de trabajo es oro.
- 3.- El biosensor de la reivindicación 1, caracterizado porque el contra-electrodo es acero  
10 inoxidable.
- 4.- El biosensor de la reivindicación 1, caracterizado porque el electrodo de referencia es un electrodo de cloruro de plata (Ag/AgCl).
- 5.- El biosensor de la reivindicación 1, caracterizado porque el sistema bi-enzimático está compuesto por las enzimas sulfito oxidasa humana y peroxidasa.
- 15 6.- El biosensor de la reivindicación 5, caracterizado porque la inmovilización de las enzimas en el electrodo de trabajo se lleva a cabo mediante simple retención física.
- 7.- El biosensor de las reivindicaciones 5 y 6, caracterizado porque la mezcla de las enzimas se mezcla a su vez con un mediador químico.
- 8.- El biosensor de la reivindicación 7, caracterizado porque el mediador químico es ferroceno  
20 disuelto en isopropanol.
- 9.- Método para la determinación de sulfito en muestras alimentarias utilizando el biosensor amperométrico de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque comprende las fases de:
- a) aplicación de una muestra al biosensor amperométrico;
  - b) cambio de corriente eléctrica al entrar en contacto con el analito a detectar; y
  - 25 c) medir amperométricamente dicha corriente eléctrica en soluciones con agitación continua, utilizando un potencial constante.

10.- El método de la reivindicación 9, caracterizado porque el voltaje de la corriente eléctrica utilizada para la determinación de sulfito se encuentra en el rango de 0 a 50 mV.

11.- El método de la reivindicación 10, en donde el voltaje de la corriente eléctrica utilizada para la determinación de sulfito es aproximadamente 0 mV.

5 12.- El método de la reivindicación 9, en donde el pH para la determinación de sulfito se encuentra en el rango de 8,0 a 11,1.

13.- El método de la reivindicación 12, en donde el pH para la determinación de sulfito es aproximadamente 10,0.

10 14.- Uso del biosensor de las reivindicaciones 1 a 7 para medir los valores de sulfito en muestras alimentarias.

Fig. 1

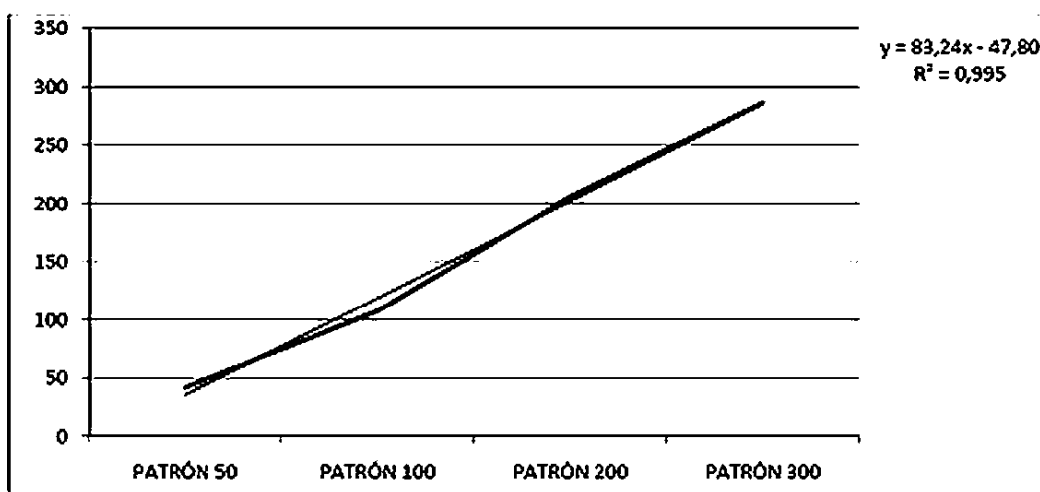
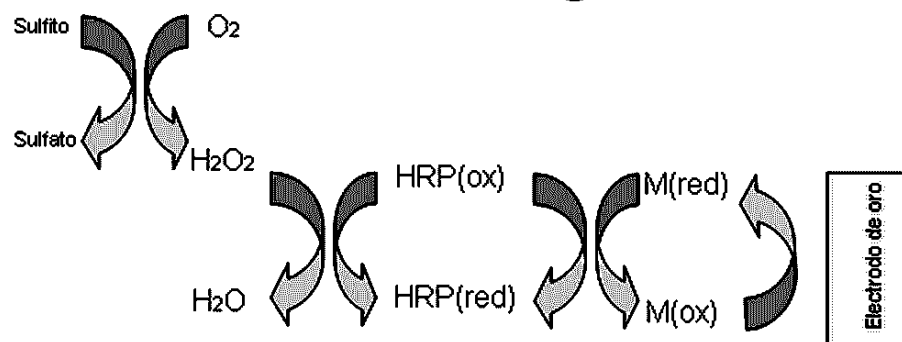


Fig. 2