

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 857**

21 Número de solicitud: 201600440

51 Int. Cl.:

G01N 21/29 (2006.01)

B82Y 30/00 (2011.01)

G01N 33/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

24.05.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.11.2017

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (100.0%)

Av. Blasco Ibáñez nº 13

46010 Valencia ES

72 Inventor/es:

CAMPINS FALCÓ, Pilar;

MOLINS LEGUA, Carmen;

MOLINER MARTÍNEZ, Yolanda;

HERRÁEZ HERNÁNDEZ, Rosa;

VERDU ANDRÉS, Jorge;

JORNET MARTÍNEZ, Neus y

ARGENTE GARCÍA, Ana Isabel

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Sensor colorimétrico basado en nanopartículas de plata para la determinación de compuestos volátiles de sulfuro**

57 Resumen:

Sensor sólido colorimétrico para la detección y/o determinación de sulfuros volátiles en gases o en cualquier matriz en la que existan o se generen sulfuros volátiles. Está basado en nanopartículas de plata inmovilizadas en una membrana. Este sensor posibilita, de manera portátil (in situ) y de forma pasiva, en tan solo 10 min, una detección/determinación sencilla por observación visual, mediante las coordenadas RGB de la imagen digital y/o por reflectancia difusa. Presentan una selectividad adecuada para la monitorización de compuestos volátiles de sulfuro y se ha observado que no interfieren en la detección de otros compuestos volátiles tales como las aminas, etanol o acetona. La sensibilidad es buena, con un límite de detección y de cuantificación de 45 ppb v/v y 150 ppb v/v respectivamente obtenida a través de la medida del color por reflectancia difusa.

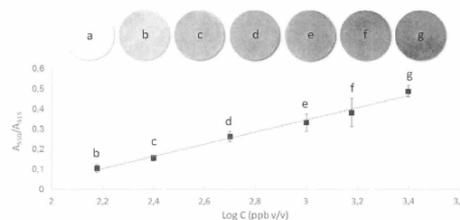


Fig. 3

ES 2 643 857 A1

DESCRIPCIÓN

Sensor colorimétrico basado en nanopartículas de plata para la determinación de compuestos volátiles de sulfuro.

5

Campo de la invención

El dispositivo desarrollado se encuadra en el campo de la detección de compuestos volátiles de sulfuro ($R-S^-$ y S^{-2}) tales como el sulfuro de hidrógeno (H_2S) y el metilmercaptano (CH_3SH) en gases, p.ej. el aire. El tipo de muestreo es pasivo y la detección es rápida y simple, por observación directa del cambio de color. Permite detectar niveles bajos de estos compuestos, pudiéndose aplicar para la detección en la atmosfera así como en recintos cerrados e incluso para el análisis de la halitosis en la respiración humana, entre otras.

10
15

Resumen de la invención

En la presente invención se describe un sensor sólido colorimétrico para la determinación de compuestos volátiles de sulfuro ($R-S^-$ y S^{-2}). Está basado en la inmovilización de nanopartículas de plata (de aquí en adelante abreviadas como AgNPs) estabilizadas con citrato sódico e inmovilizadas en una membrana preferiblemente de nailon. Este sensor no necesita de ningún tipo de tratamiento previo para su utilización, puesto que es un sensor sólido que se utiliza directamente en el momento de la determinación; posee características sostenibles y no es tóxico. Además, se trata de un sensor de tipo pasivo, es decir, no requiere de ninguna fuente externa de energía, por lo que su coste energético es nulo. Asimismo, destaca por su potencial de aplicación y sencillez, permitiendo la determinación cuantitativa y/o semicuantitativa de los sulfuros por simple observación visual, con límites de detección de 45 ppb (v/v) y cuantificación de 150 ppb (v/v) obtenidos por medición del color mediante reflectancia difusa y en 10 minutos de tiempo de exposición, si bien incrementando el tiempo de exposición a 30 minutos es posible conseguir límites de detección de 25 ppb (v/v). Presenta buena estabilidad a temperatura ambiente protegido por un film, permaneciendo estable por un período de tiempo de 3 meses.

20
25
30

Estado de la técnica

Los compuestos volátiles de sulfuro como el sulfuro de hidrogeno (H_2S), característico por su olor a huevos podridos, son unos gases tóxicos y dañinos para el medioambiente. Se forman principalmente por la descomposición de la materia orgánica y se suelen encontrar en la naturaleza en los gases volcánicos, el gas natural, el crudo del petróleo, aguas estancadas, etc. Sin embargo, las mayores cantidades de sulfuro de hidrógeno y otros compuestos sulfurados volátiles son generadas como consecuencia de actividades industriales como el procesado y refinado del petróleo/gas natural, plantas de tratamiento de aguas residuales, vertederos, etc. Según el Real Decreto 678/2014 que marca los objetivos para la mejora de la calidad del aire, la concentración media en treinta minutos de sulfuro de hidrógeno no debe superar los $100 \mu g/m^3$ (83 ppb v/v).

Otros compuestos volátiles de sulfuro relevantes son el metilmercaptano (CH_3SH) y el dimetilmercaptano ($(CH_3)_2S$). Estos compuestos, junto con el sulfuro de hidrógeno, son responsables del mal aliento y/o halitosis. La halitosis es un problema común que afecta a un 25% de personas, y se cree que un 50% de las personas la sufrirán en algún momento de su vida. Para las personas que la padecen, este problema puede suponer un obstáculo en su normal funcionamiento e interacción con la sociedad. En la actualidad, la halitosis sigue siendo un tema tabú y la investigación al respecto es muy limitada.

35
40
45
50

Según varios de los estudios analizados (*Analytica Chimica Acta* 2010, 661, 97; *International Oral Science* 2012, 4, 55; *Sensors and Actuators* 2009, 136, 73; *Med. Princ. Pract.* 2011, 20, 75) se puede concluir que concentraciones inferiores a los 100-200 ppb (v/v) estarían dentro del rango de la normalidad, mientras que valores iguales o superiores a los 300-400 ppb (v/v) producirían un olor oral persistente y diagnosticable como halitosis severa.

Una compilación de distintos tipos de métodos para monitorizar el sulfuro de hidrógeno puede encontrarse en *Trends in Analytical Chemistry*, 2012, 32, 87-99. En esta compilación se describen distintos tipos de sensores, desde los constituidos por óxidos de metales semiconductores hasta los basados en ondas acústicas superficiales.

Los métodos más utilizados para la detección de compuestos volátiles de sulfuro son los métodos cromatográficos de gases (*Health Science* 2014, 2, 80). Son métodos sensibles y precisos; sin embargo, presentan un coste económico elevado, y no son portátiles. Estos métodos requieren de tiempos de análisis relativamente largos, con múltiples etapas de acondicionamiento y preparación de la muestra que solo pueden ser realizadas por personal experimentado. Si bien se pueden utilizar para la detección de la halitosis, sin embargo especialistas como dentistas y médicos utilizan el halitómetro, un instrumento de coste inferior, portátil y más sencillo de utilizar. Pero este instrumento sigue siendo inaccesible para el consumidor debido a su coste elevado.

Otro de los métodos utilizado son los sensores electroquímicos, en los cuales se utilizan óxidos de metales semiconductores o polímeros conductores (*Trends in Analytical Chemistry*. 2012, 32, 87). Se basan en la absorción del sulfuro por parte del óxido metálico produciendo una señal eléctrica que puede monitorizarse en tiempo real. Sin embargo, en muchos casos presentan problemas considerables de estabilidad a factores ambientales.

Los sensores ópticos poseen ventajas en cuanto a su aplicabilidad y funcionalidad; permiten en muchos casos una detección en tiempo real y en el lugar de origen (*in situ*), con un coste energético nulo. Es por ello que suelen ser de los más utilizados entre la población en general por su coste, su simplicidad y rápida respuesta. Las tiras de acetato de plomo son un ejemplo: en presencia de sulfuros, cambian de color blanco a gris/negro formando sulfuro de plomo (PbS). Los límites de detección están en el rango de 5-10 mg/L (ppm) y su utilización, aunque frecuente, no es del todo recomendada, debido a la toxicidad del plomo que es neurotóxico (*Journal Air Pollution Control Association* 1966, 16, 328). También se pueden utilizar tubos colorimétricos comerciales, permiten detectar sulfuro de hidrógeno en concentraciones más bajas 0,2-5 mg/L, aunque con una reproducibilidad baja. Los tubos colorimétricos requieren de un muestreo activo con una fuente de energía externa, lo que supone un equipo específico para el muestreo y un coste energético a tener en cuenta.

Como sensor pasivo se describe en *Anal. Chem.* 2016, 88, 1553-1558 un sensor que permite determinar únicamente sulfuro de hidrogeno en concentraciones bajas. El sensor es una lámina de papel recubierta con $\text{Bi}(\text{OH})_3$ o sus derivados alcalinos a $\text{pH} = 11$, y requiere una etapa previa de acondicionamiento del sensor mediante la adición de NaOH. En presencia del gas, el sensor cambia de color de blanco a amarillo/marrón. Aunque presenta buenas características, no hay datos sobre su selectividad frente a otros gases, ni sobre su respuesta en muestras o atmósferas reales.

También se ha descrito en *ACS Appl. Mater Interfaces* 2014, 6, 6300-6307 la detección de sulfuro de hidrógeno en aire utilizando nanopartículas de oro, con un límite de detección visual de 0,5 ppm. En este caso, una muestra del gas a analizar se hace

burbujear en una disolución acuosa a la que a continuación se añaden las nanopartículas de oro, que no van inmovilizadas en ningún soporte, dejando incubar las soluciones durante unos minutos. Finalmente, las soluciones se someten a mediciones de espectrometría UV-visible.

5

También se ha descrito en US 2009/0140752 A1 el uso de films de nanopartículas que tienen iones metálicos incorporados para la detección de compuestos volátiles de azufre. Si bien se citan muchos iones metálicos como de posible utilización en ese documento, sin embargo los ensayos experimentales se realizan únicamente con films que llevaban incorporados iones de oro.

10

Finalmente, en *Sensors and Actuators B* 2016, 228, 4 71-479 se describe el uso de nanopartículas coloidales de plata en solución para su uso en la detección de compuestos órgano-sulfurados liberados durante la descomposición de las cebollas. Las nanopartículas de este documento son partículas esféricas de plata recubiertas con polietilenglicol y citrato trisódico, de unos 3-4 nm de tamaño medio, y se utilizan en forma de suspensión coloidal en un tubo colocado a la salida de gases de un desecador donde se colocan las cebollas en proceso de descomposición. En este documento, los inventores no observaron cambios visuales en el color de las nanopartículas de plata durante los primeros dos días, desarrollándose la coloración en los días siguientes hasta el décimo.

15

20

En consecuencia, el problema a ser resuelto en la presente invención es el de proporcionar un sensor colorimétrico sólido para la determinación de compuestos volátiles de sulfuro que mejore las características de los sensores conocidos de la técnica anterior, y concretamente que posibilite una detección sencilla, con una buena sensibilidad, de manera portátil (*in situ*) y de forma pasiva en tan solo 10 min. Este sensor presenta una selectividad adecuada para la monitorización de compuestos volátiles de sulfuro y se ha observado que no interfieren en la detección otros compuestos volátiles tales como las aminas, etanol o acetona. La sensibilidad es buena, con un límite de detección y de cuantificación de 45 ppb v/v y 150 ppb v/v respectivamente mediante reflectancia difusa. El sensor ha sido probado en 10 voluntarios sanos para la detección del mal aliento, en 4 de ellos antes y después de la ingesta de alimentos ricos en H₂S (ajo) como responsable del aumento de los niveles de sulfuros volátiles. También se ha aplicado con éxito a la detección de sulfuros en cañerías. Se trata de un sensor que no presenta toxicidad alguna, permite una detección directa de los sulfuros, en el lugar de origen y en tiempo real. Finalmente, además de lo anterior este sensor presenta uno de los costes más bajos de los existentes en el mercado para la detección de sulfuros volátiles a bajas concentraciones.

25

30

35

40

La solución a este problema se basa en el hecho de que los inventores han encontrado que es posible obtener un sensor colorimétrico con las ventajas indicadas mediante la inmovilización de nanopartículas de plata de un tamaño entre 10 y 40 nm en una membrana de nailon con un tamaño de poro inferior a 8 micras, preferiblemente entre 0,22 y 1 micra, más preferiblemente entre 0,22 y 0,47 micras, y lo más preferiblemente alrededor de 0,47 micras.

45

En consecuencia, en un primer aspecto la invención se dirige a un sensor colorimétrico pasivo para la detección y/o determinación de sulfuros volátiles en gases que comprende nanopartículas de plata con un diámetro entre 10 nm y 40 nm, inmovilizadas en una membrana de nailon que tiene un tamaño de poro entre 0,22 y 1 micras.

50

En un segundo aspecto, la invención se dirige a un método de fabricación de un sensor colorimétrico pasivo para la detección y/o determinación de sulfuros volátiles en gases,

que comprende la etapa de hacer pasar una suspensión de nanopartículas de plata por un filtro que contiene una membrana de nailon, de manera que las nanopartículas de plata se depositan y quedan inmovilizadas en dicha membrana. Para ello, en una realización preferida se toma un volumen de nanopartículas de plata del diámetro requerido, por ejemplo con una jeringa de plástico, y a continuación se hacen pasar las nanopartículas de plata a través de un filtro que contiene la membrana de nailon, donde quedan inmovilizadas. En caso de que sea necesario o conveniente, el resto de la suspensión de nanopartículas que no han quedado inmovilizadas se puede volver a hacer pasar por el filtro con objeto de conseguir una mayor cantidad de nanopartículas en éste.

En un tercer aspecto, la invención se dirige a un método de detección y/o determinación de sulfuros volátiles en gases que comprende las etapas de:

- a) exponer el sensor anteriormente descrito a un gas que contiene sulfuros volátiles durante un tiempo entre 2 y 60 minutos, preferiblemente alrededor de 10 minutos;
- b) extraer el sensor y determinar su coloración mediante inspección visual, reflectancia difusa o análisis de color RGB de una imagen digital del sensor expuesto;
- c) a partir de los datos obtenidos en la etapa b), determinar la concentración de sulfuros volátiles en el gas mediante rectas de calibrado o patrones de color.

En un cuarto aspecto, la invención se dirige al uso del sensor calorimétrico pasivo para la detección y/o determinación de sulfuros volátiles en gases tales como la atmósfera, atmósferas de recintos cerrados tales como aquellos en los que se produce una evolución de gases por causa de, por ejemplo, el almacenamiento de productos vegetales, la cría de animales de granja, los recintos de tratamiento de aguas residuales, vertederos, desagües y cañerías, así como en el aliento humano para la detección de la halitosis.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1: Esquema explicativo del proceso de agregación de las nanopartículas de plata del sensor de la invención en presencia de sulfuros volátiles.

Figura 2: Representación de los valores de absorbancia en función de la longitud de onda para nanopartículas de plata de 20 nm inmovilizadas en membranas de A) nailon (figura izquierda), B) fibra de vidrio (figura central) y C) papel de celulosa (figura derecha) en concentraciones de H₂S de a) 0 ppb (v/v), b) 250 ppb y c) 1000 ppb (v/v). Se han añadido las fotografías de los sensores y su respuesta en presencia de H₂S a 1000 ppb (v/v).

Figura 3. Fotografía de los sensores y obtención de la curva de calibrado mediante la representación del cociente entre la absorbancia a 550 nm y a 415 nm frente al logaritmo de las siguientes concentraciones de H₂S: a) 0, b) 150, c) 250, d) 500, e) 1000, f) 1500, g) 2500 ppb v/v.

Figura 4. A) Valores obtenidos a partir de la curva de calibrado para 10 voluntarios sanos. B) Valores obtenidos para 4 voluntarios sanos antes (columna izquierda) y después (columna derecha) de la ingesta de alimentos ricos en H₂S.

Descripción detallada de la invención

El objetivo de la presente invención es el de proporcionar un sensor colorimétrico pasivo para la determinación de compuestos volátiles sulfurados en bajas concentraciones con aplicaciones en el campo de la salud, detección del mal aliento que puede estar relacionada con periodontitis o gingivitis (*Sensors and Actuators B* 2009, 136, 73), y también con aplicaciones ambientales, el control de sulfuro de hidrógeno en lugares críticos (tratamientos de aguas residuales, vertederos, desagües, cañerías, procesamiento del petróleo, etc.) con el fin de cumplir con la normativa establecida al respecto (Real Decreto 678/2014). En general el sensor es utilizable para la determinación de sulfuro en cualquier tipo de matriz en la que exista o se generen la formación de este tipo de compuestos. Hasta la fecha no se han descrito sensores suficientemente sensibles y selectivos que permitan una monitorización *in situ* y en tiempo real.

La necesidad de este tipo de sensores ha sido resuelta utilizando nanopartículas de plata inmovilizadas en una membrana de nailon. Las nanopartículas de plata interactúan con los sulfuros ($R-S^-$ y S^{2-}) debido a la afinidad de la plata por el azufre. El resultado de esta interacción provoca cambios de color, de amarillo a ocre/marrón. Según creen los inventores, las nanopartículas de plata se agregan como consecuencia de la presencia de compuestos de sulfuro, lo que provoca que la banda característica de las nanopartículas de plata polidispersas, situada a una longitud de onda de 415 nm, se desplace a mayores longitudes de onda (550 nm) y se haga más ancha según aumenta el grado de agregación de las mismas en una relación directa con la concentración de sulfuros ($-S^{2-}$ y $R-S^-$), según se observa en el esquema explicativo que se muestra en la Figura 1. Sin embargo, ahora se ha encontrado sorprendentemente que este efecto varía de una manera muy notable dependiendo de en qué sustrato se inmovilizan las nanopartículas, de manera que, cuando se inmovilizan sobre membranas de nailon, se obtiene una retención mucho mayor de nanopartículas de plata, y además los sensores tienen un color amarillo más intenso, que cuando se usan otros soportes tales como el papel de celulosa o la fibra de vidrio. Además, también se ha determinado el tamaño de poro óptimo de la membrana de nailon, siendo este inferior a 8 micras, preferiblemente entre 0,22 y 1 micra, y más preferiblemente entre 0,22 y 0,47 micras. En la presente invención es posible utilizar nanopartículas de plata con un tamaño entre 10 y 60 nm, si bien son preferibles los tamaños entre 10 y 40 nm, y aún más preferibles los tamaños entre 10 y 20 nm, por presentar una mayor sensibilidad.

Este sensor tiene las ventajas de un sensor sólido portátil y pasivo, por lo que no requiere fuente de energía externa, ni tampoco preparación previa o pretratamiento. La respuesta se obtiene en tan solo 10 minutos. En una realización preferida de la invención, en este momento (es decir, después de la exposición a la muestra de gases que contiene sulfuros) los sensores se impregnan con glicerol, lo que tiene por objeto mejorar la lectura del color, sobre todo cuando se hace por inspección visual. Esta impregnación se hace preferiblemente añadiendo unas gotas de glicerol (unos 50 μ L) en el centro del sensor y esparciéndolas con una varilla o espátula, de manera que quede bien distribuido por toda la superficie del sensor. La impregnación con glicerol debe hacerse después de la exposición del sensor a los gases que contienen sulfuros, ya que los inventores han encontrado que, si se hace antes, los sensores no muestran respuesta, lo que se cree que es debido a que en esas circunstancias las AgNPs no se agregan.

Uno de los principales problemas de la utilización de las nanopartículas de plata, a diferencia de otras nanopartículas tales como las de oro, cuya síntesis y comportamiento se conoce con más detalle, es la obtención de las nanopartículas con buena dispersidad de tamaños. Para evitar este problema, en realizaciones de la invención se han utilizado nanopartículas comerciales con el fin de evitar los citados problemas de irreproducibilidad

que podrían provenir de partículas no polidispersas, lo que afectaría directamente a la sensibilidad y a la selectividad del sensor.

5 Después del muestreo, el sensor es preferiblemente impregnado con glicerol, obteniéndose un incremento en la intensidad del color. Los investigadores creen que el glicerol estabiliza las nanopartículas de plata. La impregnación con glicerol no es, sin embargo, un elemento esencial para la invención, sino que únicamente incrementa la intensidad del color y en consecuencia la sensibilidad del proceso. La invención podría llevarse a cabo igualmente sin la impregnación con glicerol, lo que únicamente
10 redundaría en un aumento de los límites de detección y de determinación de los sulfuros por parte del sensor.

15 Una vez coloreado el sensor, la intensidad del color se puede monitorizar por inspección visual, por análisis digital de los valores de color rojo, verde y azul (RGB) de una fotografía del sensor obtenida mediante un dispositivo de grabación o captura de imágenes tal como un teléfono móvil, así como también por reflectancia difusa.

20 Otro de los principales problemas del uso de nanopartículas de plata es su estabilidad frente a factores externos como la luz. Este problema se ha solventado inmovilizando las nanopartículas en membranas de nailon; esto las mantiene estables durante 3 meses a temperatura ambiente.

Ejemplos experimentales

25 Ejemplo 1: Optimización del sensor

Como se ha mencionado, el diseño del sensor se basa en la inmovilización de nanopartículas de plata recubiertas de citrato comerciales (Aldrich, dispersión de 0,02 mg/mL de nanopartículas de plata de 10, 20 o 40 nm de tamaño de partícula (TEM) estabilizadas con citrato sódico en tampón acuoso) en una membrana o soporte.
30

Se probaron diferentes soportes para su inmovilización: nailon, papel de celulosa y fibra de vidrio. Se observó que el nailon presentaba una mayor retención de las nanopartículas y los sensores tenían un color amarillo más intenso, mientras que las partículas inmovilizadas en la fibra de vidrio se agregaban formando pequeños cristales. Los sensores fueron testados frente a patrones gaseosos de H₂S de 250 y 1000 ppb (v/v). Únicamente el sensor preparado en soporte de nailon mostró una respuesta distinta para cada concentración, véase la Figura 2.
35

40 Una vez seleccionadas las membranas de nailon como soporte más preferido, se testaron con diferentes tamaños de poro en las mismas. Los resultados experimentales mostraron que la retención de las nanopartículas de plata, así como la sensibilidad del método, fue similar para las membranas con tamaño de poro de entre 0,22 y 0,47 micras. Sin embargo al utilizar membranas con un tamaño de poro de 8 micras la retención fue inferior, dando lugar a sensores de un color amarillo más claro, por lo que resultaba mas difícil distinguir el cambio de color.
45

Se inmovilizaron nanopartículas de plata recubiertas con citrato de diferentes tamaños de diámetro: 10 nm, 20 nm y 40 nm. Todas ellas dieron respuesta positiva a la presencia de diferentes concentraciones de sulfuro, cambiando el sensor de color amarillo a ocre y después marran. La sensibilidad fue similar para el caso de las nanopartículas de 10 nm y 20 nm (LOD = 45 ppb), mientras que para las de 40 nm se observó una peor sensibilidad (LOD = 200 ppb).
50

Para la inmovilización de las nanopartículas de plata en los distintos soportes se utilizaron diferentes técnicas: por deposición, por inmersión y mediante filtrado. Los mejores resultados se obtuvieron mediante filtrado, y los sensores presentaron una intensidad de color mayor, con un tiempo de preparación mucho menor (unos pocos minutos).

5

Ejemplo 2: Preparación del sensor

Se tomó una jeringa (2 mL) de plástico, se acoplo un filtro de plástico y se incorporó una membrana de nailon, previamente recortada a la medida del filtro, con el fin de que la membrana ocupase toda la superficie del filtro. Se tomaron entonces con la jeringa entre 0,2 mL y 1 mL de nanopartículas de plata recubiertas con citrato comerciales Aldrich de 20 nm de diámetro y 0,02 mg/mL de concentración en AgNPs, y se hicieron pasar a través del filtro con la membrana de nailon incorporada al mismo. Una vez pasadas las nanopartículas a través del filtro, la dispersión sobrante se volvió a pasar dos veces más por la membrana, con el fin de retener la mayor cantidad posible de nanopartículas de plata, llegándose a alcanzar una retención de alrededor de 60% de las nanopartículas de plata (0.0024 ± 0.0002 mg para las condiciones ensayadas de 0,2 mL de dispersión tomada con la jeringa). Finalmente, los sensores se cubrieron con un film (parafilm) y se guardaron a temperatura ambiente.

10
15
20

Ejemplo 3: Generación de patrones de sulfuros gaseosos

Con el fin de evaluar la respuesta del sensor frente a diferentes concentraciones de sulfuros volátiles, se generó una serie de patrones de sulfuro en aire tomando como modelo diversos estudios en los que la atmósfera de sulfuros se genera añadiendo una disolución ácida a una disolución de sulfuro de sodio (Na_2S) o de metilmercaptano sódico (CH_3SNa). El ácido añadido facilita la volatilización de los compuestos de sulfuro.

25

Para ello, se prepararon disoluciones de sulfuros de concentraciones conocidas así como una disolución de ácido fosfórico al 85%. Para generar la atmósfera correspondiente, se utilizaron botellas de dilución estática de 2 L sujetas por el cuello con una pinza a pie o soporte y sobre un sistema de agitación. En primer lugar, se introdujeron en la botella el imán agitador y el sensor al cual se le había hecho pasar un hilo, de manera que este quedaba colgando dentro de la botella de dilución estática. A continuación se añadieron 0,1 mL de ácido fosfórico al 85% y se tapó la botella. Finalmente, se añadió con una jeringa a través del septum de la botella de dilución estática una disolución acuosa de sulfuro de sodio de 50 mg/L y se dejó en agitación durante 10 minutos. Una vez pasados los diez minutos, el sensor se impregnó con glicerol y su respuesta analítica se midió por reflectancia difusa o bien se obtuvo la imagen digital del sensor y se realizó el análisis de color RGB, obteniéndose los valores correspondientes.

30
35
40

Ejemplo 4: Evaluación de la respuesta del sensor frente a patrones gaseosos de sulfuros

Se evaluó a continuación la respuesta de los sensores frente a compuestos volátiles tales como el sulfuro de hidrógeno (H_2S), el metilmercaptano (CH_3SH) y el dimetilmercaptano ($(\text{CH}_3)_2\text{S}$), siendo el sulfuro de hidrogeno y el metilmercaptano los principales responsables de la halitosis. El sensor presentó respuesta positiva frente al sulfuro de hidrogeno con límites de detección y cuantificación de 45 ppb (v/v) y 150 ppb (v/v) respectivamente, mientras que para el metilmercaptano los límites de detección y cuantificación fueron de 200 ppb (v/v) y 666 ppb (v/v), respectivamente. No se observó respuesta alguna por la presencia de dimetilmercaptano.

45
50

La Figura 3 muestra el cociente entre la absorbancia a 550 nm (correspondiente al máximo de la banda de nanopartículas agregadas) y la absorbancia a 415 nm

(correspondiente al máximo de la banda de las nanopartículas de plata sin agregar) frente al logaritmo de la concentración de hidrógeno de sulfuro a 0, 150, 250, 500, 1000, 1500, 2500 ppb (v/v). La respuesta del sensor puede seguirse por reflectancia difusa, por inspección visual tal y como puede observarse en la fotografía, y también mediante el análisis RGB de la fotografía tomada utilizando un dispositivo móvil. La recta de calibrado obtenida mediante reflectancia difusa fue la siguiente:

$$A_{550}/A_{415} = (0,31 \pm 0,02) \text{ Log } C_{\text{ppb (v/v)}} - (0,58 \pm 0,05), R^2 = 0,990 \quad (\text{ecuación 1})$$

También fue posible obtener una recta de calibrado mediante el análisis RGB de la fotografía tomada:

$$\text{RGB del rojo} = (-0,056 \pm 0,018) C_{(\text{ppb v/v})} + (253 \pm 3), R^2 = 0,991 \quad (\text{ecuación 2})$$

La respuesta de los sensores fue evaluada a diferentes tiempos de exposición. Se eligió un tiempo de exposición de 10 minutos como compromiso entre la intensidad de la señal obtenida y un tiempo de muestreo adecuado.

Ejemplo 5: Evaluación de la respuesta del sensor en muestras reales

Para evaluar si el sensor colorimétrico puede ser aplicado para la detección de halitosis, se hizo soplar de forma independiente a 10 voluntarios sanos dentro de bolsas de plástico utilizadas para el muestreo en aire, en las cuales se había introducido previamente el sensor en su interior. Después de 10 minutos de estar en contacto con el aliento de los voluntarios, el sensor se extrajo, se impregno con glicerol, se obtuvo la imagen digital y se procesó la misma obteniéndose las coordenadas de color RGB y/o su intensidad de color se midió por reflectancia difusa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3, donde se observa que las concentraciones obtenidas están por debajo de las concentraciones consideradas como de mal aliento persistente o halitosis severa.

Además, se hizo un estudio sobre el efecto de la ingesta de alimentos ricos en H_2S en el aliento. El ajo es utilizado tradicionalmente en la cocina mediterránea y posee propiedades muy beneficiosas para el organismo, siendo la más conocida su poder como antibiótico. Sin embargo, el consumo de este alimento provoca mal aliento debido a la presencia de sulfuros volátiles. En este estudio se evaluaron 4 voluntarios antes y después de ingerir una salsa rica en ajo. En la Figura 4B se observa como los niveles de sulfuros volátiles efectivamente aumentan inmediatamente después de consumir este producto.

A continuación se fortificaron las muestras, es decir, se añadieron a las mismas una cantidad de 0, 250, 300 o 500 ppb de sulfuro. Para ello, se utilizaron volúmenes de 0-100 μL de una disolución patrón de 50 mg/L de Na_2S , y 100 μL de ácido fosfórico al 85%, en bolsas de plástico de una capacidad de 2 L donde previamente había soplado el voluntario. Se esperaron 10 min, se sacaron los sensores de las bolsas y se impregnaron con glicerol. Finalmente, se obtuvieron las imágenes digitales y/o se midieron los sensores por reflectancia difusa.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para la recuperación en % de las muestras indicadas. Las recuperaciones en % se calcularon de la siguiente manera:

- A (columna 1): Fortificación o cantidad añadida de sulfuro (ppb) a las muestras;
- B (columnas 2, 4, 6 y 8): Detección (en ppb) de la muestra fortificada. Esta concentración se obtiene a partir la medición del color de los sensores y su

interpolación en la recta de calibrado correspondiente según el método utilizado, es decir, reflectancia difusa o análisis RGB de las imágenes digitales (en las rectas de calibrado ecuaciones 1 y 2, respectivamente).

- 5 - C (primera fila a ppb = 0): Concentración de sulfuros en la muestra calculada a partir de la medición del color de los sensores por reflectancia difusa y su interpolación en la recta de calibrado que es la ecuación 1. Se obtuvieron los valores 145 y 116 ppb para el voluntario 1 y el voluntario 2, respectivamente. También se calcularon los valores mediante el análisis RGB del color rojo de las imágenes digitales utilizando el programa informático GIMP (ecuación 2). Los valores obtenidos fueron 151 y 115 ppb para el voluntario 1 y el voluntario 2, respectivamente.

Entonces:

15 $Recuperación (\%) = (B-C)/A \times 100$

Por ejemplo, para una fortificación de 250 ppb:

20 $Recuperación (\%) = (392-145)/250 \times 100 = 99\%$

Muestras fortificadas en (ppb):	Voluntario 1				Voluntario 2			
	Reflectancia Difusa		Imágenes digitales(GIMP)		Reflectancia Difusa		Imágenes digitales(GIMP)	
	Detección (ppb)	Recuperación (%)	Detección (ppb)	Recuperación (%)	Detección (ppb)	Recuperación (%)	Detección (ppb)	Recuperación (%)
0	145	-	151	-	116	-	115	-
250	392	99	367	91	429	117	349	96
300	506	113	475	105	464	111	421	101
500	666	103	601	92	672	109	637	103

Tabla 1: Valores y recuperaciones de 2 muestras fortificadas de voluntarios sanos obtenidos por reflectancia difusa y mediante el RGB de las fotografías de los sensores.

Los resultados demuestran que el sensor colorimétrico de la invención es capaz de detectar sulfuros en gases a través de una manera fácil, sencilla y rápida, por simple inspección visual. El sensor desarrollado es un dispositivo sólido, ligero y portátil, que presenta buenos límites de detección y de cuantificación- 45 ppb v/v y 150 ppb v/v, respectivamente, mediante reflectancia difusa-, pudiendo ser aplicado para la detección/control de la halitosis severa. Es un sensor ecológico, no presenta toxicidad alguna tanto las personas como para el medioambiente, su coste de fabricación es bajo y presenta una vida útil de 3 meses.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sensor sólido calorimétrico pasivo para la detección y/o determinación de sulfuros volátiles en gases que comprende nanopartículas de plata con un diámetro entre 10 nm y 40 nm inmovilizadas en una membrana de nailon que tiene un tamaño de poro entre 0,22 micras y 1 micra.
- 10 2. Sensor de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las nanopartículas de plata tienen un diámetro de 20 nm.
3. Sensor de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que las nanopartículas de plata están estabilizadas con citrato sódico.
- 15 4. Sensor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la membrana de nailon posee un tamaño de poro de 0,47 micras.
- 20 5. Sensor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se impregna con glicerol después de la exposición a sulfuros volátiles en gases pero antes de su detección y/o determinación.
- 25 6. Método de fabricación del sensor sólido calorimétrico pasivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 anteriores que comprende hacer pasar una suspensión de nanopartículas de plata con un diámetro de partícula entre 10 nm y 40 nm por una membrana de nailon que tiene un tamaño de poro entre 0,22 micras y 1 micra, de modo que al menos una parte de las nanopartículas de plata se depositan y quedan inmovilizadas en dicha membrana.
7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende las siguientes etapas:
- 30 a) proporcionar una jeringa de plástico de 2 mL a la que se acopla un filtro;
- b) introducir en el filtro la membrana de nailon recortada al tamaño del mismo; y
- 35 c) hacer pasar a través de la membrana de nailon una cantidad entre 0,2 mL y 1 mL de una dispersión de nanopartículas de plata que tiene una concentración de nanopartículas de plata de 0,02 mg/mL.
- 40 8. Método de acuerdo con la reivindicación 7 en el que, después de la etapa c), la parte de la dispersión de nanopartículas de plata que no ha quedado retenida en la membrana de nailon se recoge y se vuelve a hacer pasar por la membrana hasta dos o tres veces más.
- 45 9. Método de detección y/o determinación de sulfuros volátiles en gases o en matrices que emitan sulfuros volátiles, que comprende las etapas de:
- 50 a) exponer el sensor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 a un gas o matriz que emita sulfuros volátiles durante un tiempo entre 2 y 60 minutos;
- b) extraer el sensor y determinar su coloración mediante inspección visual, reflectancia difusa o análisis de color RGB de una imagen digital del sensor;
- c) a partir de los datos obtenidos en la etapa b), determinar la concentración de sulfuros volátiles en el gas mediante rectas de calibrado o patrones de color.

10. Método de detección y/o determinación de sulfuros volátiles en gases de acuerdo con la reivindicación 9 que comprende la etapa adicional de impregnar el sensor con glicerol después de la exposición al gas que contiene sulfuros volátiles pero antes de su detección y/o determinación.
- 5
11. Método según la reivindicación 10, en el que la impregnación del sensor con glicerol se realiza depositando unas gotas de glicerol sobre el sensor y esparciéndolo con una espátula o varilla a fin de distribuirlo homogéneamente por toda la superficie del sensor.
- 10
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 en el que los gases que contienen sulfuros volátiles proceden de la respiración humana.
13. Uso de un sensor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 anteriores en la detección y/o determinación de sulfuros volátiles en gases o en cualquier matriz en la que existan o se generen sulfuros volátiles.
- 15
14. Uso según la reivindicación 13 en el que los gases proceden de la atmósfera o de recintos cerrados o abiertos.
- 20
15. Uso según la reivindicación 14 en el que los recintos se seleccionan de entre recintos para el procesado y refinado del petróleo o gas natural, plantas de tratamiento de aguas residuales, vertederos, desagües y cañerías.
- 25
16. Uso según la reivindicación 13, en el que los gases proceden de la respiración humana, para la determinación de la halitosis.

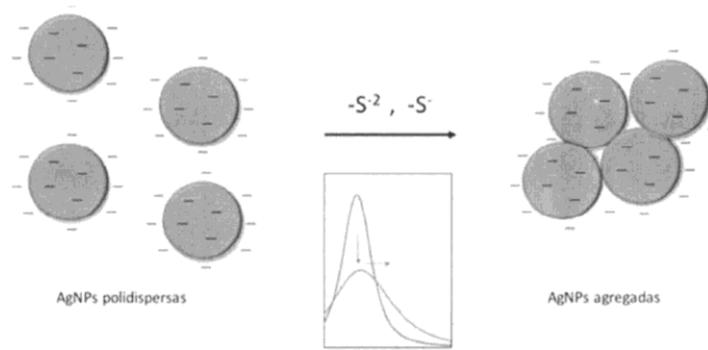


Fig. 1

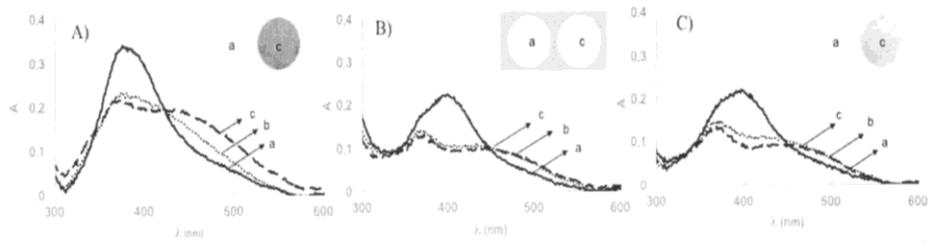


Fig 2.

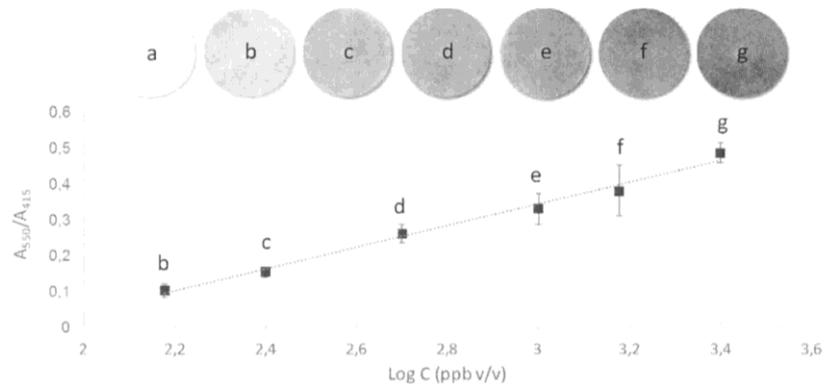


Fig. 3

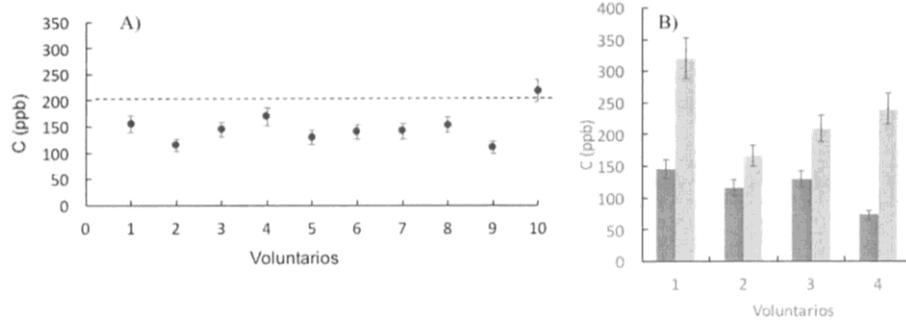


Fig. 4



- ②① N.º solicitud: 201600440
②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.05.2016
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	CHEN, Rui; MORRIS, Hannah R.; WHITMORE, Paul M. Fast detection of hydrogen sulfide gas in the ppmv range with silver nanoparticle films at ambient Conditions. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013, Vol. 186, p. 431-438; apartados 1-2.	1-16
A	AKAMATSU, Kensuke, et al. Preparation and characterization of polymer thin films containing silver and silver Sulfide nanoparticles. Thin Solid Films, 2000, vol. 359, no 1, p. 55-60; apartado 3.1.	1-16
A	MORALES-LUCKIE, Raúl A., et al. Facile solventless synthesis of a nylon-6, 6/silver nanoparticles composite And its XPS study. International Journal of Polymer Science, 2013, vol. 2013; apartado 4.	1-16
A	SHANMUGARAJ, Krishnamoorthy; ILANCHELIAN, Malaichamy. Colorimetric determination of sulfide using chitosan-capped silver nanoparticles. Microchimica Acta, 2016, vol. 183, no 5, p. 1721-1728, todo el documento.	1-16

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
28.10.2016

Examinador
V. Balmaseda Valencia

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N21/29 (2006.01)

B82Y30/00 (2011.01)

G01N33/00 (2006.01)

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

G01N, B82Y

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, XPESP, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.10.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-16	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	CHEN, Rui; MORRIS, Hannah R.; WHITMORE, Paul M. Fast detection of hydrogen sulfide gas in the ppmv range with silver nanoparticle films at ambient Conditions. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013, Vol. 186, p. 431-438; apartados 1-2.	
D02	AKAMATSU, Kensuke, et al. Preparation and characterization of polymer thin films containing silver and silver Sulfide nanoparticles. Thin Solid Films, 2000, vol. 359, no 1, p. 55-60; apartado 3.1.	
D03	MORALES-LUCKIE, Raúl A., et al. Facile solventless synthesis of a nylon-6, 6/silver nanoparticles composite And its XPS study. International Journal of Polymer Science, 2013, vol. 2013; apartado 4.	
D04	SHANMUGARAJ, Krishnamoorthy; ILANCHELIAN, Malaichamy. Colorimetric determination of sulfide using chitosan-capped silver nanoparticles. Microchimica Acta, 2016, vol. 183, no 5, p. 1721-1728, todo el documento.	

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

El objeto de la presente invención es un sensor sólido colorimétrico para la detección y/o determinación de sulfuros volátiles en gases que comprende nanopartículas de plata inmovilizadas en una membrana de nailon.

El documento D01 describe un sensor óptico que permite la detección de sulfuros volátiles a temperatura ambiente. Dicho sensor está basado en una fina película de nanopartículas de plata, con un tamaño medio de 10nm, estabilizadas polietilenimina que ese deposita en el fondo de una cubeta de vidrio. Se consiguen detecciones en el orden de partes por millón en volumen mediante espectroscopia por resonancia de plasmones superficiales localizados (apartados 1-2).

El documento D02 se refiere a delgadas películas de nailon conteniendo nanopartículas de plata y de sulfuro de plata. Mediante la técnica de relajación termal se depositan sobre finas películas de nailon (130nm) nanopartículas de plata con un tamaño medio comprendido entre 4,5-9,1nm. Posteriormente, las fibras resultantes se someten a una corriente de H₂S/O₂ dando lugar a la formación de nanopartículas de sulfuro de plata con un tamaño comprendido entre 4,7-11,2 nm (apartado 3.1)

En el documento D03 se estudia la síntesis de nanopartículas de plata soportadas sobre membranas de nailon mediante impregnación con una solución acuosa de plata y se lleva a cabo reducción química con NaBH₄ a temperatura ambiente. Las nanopartículas de plata depositadas sobre las fibras de nailon tienen un tamaño medio de 3,3 nm (apartado 4).

El documento D04 describe un ensayo colorimétrico para una detección selectiva y de alta sensibilidad de sulfuros mediante un sensor colorimétrico de nanopartículas de plata recubiertas de quitosano. En concreto, se añade una solución de sulfuro sódico a una solución de nanopartículas de plata recubiertas de quitosano observándose un cambio de color de amarillo a incoloro, siendo a las especies de dominantes H₂S y HS⁻ a un pH=7 (todo el documento).

La diferencia entre el objeto de la invención y los documentos D01-D04 radica en que ninguno de dichos documentos divulga un sensor colorimétrico para la detección de sulfuros volátiles que comprenda nanopartículas de plata con un diámetro entre 10nm-40nm inmovilizadas en una membrana de nailon con un tamaño de poro de 0,47 micras con un límite de detección y de cuantificación de 45ppb v/v y 150 ppb v/v, respectivamente, mediante reflectancia difusa.

Asimismo, dicho sensor no se consideraría obvio para un experto en la materia a partir de los documentos citados.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones es nuevo e implica actividad inventiva conforme establecen los Artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.