(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 719 926**

(21) Número de solicitud: 201830039

(51) Int. Cl.:

G01N 30/00 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

15.01.2018

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

16.07.2019

(71) Solicitantes:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES

(72) Inventor/es:

RAMOS PAYÁN, María y
LLOBERA ADAN, Andreu

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

(54) Título: **DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO Y MÉTODO PARA MULTIEXTRACCIÓN**

(57) Resumen:

Dispositivo microfluídico y método para multiextracción.

El objeto de la presente invención es un dispositivo microfluídico, portátil y reutilizable, para multiextracción simultánea de un primer elemento contenido en una primera disolución donadora y de un segundo elemento contenido en una segunda disolución donadora, mediante el uso una misma disolución aceptora en una sola etapa.

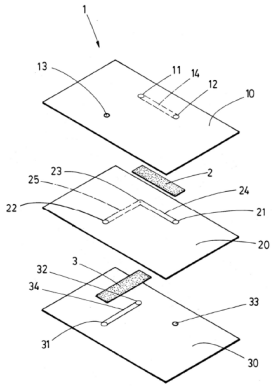

FIG.1

ES 2 719 926 A1

DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO Y MÉTODO PARA MULTIEXTRACCIÓN

D E S C R I P C I Ó N

OBJETO DE LA INVENCIÓN

El objeto de la presente invención es un dispositivo microfluídico, portátil y reutilizable, para multiextracción simultánea de un primer elemento contenido en una primera disolución donadora y de un segundo elemento contenido en una segunda disolución donadora, mediante el uso una misma disolución aceptora y en una sola etapa de análisis.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Actualmente, los procedimientos de microextracción en fase liquida son muy selectivos para la extracción de compuestos que presentan estructuras y propiedades similares, o de otra manera, pertenecientes a la misma familia. Sin embargo, si se quiere extraer una gran cantidad de compuestos de diferente naturaleza (y familia) se requiere diferentes procedimientos de extracción en diferentes etapas, lo que conlleva a un gasto doble de disolventes, materiales y tiempo de análisis.

Un ejemplo de procedimientos de microextracción es la microextracción en fase líquida (LPME, del inglés "*Liquid phase Microextraction*") en donde en la modalidad de tres fases, los analitos se extraen desde una fase acuosa (fase disolución donadora) hacia otra fase acuosa (fase o disolución aceptora), atravesando los poros de una membrana plana de polipropileno que soporta una membrana líquida (fase orgánica), actuando de barrera entre la fase donadora y la fase aceptora.

El mecanismo de acción de la microextracción es la difusión pasiva, que depende tanto del pH, de la composición de la fase aceptora y donadora y del tipo de disolvente orgánico con el que se impregna la membrana, que debe ser de la polaridad adecuada según el tipo de analito que se pretende extraer. Por otro lado, para el caso de los dispositivos microfluídicos influye la velocidad de flujo mientras que en los tradicionales afecta la velocidad de agitación

Esta modalidad de extracción se emplea cuando se pretende extraer analitos básicos o ácidos con grupos ionizables; de esta forma el analito se encuentra en la forma neutra en la

fase donadora, e ionizado en la fase aceptora. En el caso de extracción de los analitos básicos se encuentran protonados en la fase aceptora y viceversa para analitos ácidos.

Otro ejemplo de procedimientos de microextracción es la microextracción en fase líquida mediante electromembranas (EME, del inglés *Electromembrane Extraction*) en 3 fases se lleva a cabo gracias a un gradiente de un campo eléctrico generado entre dos electrodos a través de una membrana.

La configuración de la EME es similar a la de LPME; a excepción de la adición de dos electrodos (uno en la fase aceptora y otro en la donadora). De esta manera, se favorece el transporte del analito desde la fase donadora hacia la aceptora a través de la membrana líquida soportada, gracias al campo eléctrico generado cuando se aplica una diferencia de potencial entre ambos electrodos.

Para que se lleve a cabo la extracción los analitos deben estar ionizados en ambas fases. La extracción de analitos básicos (protonados en ambas fases) se lleva a cabo colocando el electrodo positivo en la fase donadora y el negativo en la fase aceptora; y viceversa en el caso de la extracción de analitos ácidos.

Los parámetros que afectan a la EME son el pH, el disolvente orgánico (que debe ser conductor de la electricidad) y el voltaje aplicado del cual depende la transferencia del analito. En el caso de sistemas microfluídicos dependerá también de la velocidad de flujo; o de la velocidad de agitación en sistemas tradicionales, como ocurre con la LPME.

Actualmente, estas microextracciones se realizan por separado, es decir en diferentes etapas, por LPME o bien por EME, y como consecuencia, se obtienen dos extractos diferentes, ya que hay dos disoluciones aceptoras diferentes con concentraciones y pH diferentes. Esto hace que las inyecciones en el instrumento de análisis se analicen por separado ya que si se mezclan ambos extractos obtenidos de diferentes extracciones, el volumen final aumenta, y la disolución se diluye. Y consecuentemente, disminuirá los límites de detección y cuantificación de las técnicas empleadas, que son parámetros críticos para la determinación posterior de dichos analitos en muestras reales donde se encuentra en muy baja concentración.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Un primer aspecto de la invención se refiere a un dispositivo microfluídico para la multiextracción simultánea, mediante una misma disolución aceptora, de un primer elemento que comprende al menos un primer compuesto contenido en una primera disolución donadora y de un segundo elemento que comprende al menos un segundo elemento contenido en una segunda disolución donadora.

Donde el primer compuesto y el segundo compuesto se refiere a cualquier compuesto ácido o básico cuyo grupo funcional permita su extracción. Ejemplos de dicho primer y segundo compuesto incluyen entre otros parabenos, fluoroquinolonas, antiinflamatorios no esteroideos, polifenoles, disruptores endocrinos, sulfonamidas y tetraciclinas.

Este dispositivo microfluídico está diseñado para que las extracciones que se llevan a cabo puedan realizarse empleando diferentes técnicas, bien LPME o EME, o ambas simultáneamente, permitiendo la extracción del primer elemento y el segundo elemento pudiendo ser de diferente naturaleza independientemente de que sean compuestos ácidos o básicos.

Más concretamente, el dispositivo microfluídico comprende

- una primera capa configurada para recibir y conducir la primera disolución donadora,
- una segunda capa configurada para recibir y conducir la disolución aceptora ,
- una tercera capa configurada para recibir y conducir la segunda disolución donadora,
- una primera membrana que separa la primera capa y la segunda capa y que está configurada para permitir el paso del primer elemento, y
- una segunda membrana que separa la segunda capa y la tercera capa y que está configurada para permitir el paso del segundo elemento,
- en donde la primera y la segunda membrana permiten la multiextracción simultanea del primer elemento y el segundo elemento sin mezclar la primera y la segunda disolución donadora.

Más concretamente, la primera membrana comprende:

- una primera cara superior configurada para entrar en contacto con la primera disolución donadora,
- una primera cara inferior configurada para entrar en contacto con la disolución aceptora , y
- en donde la primera membrana permite el paso del primer elemento desde la primera cara superior hasta la primera cara inferior.

Mientras que la segunda membrana comprende:

- una segunda cara superior configurada para entrar en contacto con la disolución aceptora ,
- una segunda cara inferior configurada para entrar en contacto con la segunda disolución donadora, y
- en donde la segunda membrana permite el paso del segundo elemento desde la segunda cara inferior hasta la segunda cara superior.

Preferentemente, la primera y la segunda membrana son membranas planas que permiten realizar dos extracciones en continuo, y son compatibles con las técnicas LPME, o EME para extraer el primer y el segundo elemento.

Sin embargo, debido a que este dispositivo microfluídico es reutilizable y ambas membranas no están en contacto, también ofrece la posibilidad de utilizar diferentes membranas en caso de que algunos compuestos mejoren con otras membranas incrementando así la versatilidad del dispositivo microfluídico.

Por otro lado, la primera capa comprende:

- una primera cara anterior,
- una primera cara posterior,
- un primer orificio de entrada, que se desarrolla desde la primera cara anterior hasta la cara posterior para a permitir la entrada de la primera disolución donadora con el primer elemento,
- un primer orificio de salida, que se desarrolla desde la primera cara anterior hasta la cara posterior, para permitir la salida de la primera disolución donadora sin el primer elemento en al menos un 50%, preferiblemente en al menos un 65%, y más preferiblemente en al menos un 80%, y
- un primer orificio de interconexión, que se desarrolla desde la primera cara anterior hasta la cara posterior, para ser vinculado con un tubo de salida de la disolución aceptora,

- en donde la primera cara posterior comprende un primer microcanal que intercomunica el primer orificio de entrada con el primer orificio de salida, y permite el flujo de la primera disolución donadora y la donación del primer elemento a la primera membrana.

Mientras que la segunda capa comprende:

- una segunda cara anterior vinculada con la primera cara inferior de la primera membrana y con la primera cara posterior de la primera capa,
- una segunda cara posterior,
- un segundo orificio de entrada, que se desarrolla desde la segunda cara anterior hasta la segunda cara posterior y que está alineado con el primer orificio de salida, para permitir la entrada de la disolución aceptora a través de un tercer orificio de conexión,
- un segundo orificio de salida, que se desarrolla desde la segunda cara anterior hasta la segunda cara posterior y que está alineado con el primer orificio de interconexión, para permitir la salida de la disolución aceptora conteniendo el primer y el segundo elemento,
- un segundo orificio de conexión que se desarrolla desde la segunda cara anterior hasta la segunda cara posterior,
- en donde:
    - la segunda cara anterior comprende un segundo microcanal que intercomunica el segundo orificio de entrada con el segundo orificio de conexión, y la segunda cara posterior comprende un tercer microcanal que intercomunica el segundo orificio de conexión con el segundo orificio de salida, y
    - el segundo microcanal que permite el flujo de la disolución aceptora y la aceptación del primer elemento desde la primera membrana hasta la disolución aceptora, y
    - el tercer microcanal permite el flujo de la disolución aceptora y la aceptación del segundo elemento desde la segunda membrana hasta la disolución aceptora.

Adicionalmente, la tercera capa comprende:

- una tercera cara anterior vinculada con la segunda capa inferior de la segunda membrana y con la segunda capa posterior de la segunda capa,
- una tercera cara posterior,
- un tercer orificio de entrada, que se desarrolla desde la tercera cara anterior hasta la tercera cara posterior y que está alineado con el segundo orificio de salida, para permitir la entrada de la segunda disolución donadora con el segundo elemento,

- un tercer orificio de salida, que se desarrolla desde la tercera cara anterior hasta la tercera cara posterior y que está alineado con el segundo orificio de conexión, para permitir la salida de la segunda disolución donadora libre del segundo elemento en al menos un 50%, preferiblemente en al menos un 65%, y aún más preferiblemente en al menos un 80%,
- un tercer orificio de conexión que se desarrolla desde la tercera cara anterior hasta la tercera cara posterior y que está alineado con el segundo orificio de entrada para ser vinculado con un tubo de entrada de la disolución aceptora,
- en donde la tercera cara posterior comprende un cuarto microcanal que intercomunica el tercer orificio de entrada con el tercer orificio de salida, y permite el flujo de la segunda disolución donadora y la donación del segundo elemento a la segunda membrana.

Adicionalmente, dispositivo microfluídico permite realizar multiextracciones y al compartir la misma disolución aceptora solo con una inyección de disolución aceptora, se extrae elementos de diferente naturaleza en una sola etapa. Los canales son del orden de la micra (pueden ser variables) y por tanto el consumo de muestra es mínimo.

Este dispositivo microfluídico permite hacer multiextracciones empleando tanto técnicas iguales o como diferentes (como por ejemplo LPME y EME) y se consiguen extraer compuestos de naturaleza muy diferente, independientemente que su acidez o basicidad.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1.- Muestra una vista esquemática del dispositivo microfluídico.

Fig. 2A-2C.- muestran las eficiencias de extracción obtenidas a 3 niveles diferentes de dopado con 0,5, 1 y 2 mg/L para los compuestos (MBR, NRF, CPF,DNF, FLM, Et-P, Pr_P, iBu_P, Bu_P)

Fig. 3.- Cromatograma de una muestra que contiene 4 parabenos (Et-P, Pr_P, iBu_P y Bu_P) y 5 fluoroquinolonas (MBR, NRF, CPF, DNF, FLM) de concentración 1 mg/L en agua superficial.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCIÓN

En una realización preferente se utiliza el dispositivo microfluídico (1) para la multiextracción simultánea de un primer elemento que comprende al menos un primer compuesto del grupo de los parabenos, preferiblemente donde los parabenos son metilparabeno (Me-P), etilparabeno (Et-P), propilparabeno (Pr_P), *iso*-butilparabeno (iBu_P), butilparabeno (Bu_P) y benzilparabeno (Bz-P), y más preferiblemente donde los parabenos son etilparabeno (Et-P), propilparabeno (Pr_P), *iso*-butilparabeno (iBu_P) y butilparabeno (Bu_P), contenidos en una primera disolución donadora y un segundo elemento que comprende al menos un segundo compuestos del grupo de las fluoroquinolonas, preferiblemente donde las fluoroquinolonas son marbofloxacina (MBR), norfloxacina (NRF), ciprofloxacina (CPF), danofloxacina (DNF), flumequina (FLM), enrofloxacin a (ENR) y gatifloxacina (GTF), y más preferiblemente donde las fluoroquinolonas son marbofloxacina (MBR), norfloxacina (NRF), ciprofloxacina (CPF), danofloxacina (DNF) y flumequina (FLM), contenidos en una segunda disolución donadora, mediante una misma disolución aceptora.

Más concretamente, tal y como se muestra en la figura 1, el dispositivo microfluídico (1) que forma un bloque o chip compacto comprende:

- una primera capa (10) que su vez comprende:
    - una primera cara anterior,
    - una primera cara posterior,
    - un primer orificio de entrada (11), que se desarrolla desde la primera cara anterior hasta la cara posterior para a permitir la entrada de la primera disolución con parabenos,
    - un primer orificio de salida (12), que se desarrolla desde la primera cara anterior hasta la cara posterior, para permitir la salida de la primera disolución sin parabenos en al menos un 80%,
    - un primer orificio de interconexión (13), que se desarrolla desde la primera cara anterior hasta la cara posterior, para ser vinculado con un tubo de salida de la disolución aceptora,

- o en donde la primera cara posterior comprende un primer microcanal (14) que intercomunica el primer orificio de entrada (11) con el primer orificio de salida (12),

- una primera membrana (2) configurada para permitir el paso de al menos un primer compuesto del grupo de los parabenos de la primera disolución donadora a la disolución aceptora y que a su vez comprende una primera cara superior que está vinculada con la primera cara posterior, y una primera cara inferior,

- una segunda membrana (3) configurada para permitir el paso de al menos un compuesto del grupo de las fluoroquinolonas de la segunda disolución donadora a la disolución aceptora y que a su vez comprende una segunda cara superior y una segunda cara inferior.

- una segunda capa (20) que su vez comprende:
  - o una segunda cara anterior vinculada con la primera cara inferior de la primera membrana (2) y con la primera cara posterior de la primera capa (10),
  - o una segunda cara posterior,
  - o un segundo orificio de entrada (21), que se desarrolla desde la segunda cara anterior hasta la segunda cara posterior y que está alineado con el primer orificio de salida (12), para permitir la entrada de la disolución aceptora a través de un tercer orificio de conexión (33),
  - o un segundo orificio de salida (22), que se desarrolla desde la segunda cara anterior hasta la segunda cara posterior y que está alineado con el primer orificio de interconexión (13), para permitir la salida de la disolución aceptora con compuesto del grupo de los parabenos y fluoroquinolonas extraídos de las primera y segunda disolución donadora mediante sus respectivas membranas (2,3), y
  - o un segundo orificio de conexión (23) que se desarrolla desde la segunda cara anterior hasta la segunda cara posterior y que está alineado con el primer orificio de entada (11),
    - en donde la segunda cara anterior comprende un segundo microcanal (24) que intercomunica el segundo orificio de entrada (21) con el segundo orificio de conexión (23) , y la segunda cara posterior comprende un tercer microcanal (25) que intercomunica el segundo orificio de conexión (23) con el segundo orificio de salida (22), y en donde: el segundo microcanal (24) permite el flujo de la disolución aceptora que provoca la aceptación del primer elemento desde

la primera membrana hasta la disolución aceptora, en donde la primera disolución donadora y la disolución aceptadora fluyen a contracorriente, y

- el tercer microcanal (25) permite el flujo de la disolución aceptora que provoca la aceptación del segundo elemento desde la segunda membrana hasta la disolución aceptora, en donde la segunda disolución donadora y la disolución aceptadora fluyen a contracorriente.

- una tercera capa (30) que a su vez comprende:
  - una tercera cara anterior vinculada con la segunda capa inferior de la segunda membrana y con la segunda capa posterior de la segunda capa
  - una tercera cara posterior,
  - un tercer orificio de entrada (31),que se desarrolla desde la tercera cara anterior hasta la tercera cara posterior y que está alineado con el segundo orificio de salida (22), para a permitir la entrada de la segunda disolución con fluoroquinolonas,
  - un tercer orificio de salida (32), que se desarrolla desde la tercera cara anterior hasta la tercera cara posterior y que está alineado con el segundo orificio de conexión (23), para permitir la salida de la segunda disolución sin fluoroquinolonas en al menos 65%,
  - el tercer orificio de conexión (33) que se desarrolla desde la tercera cara anterior hasta la tercera cara posterior y que está alineado con el segundo orificio de entrada (21) para ser vinculado con un tubo de entrada de la disolución aceptora ,
    en donde la tercera cara posterior comprende un cuarto microcanal (34) que intercomunica el tercer orificio de entrada (31) con el tercer orificio de salida (32).

Otro aspecto de la invención se refiere al procedimiento de multiextracción simultánea de un primer elemento contenido en una primera disolución donadora y de un segundo elemento de una segunda disolución donadora utilizando el dispositivo microfluídico (1) definido anteriormente.

En este dispositivo microfluídico (1) se utilizan solo tres disoluciones diferentes: una disolución aceptora común que es de un pH 11.5 y dos donadoras (una a pH 3.5 y otra a pH 11).

Preferentemente, el primer y el tercer orificio de entrada, salida y de conexión (11, 12, 13, 31, 32, 33), y el segundo orificio de entrada y salida (21, 22) comprenden un diámetro superior a 1,4mm, y preferentemente de 1,4 mm, y son pasantes que atraviesan las capas (10, 20, 30).

Más concretamente el segundo orificio de conexión (23) es fijo, siempre se debe de poner, independientemente de la técnica que quiera usarse para la extracción de los compuestos y permite la interconexión en la fase aceptora que pasa desde la cara anterior de la segunda capa (20) hasta la cara posterior de la segunda capa (20) y preferentemente es superior a 150 micras, y más preferentemente de 150 micras.

Por otro lado los microcanales (14, 24, 25, 34) pueden variar en profundidad y dependerá de la optimización según los compuestos que se desean extraer. La profundidad más crítica la tiene el microcanal donde se hace EME ya que la profundidad mínima tendrá que ser el diámetro de los electrodos de platino que hay en cada canal. De este modo para diámetros mayores a 400 micras se observan peores reproducibilidades. Cada microcanal (14, 24, 25, 34) puede presentar profundidades y longitudes diferentes.

De este modo los microcanales (14, 24, 25, 34) solo han de coincidir en geometría, de modo que los microcanales (14, 24) y (25, 34) enfrentados entre sí y separados a través de la primera y segunda membrana (2, 3) respectivamente donde se realiza el paso de los compuestos de primera y segunda disolución donadora a la disolución aceptora.

Preferentemente cuando se trabaja con EME, es decir con electromembranas, entonces se incluye dos electrodos por cada fase de extracción. Si solo una de las membranas trabaja como EME, solo se introduce dos electrodos dentro del dispositivo microfluídico (1). Los orificios (no representados) son del diámetro de los electrodos.

El diámetro de los electrodos también influye en la profundidad de los microcanales (14, 24, 25, 34). Es decir, en este caso, el dispositivo microfluídico (1) tiene un orificio de 100 µm que atraviesa el primer o cuarto microcanal (independientemente de donde se quiera realizar la EME) y que corresponde al microcanal (14, 24, 25, 34) de alguna de las fases donadoras.

Adicionalmente, se inserta un segundo electrodo en paralelo al que se ha colocado previamente en uno de los microcanales (14, 24, 25, 34) y que debe ser colocado en una de las caras de la segunda capa (2), de tal manera de que ambos electrodos quedan enfrentados en paralelo pero separados por una de las membranas (2, 3). Esta configuración permite que el dispositivo microfluídico (1) se cierre herméticamente sin fugas y a su vez permite desmontar y reutilizarlo sin que se vea afectado los electrodos.

Preferentemente, para el cierre hermético del dispositivo microfluídico (1) se emplea cinco tornillos que atraviesan cinco orificios pasantes de 3 mm, cuatro en los extremos y uno en el centro. Sin embargo, la geometría puede variar, y los tornillos se pueden recolocar y variar su disposición con el objetivo de evitar fugas.

De este modo se obtiene un dispositivo microfluídico (1) que puede ser integrado en un microchip de microfluídica en forma de poliédrica, preferentemente un cuadrado o un rectángulo, que permite hacer dos extracciones simultáneas compartiendo una misma disolución aceptora. En este caso, la primera y la segunda disolución donadoras pueden estar en continuo y a reflujo sin que se pierda muestra.

Adicionalmente, el material de cada capa es (10, 20, 30) es polimetilmetacrilato (PMMA) y presentan cada una un espesor de 3 mm. Este espesor es determinante para que el dispositivo microfluídico (1) no fugue. El dispositivo microfluídico (1) funciona con diferentes espesores, pero depende exclusivamente de las técnicas que se quieran usar en los microcanales (14, 24, 25, 34)-. Es decir, si en ambos microcanales (14, 24, 25, 34) se quiere hacer LPME, el grosor de la segunda capa (20) puede ser de 1 mm y por tanto el grosor total del dispositivo microfluídico (1) sería de 7 mm. Por otro lado, si en alguno o ambos microcanales (14, 24, 25, 34) se quiere hacer una EME, el grosor ha de ser de 3 mm ya que la capa intermedia debe tener un orificio no pasante con rebaje de 1.5 mm de profundidad y 2 mm de diámetro (rebaje en la segunda cara posterior o segunda cara anterior dependiendo del microcanal donde quiera ponerse el electrodo) para que el electrodo se pueda pegar.

Preferentemente la primera y la segunda membrana (2, 3) son del tipo “Celgard 2500” con un grosor de 25 µm y un 55% de porosidad. Se podría probar cualquier membrana con adecuada porosidad que permita el paso de los analitos entre ambas fases. En cuanto al espesor, pueden probarse diferentes espesores teniendo en cuenta que espesores inferiores a las 25 micras podría hacer que la membrana se rompiera si se deseara trabajar a flujos superiores a los 30 microlitros por minuto. Y espesores muy superiores podría hacer que el dispositivo microfluídico (1) no cerrara herméticamente entre sus capas y fugara.

La primera disolución donadora comprende en este caso a las fluoroquinolonas por EME con pH de 11.5. La segunda disolución donadora comprende con los parabenos por LPME a un pH de 3.5.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, donde la primera disolución donadora comprende una disolución de NaOH a pH 11.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, donde la segunda disolución donadora comprende una disolución de HCl a un pH de 3,5

En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, donde la disolución aceptora común comprende una disolución de NaOH a un pH de 11,5.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del dispositivo microfluídico (1) definido anteriormente, para la extracción de parabenos y fluoroquinolonas.

El dispositivo microfluídico (1) definido anteriormente se aplica al análisis de muestras de aguas superficiales. En una realización particular, el flujo empleado es de 1 µL/min tanto para la disolución aceptora como para la donadora.

Para los diferentes ensayos se utiliza una muestra real de agua de balsa obtenida de la bodega Gramona en Sant Sadurní d'Anoia (Barcelona). Este agua se emplea tanto para agricultura, como para cuidado de animales que residen en la bodega.

Previamente, las muestras se filtraron a través de un filtro de membrana de nylon Pall NylafloTM de 0,45 µm (Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan, EE.UU.) para eliminar los sedimentos de la muestra y se almacenaron en el frigorífico a 4ºC antes del procedimiento de microextracción.

Las muestras son introducidas en el dispositivo microfluídico (1) en dos canales diferentes simultáneamente: canal 1 para la extracción de fluoroquinolonas mediante la EME y canal 2 para la extracción de parabenos mediante LPME. La muestra introducida en la primera capa (10) se ajusta previamente a pH 11(pH óptimo donador para fluoroquinolonas) y a pH 3,5 en la tercera capa (30) (pH óptimo de para parabenos).

Las figuras 2A, 2B y 2C muestran las eficiencias de extracción obtenidas a 3 niveles diferentes de dopado con 0,5, 1 y 2 mg/L para los compuestos (MBR, NRF, CPF,DNF, FLM, Et-P, Pr_P, iBu_P, Bu_P).

En la tabla 1 se exponen las recuperaciones en muestras reales a los tres niveles de dopado, obteniendo recuperaciones superiores al 70 % en todos los casos, excepto para la DNF a 0,5 mg/L. Todos los ensayos se realizaron por triplicado obteniendo una desviación estándar entre 0,15 y 1,17 %. Además, se obtuvo una excelente limpieza sin dilución de muestra, lo que supone una gran ventaja en comparación con la extracción tradicional de LMPE y EME que requiere un consumo de volumen de muestra mayor.

Dopado (mg/L)	**MBR**	**NRF**	**CPF**	**DNF**	**FLM**
0,5	69,0 ± 0,2	70,5 ± 0,5	71,9 ± 0,2	55,9 ± 0,6	100,0 ± 0,2
1	93,5 ± 1,0	100,0 ± 1,2	96,5 ± 1,2	99,2 ± 18	100,0 ± 0,4
2	92,1 ± 0,4	78,2 ± 0,7	75,7 ± 0,2	82,0 ± 0,2	84,1 ± 0,3

Dopado (mg/L)	**Et-P**	**Pr_P**	**iBu_P**	**Bu_P**
0,5	100,0 ± 0,2	100,0 ± 0,5	90,0 ± 0,1	91,3 ± 0,8
1	81,4 ± 0,7	95,6 ± 0,9	100,0 ± 1,1	96,8 ± 0,7
2	100,0 ± 0,5	95,8 ± 0,4	100,0 ± 0,5	93,1 ± 0,7

Tabla 1

La diferencia de las recuperaciones en los diferentes dopados puedes ser debidas a la influencia de la matriz en el análisis de los analitos, así como la polaridad de las fluoroquinolonas en la extracción.

La figura 3 muestra un cromatograma representativo de una muestra real de agua de balsa de concentración 1 mg/L, observándose un excelente "*clean-up*" o limpieza de la muestra.

El procedimiento y el dispositivo microfluídico (1) de la invención se han aplicado también a muestras biológicas de orina obteniendo eficiencias de extracción superiores al 80 % y recuperaciones superiores al 85 % en todos los compuestos).

R E I V I N D I C A C I O N E S

1. Dispositivo microfluídico (1) para la multiextracción simultánea, mediante una misma disolución aceptora, de un primer elemento que comprende al menos un primer compuesto contenido en una primera disolución donadora y de un segundo elemento que comprende al menos un segundo elemento contenido en una segunda disolución donadora, en donde el dispositivo microfluídico (1) está caracterizado por que comprende:
    - una primera capa (10) configurada para recibir y conducir la primera disolución donadora,
    - una segunda capa (20) configurada para recibir y conducir la disolución aceptora ,
    - una tercera capa (30) configurada para recibir y conducir la segunda disolución donadora,
    - una primera membrana (2) que separa la primera capa y la segunda capa y que está configurada para permitir el paso del primer elemento,
    - una segunda membrana (3) que separa la segunda capa y la tercera capa y que está configurada para permitir el paso del segundo elemento, y
    - en donde la primera y la segunda membrana permiten la multiextracción simultanea del primer elemento y el segundo elemento sin mezclar la primera y la segunda disolución donadora.

2. Dispositivo microfluídico (1), según la reivindicación 1, caracterizado por que la primera membrana (2) comprende:
    - una primera cara superior configurada para entrar en contacto con la primera disolución donadora, y
    - una primera cara inferior configurada para entrar en contacto con la disolución aceptora,

3. Dispositivo microfluídico (1), según la reivindicación 2, caracterizado por que la segunda membrana (3) comprende:
    - una segunda cara superior configurada para entrar en contacto con la disolución aceptora, y
    - una segunda cara inferior configurada para entrar en contacto con la segunda disolución donadora,

4. Dispositivo microfluídico (1), según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la primera capa (10) comprende:
   - una primera cara anterior,
   - una primera cara posterior,
   - un primer orificio de entrada (11), que se desarrolla desde la primera cara anterior hasta la cara posterior para a permitir la entrada de la primera disolución donadora con el primer elemento,
   - un primer orificio de salida (12), que se desarrolla desde la primera cara anterior hasta la cara posterior, para permitir la salida de la primera disolución donadora sin el primer elemento en al menos un 50%, y
   - un primer orificio de interconexión (13), que se desarrolla desde la primera cara anterior hasta la cara posterior, para ser vinculado con un tubo de salida de la disolución aceptora,
   - en donde la primera cara posterior comprende un primer microcanal (14) que intercomunica el primer orificio de entrada (11) con el primer orificio de salida (12), y permite el flujo de la primera disolución donadora y la donación del primer elemento a la primera membrana.

5. Dispositivo microfluídico (1), según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la segunda capa (20) comprende:
   - una segunda cara anterior vinculada con la primera cara inferior de la primera membrana y con la primera cara posterior de la primera capa,
   - una segunda cara posterior,
   - un segundo orificio de entrada (21), que se desarrolla desde la segunda cara anterior hasta la segunda cara posterior y que está alineado con el primer orificio de salida (12), para permitir la entrada de la disolución aceptora a través de un tercer orificio de conexión (33),
   - un segundo orificio de salida (22), que se desarrolla desde la segunda cara anterior hasta la segunda cara posterior y que está alineado con el primer orificio de interconexión (13), para permitir la salida de la disolución aceptora conteniendo el primer y el segundo elemento, y
   - un segundo orificio de conexión (23) que se desarrolla desde la segunda cara anterior hasta la segunda cara posterior,
   - en donde:

- la segunda cara anterior comprende un segundo microcanal (24) que intercomunica el segundo orificio de entrada (21) con el segundo orificio de conexión (23), y la segunda cara posterior comprende un tercer microcanal (23) que intercomunica el segundo orificio de conexión (23) con el segundo orificio de salida (22), y
- el segundo microcanal (24) permite el flujo de la disolución aceptora y la aceptación del primer elemento desde la primera membrana (2) hasta la disolución aceptora , y
- el tercer microcanal (25) permite el flujo de la disolución aceptora y la aceptación del segundo elemento desde la segunda membrana (3) hasta la disolución aceptora.

6. Dispositivo microfluídico (1), según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que una tercera capa (30) comprende:
    - una tercera cara anterior vinculada con la segunda capa inferior de la segunda membrana y con la segunda capa posterior de la segunda capa (20),
    - una tercera cara posterior,
    - un tercer orificio de entrada (31), que se desarrolla desde la tercera cara anterior hasta la tercera cara posterior y que está alineado con el segundo orificio de salida (22), para permitir la entrada de la segunda disolución donadora con el segundo elemento,
    - un tercer orificio de salida (32), que se desarrolla desde la tercera cara anterior hasta la tercera cara posterior y que está alineado con el segundo orificio de conexión (23), para permitir la salida de la segunda disolución donadora libre del segundo elemento en al menos un 50%,
    - un tercer orificio de conexión (33) que se desarrolla desde la tercera cara anterior hasta la tercera cara posterior y que está alineado con el segundo orificio de entrada (21) para ser vinculado con un tubo de entrada de la disolución aceptora,
    - en donde la tercera cara posterior comprende un cuarto microcanal (34) que intercomunica el tercer orificio de entrada (31) con el tercer orificio de salida (32), y permite el flujo de la segunda disolución donadora y la donación del segundo elemento a la segunda membrana (3).

7. Dispositivo microfluídico (1), según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el primer y el tercer orificio de interconexión (13, 33) comprenden un diámetro superior a 1,4 mm.

8. Dispositivo microfluídico (1), según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el segundo orificio de interconexión (23) comprende un diámetro superior a 150 µm.

9. Dispositivo microfluídico (1), según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que por que el primer, segundo, tercer orificio de entrada y de salida 11, 21, 31, 12, 22, 32) y el segundo orificio de entrada y salida (21, 22) comprenden un diámetro superior a 1,4 mm.

10. Procedimiento de multiextracción simultánea de un primer elemento contenido en una primera disolución donadora y de un segundo elemento de una segunda disolución donadora utilizando el dispositivo microfluídico (1) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. El procedimiento según la reivindicación 15, donde la disolución donadora comprende una disolución de NaOH a pH 11.

12. El procedimiento según la reivindicación 15, donde la segunda disolución donadora comprende una disolución de NaOH a un pH de 3,5.

13. El procedimiento según la reivindicación 15, donde la disolución aceptora común comprende una disolución de NaOH a un pH de 11,5.

14. Uso del dispositivo microfluídico (1) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la extracción de parabenos y fluoroquinolonas.

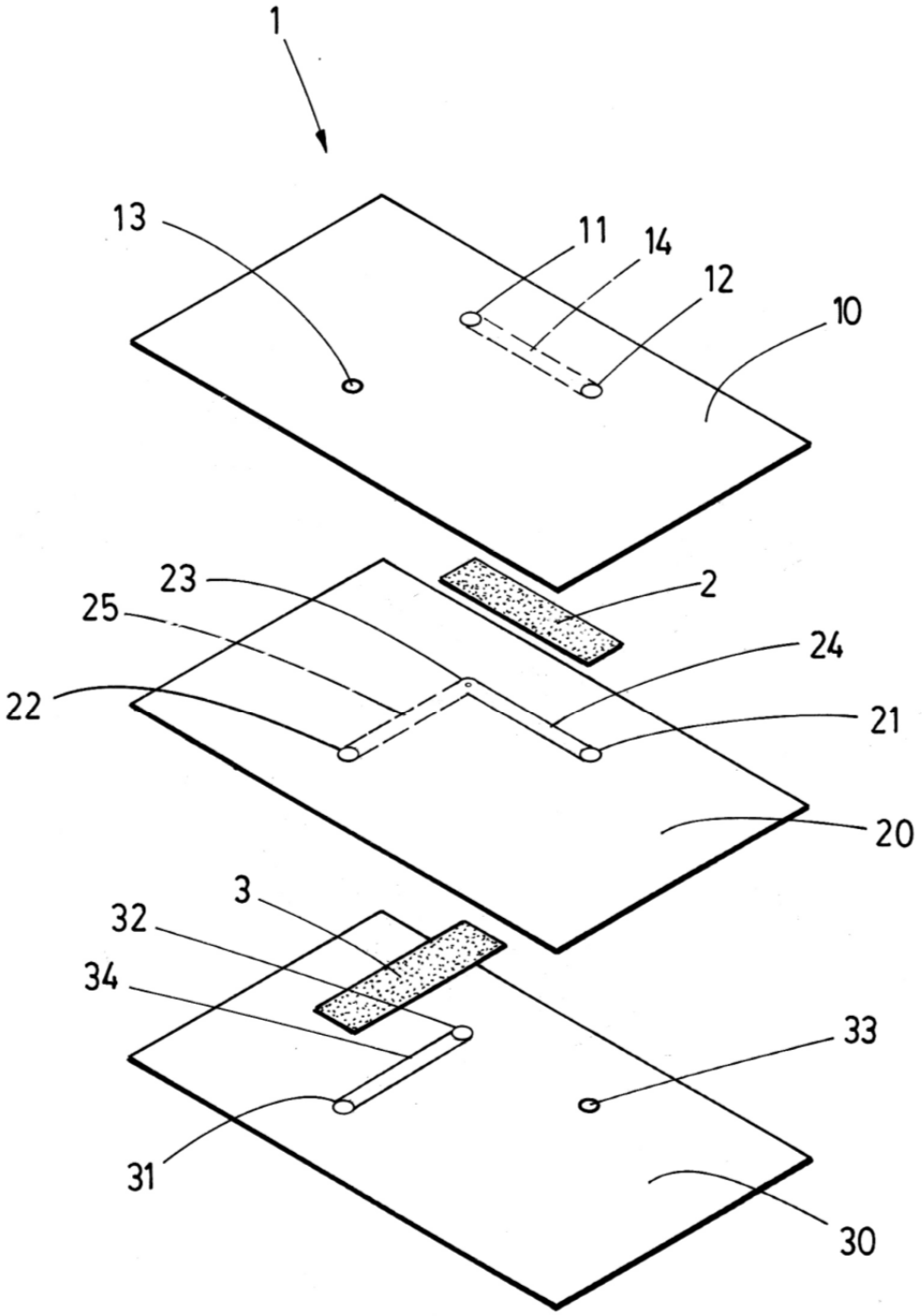

FIG.1

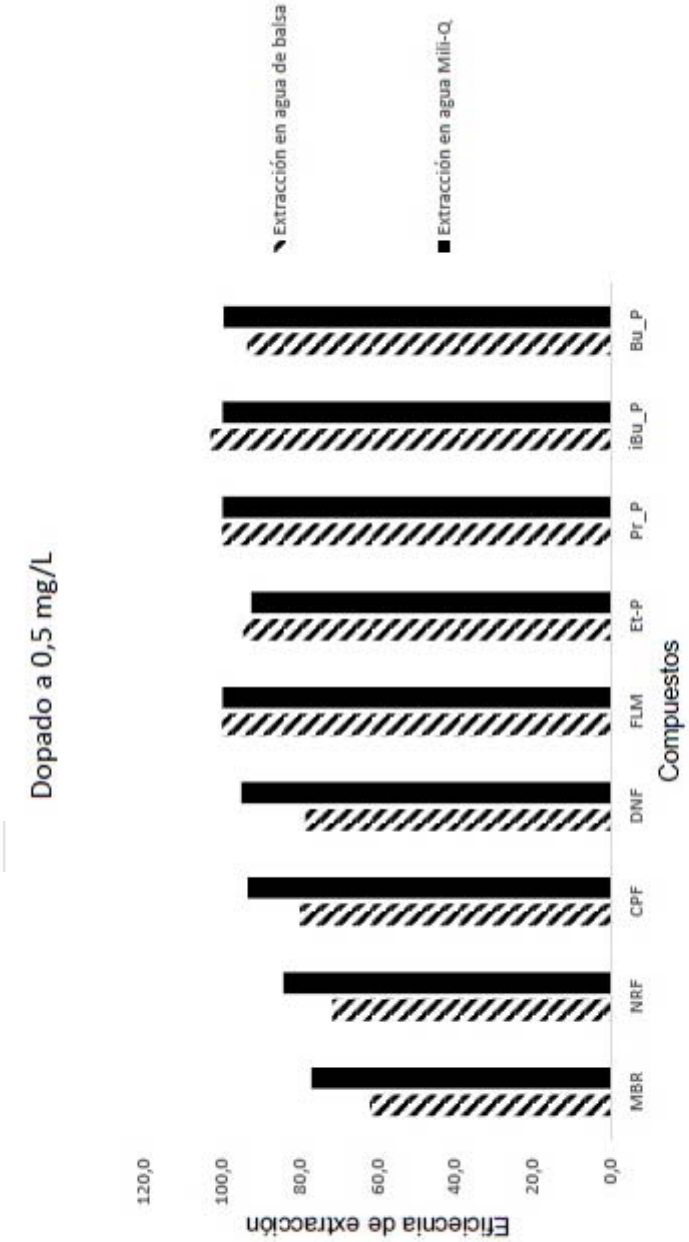
Dopado a 0,5 mg/L
Extracción en agua de balsa
Extracción en agua Milli-Q
Eficiencia de extracción
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
MBR
NRF
CPF
DNF
FLM
Et-P
Pr_P
iBu_P
Bu_P
Compuestos

FIG. 2A

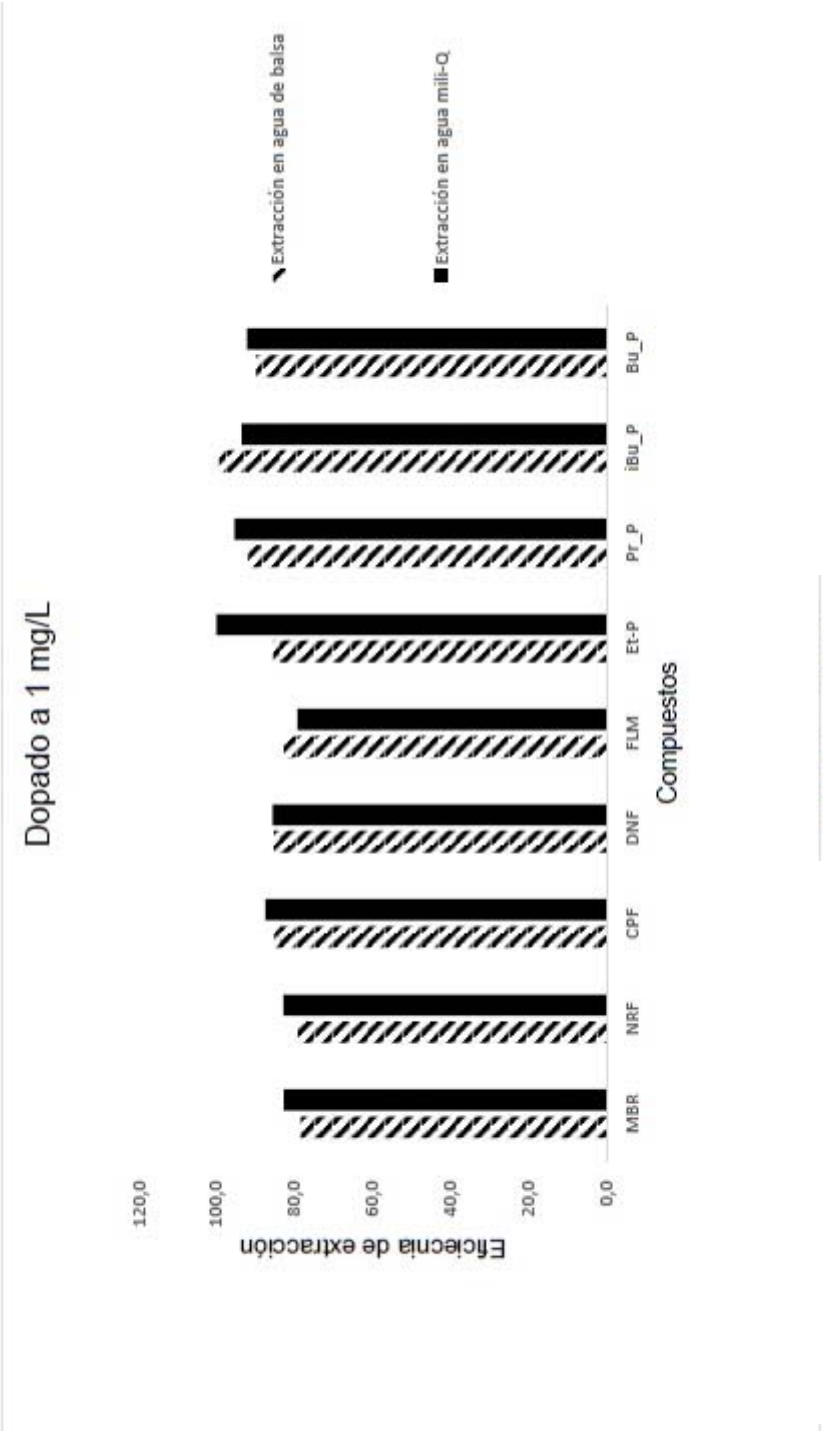
Dopado a 1 mg/L
Extracción en agua de balsa
Extracción en agua milli-Q
Eficiencia de extracción
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
MBR
NRF
CPF
DNF
FLM
Et-P
Pr_P
iBu_P
Bu_P
Compuestos

FIG. 2B

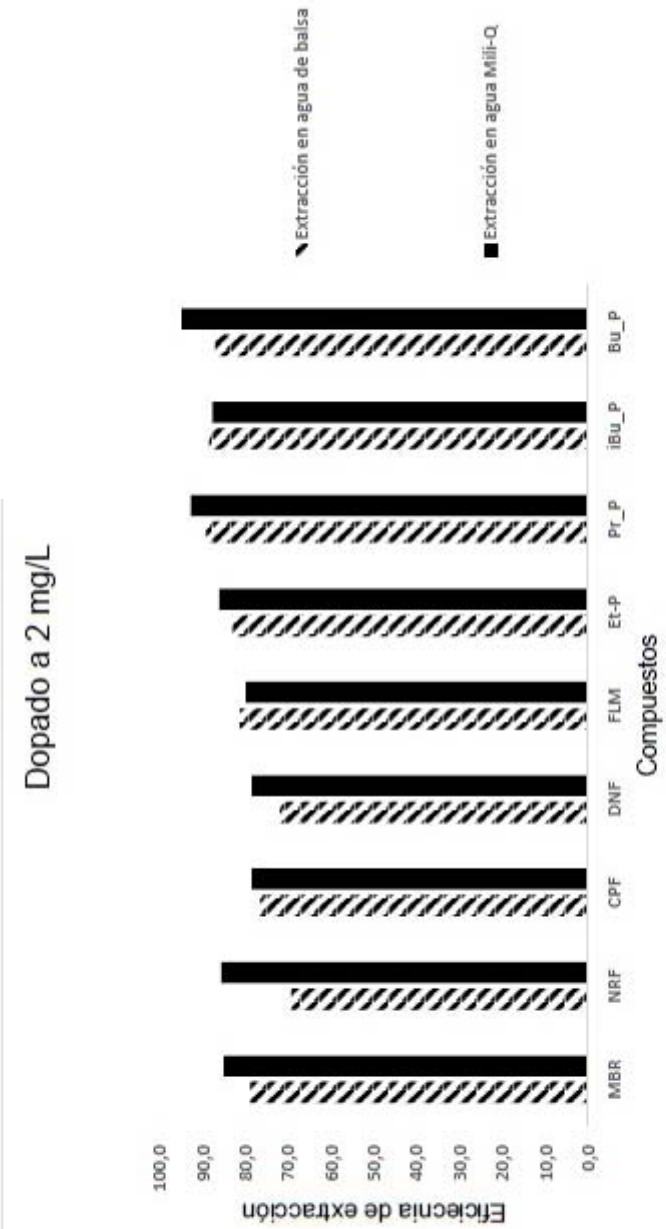
Dopado a 2 mg/L
Extracción en agua de balsa
Extracción en agua Milli-Q
Eficiencia de extracción
100,0
90,0
80,0
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
MBR
NRF
CPF
DNF
FLM
Et-P
Pr_P
iBu_P
Bu_P
Compuestos

FIG. 2C

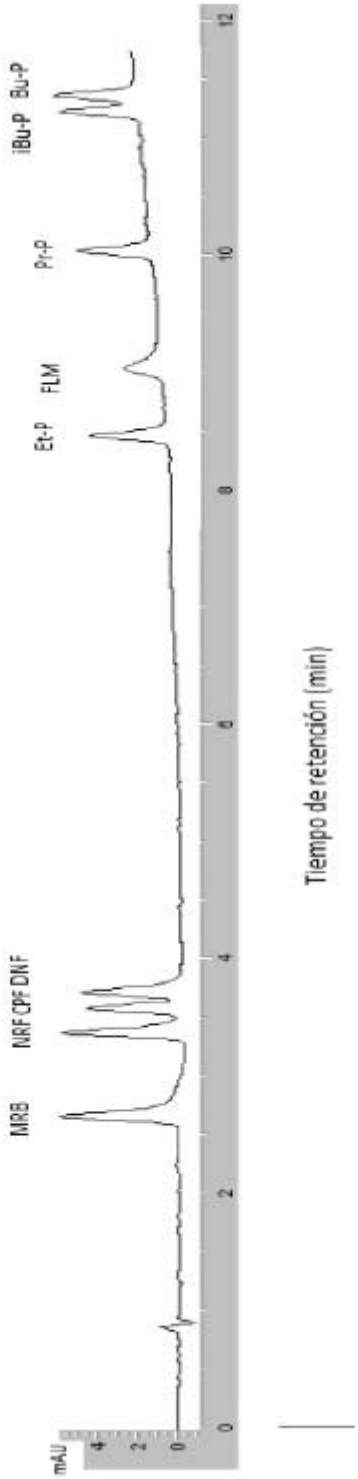
mAU
4
2
0
MRB
NRF CPF DNF
Et-P
FLM
Pr-P
iBu-P
Bu-P
0
2
4
6
8
10
12
Tiempo de retención (min)

FIG. 3

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201830039

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 15.01.2018

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***G01N30/00*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RAMOS-PAYAN, MARÍA; MASPOCH, SANTIAGO; LLOBERA, ANDREU. A simple and fast Double-Flow microfluidic device based liquid-phase microextraction (DF-µLPME) for the determination of parabens in water samples. . Talanta, 23/12/2016, Vol. 165, Páginas 496-501, <DOI: 10.1016/j.talanta.2016.12.059>. apartado 2 - 3; Fig 1.	1-14
A	MARÍA RAMOS PAYÁN, ELIA SANTIGOSA MURILLO, SANTIAGO MASPOCH. "PO-TM-15: Dispositivo microfluídico on-chip para la extracción simultánea de antinflamatorios no esteroideos y parabenos mediante microextracción en fase líquida y su aplicación en aguas superficiales". ACTUALIDAD ANALITICA (BOLETÍN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA): XXI Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (Valencia, 5-7 Septiembre 2017), Diciembre 2017, Páginas 1-51. páginas 34-35	1-14
A	CAI, ZENG-XUAN, et al. . A microfluidic chip based liquid–liquid extraction system with microporous membrane. . Analytica chimica acta, 14/07/2005, Vol. 556, Páginas 151-156, <DOI: 10.1016/j.aca.2005.06.028 >. apartado 2, Fig.1	1-14
A	HUANG, CHUIXIU, et al. Combination of electromembrane extraction and liquid-phase microextraction in a single step: simultaneous group separation of acidic and basic drugs. Analytical chemistry, 03/06/2015, Vol. 87, Páginas 6951?6957, <DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01610>. Resumen.	1-14

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	Examinador	Página
10.05.2018	V. Balmaseda Valencia	1/2

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

G01N

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