

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 575**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B03B 5/00 (2006.01)

B01D 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2017 E 17202689 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 3329994**

54 Título: **Reactor para la maceración enzimática de partes componentes biogénicas de una muestra de partículas, y utilización del reactor**

30 Prioridad:

02.12.2016 DE 102016123324

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.07.2019

73 Titular/es:

**ALFRED-WEGENER-INSTITUT HELMHOLTZ-
ZENTRUM FÜR POLAR- UND
MEERESFORSCHUNG (100.0%)
Am Handelshafen 12
27570 Bremerhaven, DE**

72 Inventor/es:

GERDTS, GUNNAR

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 720 575 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Reactor para la maceración enzimática de partes componentes biogénicas de una muestra de partículas, y utilización del reactor

5 La invención se refiere a un reactor para la maceración enzimática de partes componentes biogénicas de una muestra de partículas con por lo menos un espacio de reacción, que está configurado como cilindro vertical con un lado frontal superior y un lado frontal inferior, por lo menos una disposición de filtro, una conexión de bomba y una conexión para líquidos, y a una utilización del reactor.

10 Los residuos de material plástico que son llevados por las corrientes en los mares presentan un prolongado período de descomposición. Sin embargo, debido a la intemperie y al agua se descomponen lentamente y se transforman en microplásticos, que se hunden hasta el fondo del agua y son ingeridos por los animales marinos. La difusión de microplásticos en el entorno marino es objeto de una documentación creciente. Como microplásticos se definen partículas de materiales sintéticos con un tamaño inferior a 5 mm. No es posible indicar una clase de magnitudes inferiores. En prácticamente cualquier muestra medioambiental (sedimentos, aguas, biota) pueden encontrarse microplásticos de tamaño intermedio. Esta situación también puede afectar al ser humano, ya que los materiales dañinos entregados liberados por los materiales sintéticos se acumulan, por ejemplo, en mariscos o peces marinos y son absorbidos o ingeridos por éstos. Por ello existen diversas exigencias planteadas a la investigación. Por un lado, se trata de la optimización de la toma de muestras, de la detección, identidad y cuantificación de las partículas de microplásticos. Por otra parte, es necesario llevar a cabo estudios fundamentales en cuanto a su distribución en el medio ambiente y enfoques experimentales orientados hacia su modo de acción. La presente invención se refiere a la optimización de la preparación de las muestras. Al respecto se trata en especial de liberar las muestras que contienen partículas de microplásticos de todos los otros componentes en forma de partículas, pero orgánicos, por ejemplo, microalgas, zooplancton, y remover ya de por sí las biopelículas que se encuentren sobre las partículas de microplástico. En caso contrario, tales impurezas serían causa de una interferencia durante el análisis de las partículas de microplástico sintéticas y falsificarían los resultados. Diversos enfoques conocidos basados en soluciones proponen la utilización de sistemas de ácido-lejía agresivos o de enzimas. Todos los enfoques de disolución conocidos hasta ahora presentan la característica de que, por lo general, han de llevarse a cabo en varias etapas y con intervenciones manuales, por lo que siempre existe el riesgo de contaminar adicionalmente la muestra durante el proceso de preparación.

Estado de la técnica

30 De la patente austríaca AT 231 923 B se conoce un dispositivo para el enjuague de los componentes sólidos adheridos de una suspensión de gránulos de un producto de granos finos. La disposición comprende una correa transportadora permeable y una criba dispuesta por debajo de ésta. La mercadería transportada situada por arriba de la criba es objeto de un enjuague vertical pasante. En este caso, se trata de una disposición que sirve para preparar carbón o minerales de hierro. De la patente de los Estados Unidos N° 3 347 370 A se conoce un procedimiento para el lavado y remoción de líquidos pesados orgánicos de partículas minerales. Tiene lugar una separación basada en densidades. De la patente europea EP 0 316 622 B1 se conoce un procedimiento y una disposición para la purificación de partículas de resina polimérica. La corriente de partículas se desplaza verticalmente en una carcasa cilíndrica. En dirección horizontal, sobre un lado de la carcasa, se aplica una corriente de gas de elevada presión y en el otro lado se genera un vacío. De esta manera, se eliminan los polvos y partículas pequeñas de la corriente de partículas.

45 El estado de la técnica más cercano a la invención ha sido divulgado en el informe de conclusión "Mikroplastik in ausgewählten Kläranlagen des Oldenburgisch-Ostfriesischen Wasserverbandes (OOWV) in Niedersachsen" (por: G. Gerdtts et al., 08.10.2014, descargado de Internet el 21.10.2016 bajo la URL http://www.dwa-bayern.de/tl_files/_media/content/PDFs/LV_Bayern/Abschlussbericht_Mikroplastik_in_Klaeranlagen-3.pdf). En el Capítulo 5 "Probenaufbereitung (preparación de muestras)" se describen etapas de extracción que son necesarias para separar entre sí los componentes biogénicos y abiogénicos de las muestras objeto de estudio. A tal efecto, durante la filtración de las aguas residuales clarificadas hasta 1 m³ se retienen, además de los microplásticos, también fragmentos de plantas, insectos, arenas y grasas en un filtro de acero inoxidable en forma de cartucho cilíndrico ("filtro de cartucho") como disposición de filtrado. Durante la remoción del material natural se prescinde conscientemente de la utilización de ácidos o de lejías fuertes, ya que los mismos también tienen la capacidad de atacar los materiales sintéticos. En lugar de eso, se someten las muestras a un tratamiento enzimático-oxidativo ("maceración enzimática") con subsiguiente separación por densidades mediante cloruro de cinc (ZnCl₂). La utilización de enzimas que trabajan de manera específica tiene la ventaja de descomponer el material de plantas (celulasa, actividad enzimática > 30 U/ml⁻¹), las grasas (lipasas, actividad enzimática > 15 000 U/ml⁻¹), proteínas (proteasa, actividad enzimática 1100 U/ml⁻¹) y el caparazón de los insectos (quitinasas, actividad enzimática > 40 U/ml⁻¹), pero los materiales sintéticos no son atacados. El aseguramiento necesario para la descomposición enzimática en las correspondientes condiciones óptimas en cuanto a temperatura y valor de pH obligaba a un modo operativo por etapas que insumía muchísimo tiempo. Después de que, con ayuda de aire comprimido purificado, los espacios de reacción (carcasa de filtros) hayan vaciado los filtros de cartucho, se procede a bombear con ayuda de una bomba de membrana múltiple por intermedio de una conexión de bomba aproximadamente 660 ml de las soluciones individuales de productos químicos o bien soluciones enzimáticas a través de una conexión de fluido

directamente en los espacios de reacción. De esta manera, se añade en primera instancia una solución al 5% del agente tensioactivo SDS (dodecilsulfato de sodio). A continuación se procede de la misma manera también con las enzimas proteasa, lipasa y celulasa, de las cuales se administran 25 ml por muestra de drenaje hacia los tampones previamente aplicados y de pH ajustado. Entre cada etapa de procedimiento se enjuagan y se vacían nuevamente los filtros de cartucho con agua corriente filtrada, a efectos de remover las sustancias ya disueltas. Después de la última etapa de enjuague, se abren los espacios reactivos, el material adherido se remueve mediante un cepillo metálico de los filtros de cartucho, se enjuagan varias veces con agua corriente filtrada y por medio de una criba de 500 μm se filtra sobre un filtro de discos de 10 μm hecho de acero inoxidable (diámetro 47 mm). En este caso existe el peligro de que las partes componentes por analizar no sean transferidas por completo. En la fracción mayor a 500 μm se retiran selectivamente todas las partículas de plástico potenciales mediante un binocular y posteriormente se las identifica mediante ATR-FTIR. La fracción de muestra inferior a 500 μm se transfirió a los filtros de disco 10 μm en botellas y a continuación se mezclaron con 30 ml de H_2O_2 (al 35%). Después de la remoción por filtrado, se procedió también de esta manera con quitinasa (2 ml en 30 ml de tampón) y nuevo tratamiento con agua oxigenada. Para la separación final de densidades se procedió a enjuagar las muestras desde los filtros de disco con una solución de ZnCl_2 de una densidad de 1,6 g/cm^3 directamente en el embudo de separación. Todos los materiales sintéticos previsible tenían una densidad menor, nadaron sobre la solución, sedimentaron los materiales más pesados, tales como piedras y herrumbre y se pudieron remover de esta manera de las muestras. El material remanente se fijó luego directamente sobre el filtro de disco de óxido de aluminio. Sin embargo, la mayoría de las muestras siguieron presentando un elevado residuo de material orgánico, por lo que fueron divididas sobre varios filtros de disco, a efectos de poder obtener buenos resultados de medición durante las investigaciones analíticas subsiguientes.

Una divulgación similar puede derivarse del trabajo magistral "Detection of microplastics in marine Sediment of the German Coast via FT-IR spectroscopy" de C. Lorenz (Universität Rostock, 22.05.2014, consultado el 24.10.2016 en la URL http://rosdok.uni-rostock.de/file/rosdok_thesis_000000017/rosdok_derivate_0000032921/Masterarbeit_Lorenz_2016.pdf). En la Figura 6 del Capítulo 2.3. "Separation" puede reconocerse una disposición que representa un reactor con cuya ayuda se lleva a cabo la maceración. Pueden reconocerse varios filtros de cartucho dispuestos consecutivamente uno tras otro, representando cada filtro de cartucho una disposición de filtro, en la que en cada caso hay un espacio de reacción cilíndrico (carcasa de filtro) de vidrio. Los filtros de cartucho llenan en cada caso la totalidad del espacio de reacción. Sin embargo, los espacios de reacción muestran, cada uno de ellos, un lado frontal superior y lado frontal inferior. La conexión de bomba es al mismo tiempo la conexión para el líquido y se encuentra en el lado frontal superior del espacio de reacción. Con ello no se garantiza forzosamente un flujo pasante óptimo a través de los filtros de cartucho. Se trata de un montaje de laboratorio predominantemente improvisado. Gracias a las diversas etapas de procedimiento separadas y de las etapas de transferencia manual (entre los filtros de cartucho y los filtros de disco, ver lo anterior) durante la prolongada maceración existe el riesgo de una contaminación de las muestras. Además, puede suceder que los materiales biogénicos no sean liberados en una amplitud suficiente a partir de los materiales abiogénicos (comparar con lo anterior).

Objetivo planteado

Partiendo del estado de la técnica más próximo, explicado en lo que precede, el objetivo de la presente invención consiste en perfeccionar el reactor del tipo anteriormente descrito de manera tal que permita una eficiencia de maceración lo más elevada posible junto con un riesgo de contaminación y un riesgo de pérdida lo más reducidos posible de las partículas que son objeto de investigación. Además, mediante el reactor reivindicado en la invención debería encontrar una utilización en un procedimiento ventajoso para la maceración de partículas de microplástico. La solución para este objetivo debe derivarse de la reivindicación principal. Ventajosos perfeccionamientos de la invención se señalan en las reivindicaciones secundarias y en lo que sigue se explican con mayor detenimiento en relación con la invención. La reivindicación del procedimiento muestra una solución para el objetivo de la utilización, junto con posibles modificaciones; en lo que sigue también se explica con mayor detenimiento el procedimiento de utilización reivindicado.

De acuerdo con la invención, el reactor reivindicado se caracteriza por el hecho que en el lado frontal superior del espacio de reacción se halla dispuesta una disposición de filtro superior con un disco de filtro superior entre dos sellos y en el lado frontal inferior del espacio de reacción, se halla dispuesta una disposición de filtro inferior con un disco de filtro inferior entre dos sellos, y porque sobre la disposición del filtro superior se halla dispuesta una placa de cabecera liberable con la conexión de bomba y sobre la disposición del filtro inferior se halla dispuesta una placa de fondo liberable con la conexión del líquido, siendo posible cerrar la conexión de bomba y la conexión de líquido y están configuradas tanto para un llenado como también para un vaciado del espacio de reacción en forma de cilindro.

El reactor de acuerdo con la invención representa una disposición muy compacta y poco dispuesta a presentar trastornos de funcionamiento para la maceración de partículas. El proceso de la maceración se lleva a cabo con diversos agentes en solamente un espacio de reacción por lo que se prescinde de una etapa de transferencia a otros espacios de reacción con otros agentes correspondientes. Al respecto, por supuesto es posible disponer varios espacios de reacción paralelamente entre sí, de manera tal que es posible llevar a cabo varios procesos de maceración simultáneamente para elevar el volumen de preparación. Esto es especialmente ventajoso para someter mayores cantidades de muestras al prolongado proceso de maceración. Cada espacio de reacción cilíndrico

presenta dos disposiciones de filtro. Cada disposición de filtro consiste en un disco de filtro, que está colocado entre dos sellos. En la invención no se utilizan filtros de cartucho de difícil limpieza.

La conexión de bomba se encuentra en la región del disco de filtro superior, y la conexión del líquido se encuentra en la región del disco de filtro inferior. De esta manera, se logra un enjuague óptimo de la totalidad del espacio de reacción durante el llenado y la evacuación del líquido. El disco de filtro inferior se utiliza después de la deposición de partículas también para la investigación analítica subsiguiente, por lo que también puede prescindirse de etapas de transferencia entre diversos tipos de filtro y se minimizan los riesgos de contaminación y de pérdidas. El disco de filtro sirve para proteger la bomba contra su obstrucción causada por partes componentes de las muestras, cuando la bomba está funcionando en el modo o régimen de evacuación por aspiración. Tanto la conexión de la bomba como también la conexión de líquido tienen una configuración que les permite ser cerrados y sirven tanto para el llenado como también para el vaciado del espacio de reacción. Para el llenado del espacio de reacción, se abre la conexión del líquido y en el interior del espacio de reacción se genera un vacío por arriba de la conexión de la bomba (régimen de aspiración de la bomba, que depende de la conexión de la bomba). El líquido es aspirado por intermedio del disco de filtro inferior hacia la parte inferior del espacio de reacción. Se cierra subsiguientemente la conexión del líquido. Después de una etapa de maceración se expulsa el líquido a través del disco de filtro inferior desde el espacio de reacción, por el hecho de que se abre nuevamente la conexión del líquido y pasando por la conexión de bomba se genera una sobrepresión en el espacio de reacción (modo que acarreo de la bomba, que depende de la conexión de la bomba). Las partículas abiogénicas por analizar y ahora depuradas de materiales biogénicos gracias a la maceración, quedan retenidas sobre el lado superior del disco de filtro inferior. El disco de filtro así cargado puede conducirse ahora directamente hacia el análisis. Por medio de la placa de cabecera liberable (con la conexión de la bomba) y de la placa de fondo liberable (con la conexión de líquido), es posible abrir de manera sencilla el espacio de reacción. La muestra de sedimento puede ser introducida sencillamente en el espacio de reacción. Una vez terminada la maceración, es posible limpiar sencillamente el espacio de reacción.

Durante la detección analítica de las partículas, por ejemplo, mediante espectroscopia infrarroja, las partículas inferiores a 10 μm caen por debajo del límite de detección. Por ello no contribuyen al resultado de la medición y pueden ser removidas por enjuague de la muestra de sedimento. Por lo tanto, para que pueda pasar por los discos de filtro, de acuerdo con una primera realización de la invención, es preferible y ventajoso que los discos de filtro estén hechos de gasa de acero inoxidable con un ancho de malla de 10 μm . El acero inoxidable tampoco es atacado por el proceso de la maceración, además, es preferible y ventajoso que ambos sellos estén dispuestos por arriba y por abajo de los discos de filtro como anillos sellantes de silicona. Estos sellan muy bien, pero debido a sus buenas propiedades de deslizamiento son también fáciles de liberar nuevamente. A tal efecto es ventajoso, cuando de acuerdo con una siguiente configuración de acuerdo con la invención, en ambos lados frontales del espacio de reacción en forma de cilindro se hallen dispuestas unas bridas (en el lado frontal superior una brida superior y en el lado frontal inferior una brida inferior); al respecto, las bridas anulares se extienden anularmente alrededor del borde de la carcasa y no impiden el acceso al centro de la carcasa. Además, es posible de manera ventajosa y preferible que ambas disposiciones de filtro estén sujetas de manera liberable mediante grapas de prensado entre la placa de cabecera y la brida superior y entre la placa inferior y la brida inferior. Por medio de una liberación sencilla de las grapas de prensado es posible remover las bridas y retirar los discos de filtro. El disco de filtro inferior se hace llegar ahora a su análisis, y el disco de filtro superior se limpia.

La incubación es parte esencial de la maceración. Los agentes introducidos reaccionan con los materiales biogénicos y los descomponen. Esto tiene lugar en un entorno caliente, por ejemplo en un baño de agua, en posición preferentemente recostada (horizontal) del espacio de reacción. A tal efecto se separa la bomba de la conexión de bomba. Esto puede efectuarse de manera sencilla cuando de acuerdo con una configuración inventiva preferida y ventajosa, la conexión de bomba puede ser cerrada mediante una válvula hermética a la presión. Además, se bloquea la conexión del líquido. A tal efecto es preferible y ventajoso que la conexión del líquido esté formada por una simple perforación pasante en la placa de fondo, siendo la perforación de paso obturable mediante un tapón de material sintético hermético a la presión. Para que el tapón de material sintético permanezca seguro en la perforación pasante durante la manipulación del espacio de reacción, de acuerdo con una configuración siguiente de la invención es ventajoso y preferible que el tapón de material sintético sea de silicona. El marco de bastidor comprende el espacio de reacción en la región de su lado frontal inferior y al mismo tiempo puede servir como empuñadura para la manipulación del espacio de reacción. Finalmente, para una introducción hermética pero también para una remoción sencilla del tapón desde el mismo se prefiere de manera ventajosa que el tapón de material sintético sea de silicona.

El reactor compacto de acuerdo con la invención es especialmente adecuado para el procedimiento de la maceración en etapas. A tal efecto, la muestra de sedimento se pone en contacto en cada caso con otros agentes para remover de manera correspondiente otros materiales biogénicos de la superficie de la partícula abiogénica. Se prefiere especialmente y de manera ventajosa la utilización del reactor en una de sus realizaciones anteriormente explicadas en un procedimiento para la separación de las partes componentes biogénicas y abiogénicas de una muestra mediante maceración enzimática a partir de una muestra de plancton que contiene partículas de microplástico (utilización como "reactor de plancton") con las siguientes etapas de procedimiento:

- introducción de la muestra plancton a través del lado superior del espacio de reacción en forma de cilindro;

- filtrado de la muestra de plancton a través del disco de filtro inferior y de la perforación pasante en la placa inferior mediante la fuerza de la gravedad;
 - montaje de la placa de cabecera con la conexión de bomba y con la válvula hermética a la presión, con interposición de la disposición de filtro superior y de los sellos;
- 5
- colocación del reactor en un recipiente que está lleno de un agente;
 - llenado del espacio de reacción en forma de cilindro con el agente mediante la generación de un vacío en la conexión de bomba;
 - cierre de la válvula en la conexión de bomba y de la perforación pasante en la placa de fondo con un tapón de material sintético y posicionamiento del reactor en una incubadora con agitación;
- 10
- incubación del reactor a una temperatura prefijada a lo largo de un intervalo de tiempo prefijado;
 - retiro del reactor y remoción del tapón de material sintético desde la perforación pasante;
 - filtrado de la muestra de plancton a través de un disco de filtro y de la perforación pasante en la placa de fondo mediante la generación de una sobrepresión en la conexión;
 - repetición simple o múltiple de las seis últimas etapas de procedimiento con diferentes agentes;
- 15
- secado de la muestra de plancton mediante la generación de una sobrepresión en la conexión de bomba;
 - desmontaje de la placa del fondo con la disposición de filtro inferior;
 - remoción del disco de filtro inferior; y
 - obtención del material filtrado limpio y seco con las partículas microplásticas maceradas;

20 En este contexto, de manera preferible y ventajosa como agentes se utilizan agua ultrapura, una solución acuosa con un agente tensioactivo o con una enzima o peróxido de hidrógeno. Además, como agentes tensioactivos se utilizan dodecilsulfato de sodio y/o enzima proteasa o celulasa o quitinasa o lipasa, de manera preferida y ventajosa. Finalmente, de manera preferida y ventajosa se hace llegar el filtrado obtenido con las partículas microplásticas maceradas directamente al disco de filtro inferior de una evaluación analítica (por ejemplo, ATR-FTIR). No se utiliza un relleno, asociado con contaminación y pérdida, del filtrado purificado. Mayores detalles con respecto a la utilización y para la realización del reactor asociado con la invención pueden derivarse de los ejemplos de realización detallados a continuación.

25

Ejemplos de realización

30 A continuación se explica el reactor para la separación de componentes biogénicos y abiogénicos de una muestra mediante maceración enzimática de acuerdo con la invención y de sus modificaciones ventajosas, como también el procedimiento de utilización reivindicado, con ayuda de las siguientes figuras esquemáticas para una mejor comprensión de la invención mediante ejemplos de realización. En las Figuras:

la Figura 1 representa el diseño esquemático del reactor de acuerdo con la invención; y

las Figuras 2A a 2H muestran esquemáticamente el desarrollo del procedimiento bajo la utilización reivindicada del reactor según la invención.

35 La Figura 1 muestra el reactor 01 de acuerdo con la invención en una vista lateral esquemática. El elemento central del reactor 01 es un espacio de reacción cilíndrico 02 con un lado frontal superior 03 y un lado frontal inferior 04. En el ejemplo de realización mostrado, el espacio de reacción 02 es de acero inoxidable. En su lado frontal superior 03 el espacio de reacción 02 presenta una disposición de filtro superior 05 y en su lado frontal inferior 04 presenta una disposición de filtro inferior 06. La disposición de filtro superior 05 presenta un disco de filtro superior 07 y la disposición de filtro inferior 06 presenta un disco de filtro inferior 08. En el ejemplo de realización mostrado se trata en cada caso de una gasa de acero inoxidable 09 con un ancho de malla de 10 μm . En su lado frontal superior 03 el espacio de reacción 02 presenta además una brida superior 10 y en su lado frontal inferior 04 una brida inferior 11. En la Figura 2, las bridas 10, 11 han sido representadas cortadas, de manera tal que puede reconocerse el pasadizo interior. La disposición de filtro superior 05 está montada de manera desmontable por intermedio de dos sellas 12 (en el ejemplo de realización mostrado, anillos sellantes de silicona) entre la brida superior 10 y una placa de cabecera liberable 13 mediante abrazaderas de sujeción 15. La disposición de filtro inferior 06 está colocada de manera desmontable por medio de dos sellos adicionales 12 entre la brida inferior 11 y una placa de fondo liberable 14 mediante las abrazaderas de sujeción 15.

40

45

50 En la placa de cabecera 13, se encuentra una conexión de bomba 16, que puede ser cerrada mediante una válvula hermética a la presión 17. En la placa de fondo 14, se encuentra una conexión de líquido 18. En el ejemplo de

realización mostrado, la conexión de líquido 18 está formada por una simple perforación pasante 19 en la placa de fondo 14. Para cerrar la conexión de líquidos 18, se cierra la perforación pasante 19 con un tapón de material sintético 20, que en el ejemplo de realización representado consiste en silicona. Para que el tapón de material sintético 20 quede insertado en la perforación pasante 19 de manera segura durante la maceración, en el ejemplo de realización elegido y mediante un marco de bastidor 21, que por arriba de la placa de fondo 14 muerde en la brida inferior 11, queda fijado de manera hermética a la presión.

A continuación, se explica el funcionamiento del reactor 01 de acuerdo con la Figura 2 también mediante la explicación de su utilización en un procedimiento para la separación de partes componentes biogénicas y abiogénicas de una muestra mediante maceración enzimática a partir de una muestra de plancton que contiene partículas de microplástico. Al respecto, las imágenes individuales designadas con letras de imprenta muestran diversas etapas del procedimiento (los números de referencia no indicados en este caso corresponden a los de la Figura 1.

A. Llenado de una muestra de plancton acuosa 22 acuosa por investigar en cuanto a su contenido de partículas de microplástico + H₂O a través del lado frontal superior 03 del espacio de reacción de forma de cilindro 02. Para todos los procesos de llenado y de vaciado es posible mantener el reactor 01 con la mano o en una posición vertical en un trípode (no se muestra).

B. Filtrado de la muestra de plancton 22 a través del disco de filtro inferior 08 (en forma de una gasa de acero inoxidable 09 con un ancho de 10 µm) y de la perforación pasante 19 en la placa inferior 14 mediante la gravedad (filtración). El agua H₂O de la muestra de plancton 22 y las partículas con un tamaño < 10 µm abandonan el espacio de reacción 02.

C. Montaje de la placa de cabecera 13 con la conexión de bomba 16 y la válvula hermética a la presión 17 en el lado frontal superior 03 del espacio de reacción 02 bajo interposición de la disposición de filtro superior 05 y de los sellos 12 (en el ejemplo de realización mediante la aplicación de abrazaderas de sujeción 15).

D. Colocación (preferentemente en posición erguida, es decir vertical, sostenido manualmente o en un trípode) del reactor 01 en un recipiente 23 (por ejemplo, una probeta) que está lleno de un agente 24 (agua ultrapura, SDS (dodecilsulfato de sodio), proteasa, celulasa, H₂O₂ o quitinasa). Al respecto, la conexión de líquidos 18 o bien la perforación pasante 19 está situada en el agente 24, es decir, por debajo del nivel de éste en el recipiente 23. A continuación se efectúa el llenado del espacio de reacción de forma de cilindro 02 con el agente 24 mediante la generación de un vacío ($p < 1$, es decir, inferior a la presión atmosférica de 1 bar) en la conexión de bomba 16. El agente 24 es aspirado desde el recipiente 23 hacia el interior del espacio de reacción 02.

E. Cierre de la válvula 17 hermética a la presión (círculo negro) y de la perforación pasante 19 en la placa de fondo 14 con un tapón de material sintético 20 y posicionamiento del reactor 01 en una incubadora con agitación 25. El posicionamiento del reactor 01 se efectúa por lo general en dirección horizontal, es decir, en posición recostada (se muestra una posición erguida, es decir, vertical) La incubadora con agitación 25 mueve y calienta (por ejemplo, mediante agua caliente a una temperatura T prefijada) la muestra de plancton 22 mezclada con el agente 24 de manera continua a lo largo de un prolongado intervalo de tiempo t (véase la introducción de la descripción), de manera tal que la maceración, es decir, la liberación de las partículas inorgánicas con respecto a las partes componentes orgánicas, pueda tener lugar. Después de la maceración se retira el reactor 01 de la incubadora con agitación 25 y se remueve el tapón de material sintético 20 de la perforación pasante 19.

F. Filtrado de la muestra de plancton 22 preparada mediante el primer agente 24 a través del disco de filtro inferior 08 y de la perforación pasante 19 en la placa inferior 14 mediante la generación de una sobrepresión en la conexión de bomba 16 (filtración por presión, $p > 1$, es decir, superior a presión atmosférica de 1 bar). A tal efecto se acopla la bomba a la conexión de bomba 16 y se abre la válvula 17 hermética a la presión (círculo blanco).

D...F A continuación se repiten las últimas seis etapas del procedimiento una o varias veces, utilizando cada vez otro agente 24. De esta manera, en cada caso se repite otro proceso de maceración de modo que al final de las pasadas las partículas abiogénicas se habrán liberado en forma prácticamente completa de la totalidad de todas las partes componentes biogénicas.

G. Remoción completa de los últimos residuos de los agentes 24 de la muestra de plancton 22 (secado de la muestra de plancton 22) a través del disco de filtro inferior 08 y de la perforación pasante 19 en la placa de fondo 14 mediante la generación de una sobrepresión en la conexión de bomba 16 (presión de filtración, $p > 1$, es decir, superior a 1 bar de presión atmosférica). Un filtrado limpio y seco 26 con las partículas de microplástico por analizar (tamaño de las partículas > 10 µm), queda retenido sobre el disco de filtro inferior 08.

H. Desmontaje de la placa de fondo 14 con la disposición de filtro inferior 06 (o bien, inversamente, desmontaje del espacio de reacción 02) y remoción del disco del filtro inferior 08 y obtención del filtrado, limpio y seco 26 con las partículas de microplástico extraídas de la muestra de plancton 22.

En el ejemplo de realización mostrado, el filtrado preparado y seco 26 se hace llegar de manera directa sobre el disco de filtro inferior 08 con vista a una investigación analítica (evaluación de las partículas (número, tamaño,

material) por ejemplo mediante el análisis infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR).

Como diversos agentes 24 en el ejemplo de realización mostrado, se utiliza agua ultrapura, una solución acuosa con un agente tensioactivo o una enzima o peróxido de hidrógeno. Al respecto, como agente tensioactivo se utiliza dodecilsulfato de sodio y/o la enzima proteasa o celulasa o quitinasa o lipasa.

5 Listado de referencias numéricas

- 01 Reactor
- 02 Espacio de reacción
- 03 Lado frontal superior de 02
- 04 Lado frontal inferior de 02
- 05 Disposición de filtro superior
- 06 Disposición de filtro inferior
- 07 Disco de filtro superior
- 08 Disco de filtro inferior
- 09 Gasa de acero inoxidable
- 10 Brida superior
- 11 Brida inferior
- 12 Sello
- 13 Placa de cabecera
- 14 Placa de fondo
- 15 Abrazadera de sujeción
- 16 Conexión de bomba
- 17 Válvula hermética a la presión
- 18 Conexión de líquido
- 19 Perforación pasante
- 20 Tapón de material sintético
- 21 Marco de bastidor
- 22 Muestra de plancton
- 23 Recipiente
- 24 Agente
- 25 Incubadora con agitación
- 26 Filtrado limpio y seco

REIVINDICACIONES

1. Reactor (01) para la maceración enzimática de partes componentes biogénicas de una muestra de partículas (22) con por lo menos un espacio de reacción (02), que está configurado como cilindro con un lado frontal superior (03) y un lado frontal inferior (04), por lo menos una disposición de filtro (05, 06), una conexión de bomba (16) y una conexión de líquidos (18), caracterizado por que en el lado frontal superior (03) del espacio de reacción (02) se halla dispuesta una disposición de filtro superior (05) con un disco de filtro superior (07) entre dos sellos (12) y en el lado frontal inferior (04) del espacio de reacción (02) se halla dispuesta una disposición de filtro inferior (06) con un disco de filtro inferior (08) entre dos sellos (12), y por que sobre la disposición de filtro superior (05) se halla dispuesta una placa de cabecera liberable (13) con la conexión de bomba (16) y sobre la disposición de filtro inferior (06) se halla dispuesta una placa de fondo liberable (14) con la conexión de fluido (18), en donde la conexión de bomba (16) y la conexión de líquido (18) pueden ser cerradas y están configuradas tanto para un llenado como también para un vaciado del espacio de reacción en forma de cilindro (02).
2. Reactor (01) según la reivindicación 1, caracterizado por que los discos de filtro (07, 08) están configurados como gasa de acero inoxidable (09) con un ancho de malla de 10 µm.
3. Reactor (01) según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que los sellos (12) están configurados como anillos sellantes de silicona.
4. Reactor (01) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que en el lado frontal superior (03) del espacio de reacción en forma de cilindro (02) se halla dispuesta una brida superior (10) y porque en el lado frontal inferior (04) se halla dispuesta una brida inferior (11).
5. Reactor (01) según la reivindicación 4, caracterizado por que ambas disposiciones de filtro (05, 06) están instaladas de manera liberable mediante abrazaderas de sujeción (15) entre la placa de cabecera (13) y la brida superior (10) y entre la placa de fondo (14) y la brida inferior (11).
6. Reactor (01) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la conexión de bomba (16) puede ser cerrada mediante una válvula hermética a la presión (17).
7. Reactor (01) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la conexión del líquido (18) está formada por una perforación pasante (19) en la placa de fondo (14), en donde la perforación pasante (19) puede ser cerrada herméticamente a la presión mediante un tapón de material sintético (20).
8. Reactor (01) según la reivindicación 7, caracterizado por que el tapón de material sintético (20) puede ser mantenido herméticamente a la presión en la perforación pasante (19) por medio de un marco de bastidor (21).
9. Reactor (01) según la reivindicación 7 u 8, caracterizado por que el tapón de material sintético (20) está compuesto de silicona.
10. Utilización del reactor (01) según una de las reivindicaciones precedentes en un procedimiento para la maceración enzimática de partes componentes biogénicas de una muestra de plancton (22) que contiene partículas de microplástico con las siguientes etapas de procedimiento:
- Introducción de la muestra de plancton (22) a través del lado frontal superior (03) del espacio de reacción en forma de cilindro (02);
 - Filtrado de la muestra de plancton (22) a través del disco de filtro inferior (08) y de la perforación pasante (19) en la placa de fondo (14) mediante la acción de la gravedad;
 - Montaje de la placa de cabecera (13) con la conexión de bomba (16) y con la válvula hermética a la presión (17) bajo interposición de la disposición de filtro superior (05) y de los sellos (12);
 - Colocación del reactor (01) en un recipiente (23), que ha sido llenado con un agente (24);
 - Llenado del espacio de reacción de forma de cilindro (02) con el agente (24) mediante la generación de un vacío en la conexión de bomba (16);
 - Cierre de la válvula (17) en la conexión de bomba (16) y en la perforación pasante (19) en la placa de fondo (14) con un tapón de material sintético (20) y posicionamiento del reactor (01) en una incubadora con agitación (25);
 - Incubación del reactor (25) a una temperatura T prefijada a lo largo de un intervalo de tiempo prefijado t;

- Retiro del reactor (01) y remoción del tapón de material sintético (20) de la perforación pasante (19);
 - Filtrado de la muestra de plancton (22) a través del disco de filtro inferior (08) y de la perforación pasante (19) en la placa de fondo (14) mediante la generación de una sobrepresión en la conexión de bomba (16);
 - Repetición simple o múltiple de las seis últimas etapas del procedimiento con diferentes agentes (24);
- 5
- Secado de la muestra de plancton (22) mediante la generación de una sobrepresión en la conexión de bomba (16);
 - Desmontaje de la placa de fondo (14) con la disposición de filtro inferior (06);
 - Remoción del disco de filtro inferior (08); y
 - Obtención del filtrado limpio y secado (26) con las partículas de microplástico maceradas.
- 10
11. Utilización del reactor (01) según la reivindicación 10, caracterizada por que como agentes (24) se utilizan agua ultrapura, una solución acuosa con un agente tensioactivo o una enzima o peróxido de hidrógeno.
12. Utilización del reactor (01) según la reivindicación 11, caracterizada por que como agente tensioactivo se emplean dodecilsulfato de sodio y/o enzima proteasa o celulasa o quitinasa o lipasa.
- 15
13. Utilización del reactor (01) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que el filtrado obtenido, limpio y seco (26) se hace llegar junto con las partículas de microplástico maceradas directamente sobre el disco de filtro inferior (08) de una evaluación analítica.

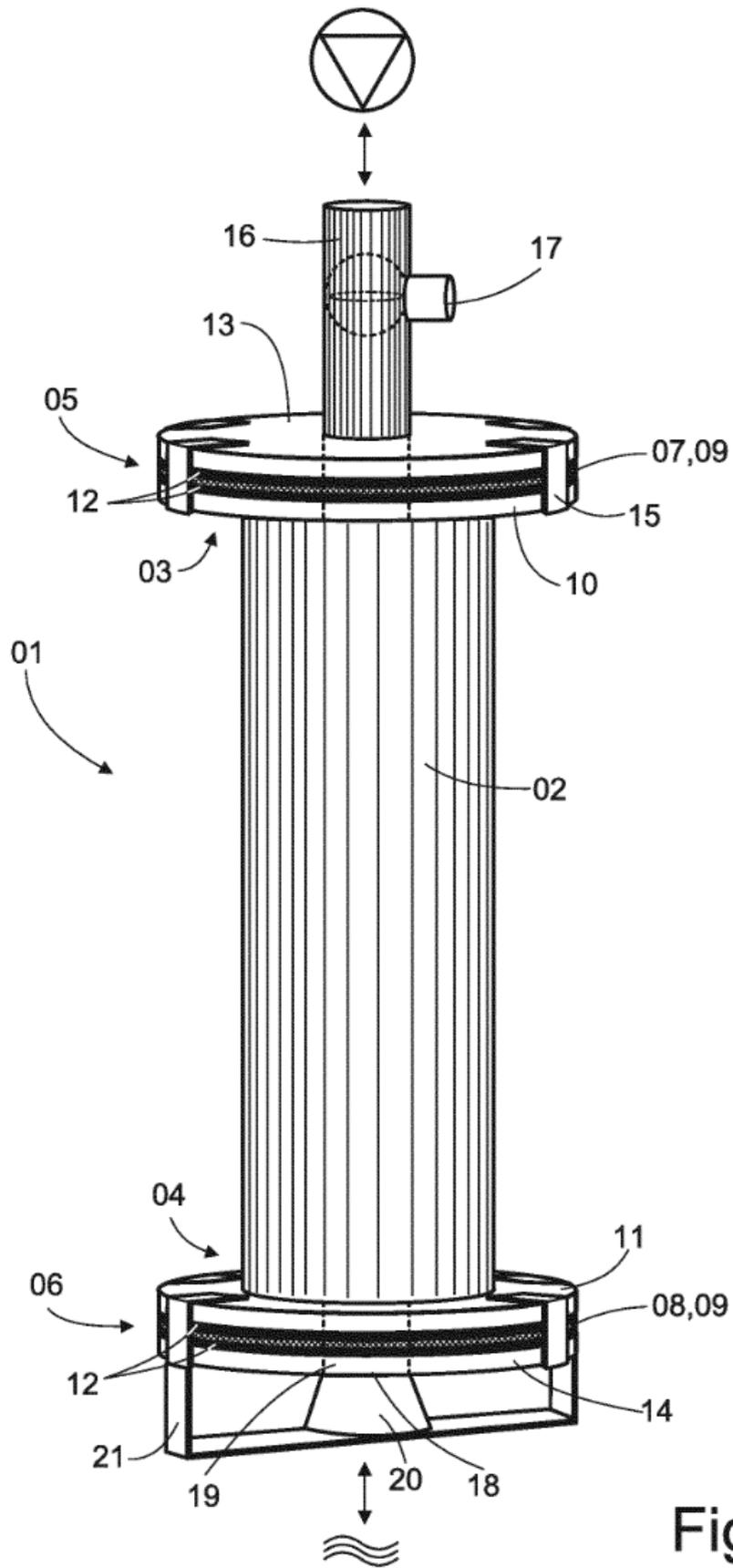


Fig.1

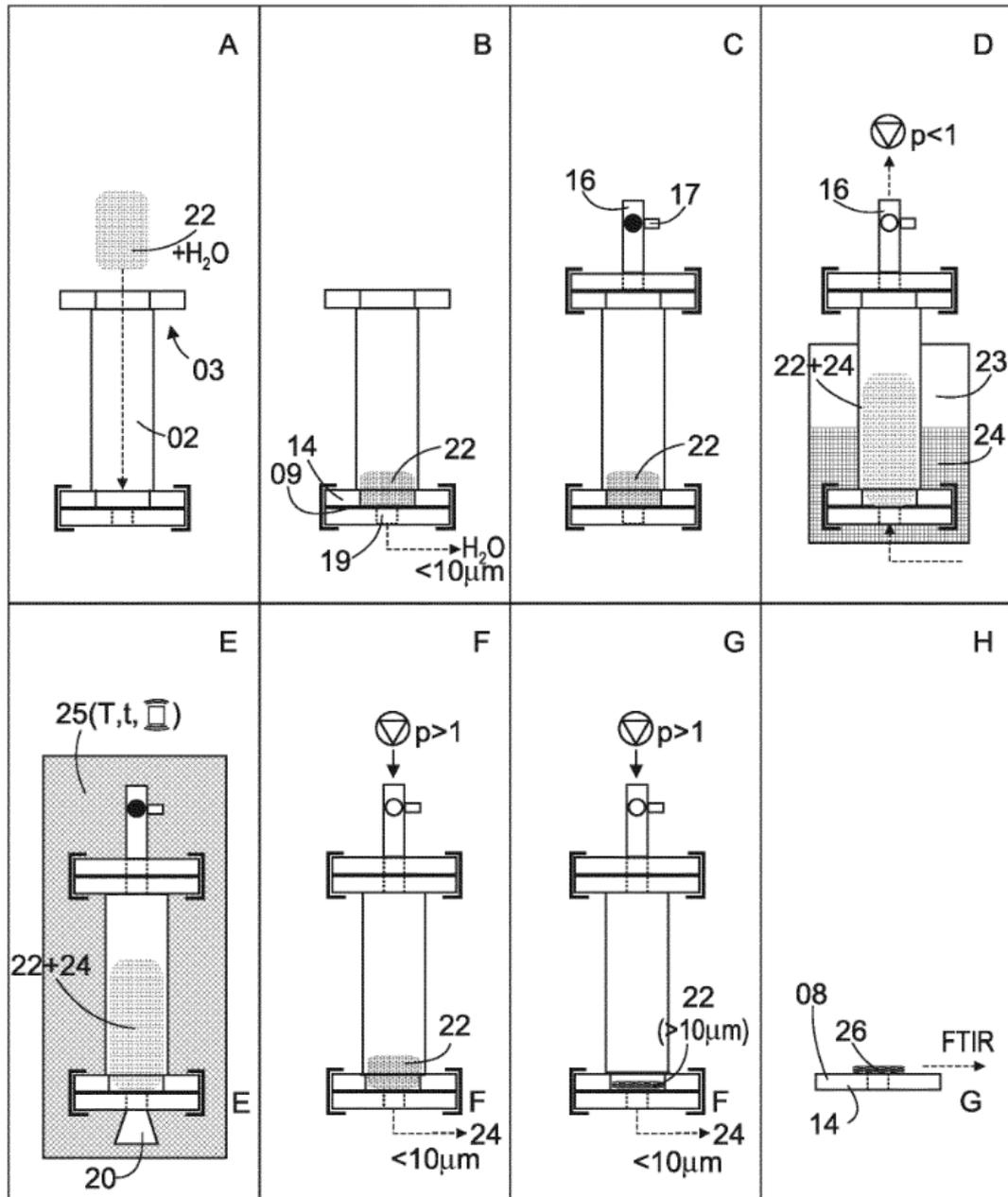


Fig.2