(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 799 351**

(21) Número de solicitud: 201900092

(51) Int. CI.:

B01D 15/00 (2006.01)
B01J 20/22 (2006.01)
B01J 20/28 (2006.01)
B01J 20/32 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN B2

(22) Fecha de presentación:

14.06.2019

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

16.12.2020

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

10.03.2021

Fecha de concesión:

21.09.2021

(45) Fecha de publicación de la concesión:

28.09.2021

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (100.0%)
OTRI-UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (EDIFICIO CENTRAL) C/ PEDRO ZEROLO, S/N AP.456
38200 LA LAGUNA (Santa Cruz de Tenerife) ES

(72) Inventor/es:

PASÁN GARCÍA, Jorge;
PINO ESTÉVEZ, Verónica;
AFONSO PERERA, Ana María;
RUIZ PÉREZ, Catalina;
AYALA DÍAZ, Juan H;
PACHECO FERNÁNDEZ, Idaira y
ROCÍO BAUTISTA, Priscila

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

(54) Título: **Fase estacionaria para dispositivo de microextracción en fase sólida**

(57) Resumen:

La presente invención provee de una fase estacionaria para dispositivos de microextracción en fase sólida (SPME) basadas en núcleos de aleación de níquel y titanio y exterior de red metal-orgánica (MOF) que puede ser utilizada para el análisis cromatográfico en aplicaciones medioambientales, alimentarias, etc. El método de preparación de las fases estacionarias consiste en varios pasos que proporcionan una adhesión covalente del MCE a la aleación de níquel/titanio. En estas fases estacionarias, la red metal-orgánica es el único componente que entra en contacto con la muestra a analizar. El interior de la fase estacionaria está realizado en nitinol y provee de estabilidad térmica y mecánica al sistema, siendo la primera vez que se utiliza para soportar una red metal-orgánica y que presenta ventajas extractivas con respecto a las fases estacionarias de SPME comerciales.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Fase estacionaria para dispositivo de microextracción en fase sólida

Sector de la técnica

La presente invención se enmarca en el sector de los dispositivos de monitorización de contaminantes. Se refiere a una fase estacionaria con redes metal-orgánicas (MOF) para un sistema de micro-extracción en fase sólida (SPME).

Antecedentes de la invención

Las redes metal-orgánicas son polímeros de coordinación cristalinos constituidos por un ligando orgánico (al menos ditópico) y un ión metálico o clúster de iones metálicos con una estructura tridimensional (ES2356130). Estos materiales presentan porosidad permanente y siguen siendo cristalinos tras el proceso de activación en el que las moléculas huésped son desalojadas, con estabilidad térmica en el rango 150 a 200°C. Se caracterizan por su facilidad para modificarse de acuerdo con las propiedades buscadas.

La micro-extracción en fase sólida (SPME) es una técnica analítica de extracción y preconcentración desarrollada por Pawliszyn en 1989 (ES2056644). Esta técnica consiste en la utilización de una fibra de acero inoxidable o de sílice fundida en la que su parte final (1 a 3 cm) está recubierta por un material sorbente con espesores entre 1 y 100 pm. Esta técnica está consolidada y su uso está extendido para el análisis de componentes en la industria del perfume, alimenticia, sanitaria, medioambiental, etc.
Desde el inicio de la técnica de SPME los núcleos de las fases estacionares son comúnmente de sílice fundida o de acero inoxidable. Estos materiales son fácilmente funcionalizables de tal forma que el recubrimiento quede perfectamente adherido al soporte. Sin embargo, presentan algunas deficiencias, en particular la sílice fundida es frágil y el acero inoxidable es maleable; características que perturban los análisis.
La utilización de redes metal-orgánicas como material sorbente en dispositivos de extracción de fase sólida se ha realizado en otras ocasiones utilizando una adhesión física al soporte o una combinación de materiales sorbentes entre los que se incluyen grafeno, líquidos iónicos o nanotubos de carbono (Anal. Chim. Acta 2016, 939, 26-41) en todo caso siempre sobre núcleos de acero inoxidable, sílice fundida o cuarzo. Existen tres dispositivos de SPME patentados que contienen MOFs como parte de su fase estacionaria, en todos ellos la red metal-orgánica es parte de un conglomerado que incluye un polímero (US2016208047, CN105572268, CN105536745). La participación de un segundo componente en la fase estacionaria dificulta la caracterización, la reproducibilidad de los análisis y limita la capacidad de extracción de la red metal-orgánica.

Como ejemplos de estas realizaciones anteriores podemos señalar:

a. *Food Chemistry* 20*18, Vol. 263, N° 18, pp. 258-264. Se trata de una fibra de acero inoxidable funcionalizada con plata, después con MPTES (3-mercaptopropiltrietoxisilano) y después con APTES para después sumergirlo varias veces en cristales prefabricados de MIL-88 con óxido de grafeno rotando varias veces la fibra. Además de estar fabricada en acero inoxidable, es imposible la fabricación de fibras homogéneas, teniendo en cuenta que es el experimentador el que rota la fibra y que sucesivas inmersiones no implican un grafting covalente, sino mediante interacciones débiles que puede desprenderse en procedimientos de Deep (direct)-immersion.

b. *Anal. Chem*. 2011, Vol. 83, N° 18, pp. 7094-7101. En este caso, la fibra de acero inoxidable se sumerge directamente, sin previa funcionalización, en una disolución conteniendo nanocristales de distintas redes metal-orgánicas. La unión entre la fibra de acero inoxidable y los nanocristales es una adherencia por interacciones débiles. Esta fibra, por tanto, no se podrá utilizar en sistemas de Deep (direct)-immersion debido a la fragilidad del acero inoxidable y a la escasa adherencia de los cristales al sustrato.

c. La patente CN105056915A presenta una estrategia metodológica para un sistema de análisis diferente de la microextracción en fase sólida. En esta invención, partículas de óxido de hierro son funcionalizadas con APTES y la red metal-orgánica MIL-101(Cr) para luego postmodificarla con aptámeros de ácidos nucleicos. No se trata de una fase estacionaria, puesto que el sistema está formado por partículas que se dispersan en la muestra y parte de un óxido de hierro (en todo caso, similar a la sílice).

d. *J. Chromatogr*. A 2016, Vol. 1436, pp. 1-8, *Chem. Commun*. 2013, Vol. 49, pp. 2142-2144 y *J. Mater. Chem*. A 2014, Vol. 2, N° 34, pp. 13868-13872. En estos documentos, se presenta una fibra de sílice fundida, recubierta con diferentes redes metal-orgánicas. Como se ha descrito anteriormente en esta memoria, la sílice fundida es muy frágil y es origen de uno de los problemas básicos de la SPME, la rotura de la fibra al atravesar los septa de los viales de las muestras o incluso roturas en el propio sistema de inyección del cromatógrafo, lo que genera muchos problemas instrumentales y económicos. La robustez del dispositivo es un requerimiento en ciertas aplicaciones, como la realización de ensayos *in vivo*, donde se ha destacado que la fragilidad de las fibras comerciales y las basadas en sílice son una desventaja considerable (*TrAC TrendsAnal. Chem*. 2019, Vol. 115, pp. 203-213).

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas. Para el experto en la materia, otros aspectos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Explicación de la invención

La presente invención provee de una fase estacionaria para dispositivos de microextracción en fase sólida (SPME) que puede ser utilizada para el análisis cromatográfico en aplicaciones medioambientales, alimentarias, etc. En estas fases estacionarias, la red metal-orgánica es el único componente que entra en contacto con la muestra a analizar. Esta fase estacionaria tiene forma cilíndrica con un núcleo realizado en una aleación de níquel y titanio que provee de estabilidad térmica y mecánica al sistema y una estructura química con enlaces de forma radial. Dicho soporte de niquel/titanio es la primera vez que se utiliza para soportar una red metal-orgánica.

Aleaciones de niquel/titanio habían sido testadas anteriormente presentando problemas de funcionalización y de adhesión por caída del recubrimiento *(peeling-off)*. Técnicas como la sol-gel se emplean para intentar mejorar la adhesión creando una superficie de sílice exterior, sobre la que anclar un polímero.

El método de preparación de las fases estacionarias consiste en varios pasos que proporcionan una adhesión covalente del MOF a la aleación de niquel/titanio. Esta secuencia de pasos produce la mencionada secuencia atómica radial para cada uno de los casos descritos en las distintas realizaciones de la invención.

La síntesis de la fase estacionaria es simple, no requiere de numerosos pasos y es medioambientalmente sostenible, puesto que no utiliza disolventes orgánicos (véase primera realización preferente de la invención), al contrario que otras fases estacionarias descritas previamente. Además, la síntesis no requiere de materiales adicionales como polímeros, líquidos iónicos o nanomateriales de carbono que actúen como soporte, coadyuvante o soporte

para unir el MOF al sustrato y que pueden afectar a la eficacia extractiva o a la uniformidad del recubrimiento y, en particular, a diferencias sustanciales entre síntesis consecutivas (con la consiguiente falta de reproducibilidad intrínseca).

El dispositivo de SPME con fase estacionaria descrita en esta invención puede utilizarse para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en agua y se obtienen eficacias extractivas mejores que las obtenidas con las fibras comerciales disponibles en idénticas condiciones.

El dispositivo de SPME con la fase estacionaria descrita en esta invención es mecánicamente superior al resto de fibras. El sustrato de nitinol y la unión covalente de la red metal orgánica hace que la fibra sea simultáneamente elástica y robusta. De esta forma no presenta los problemas de otras fases estacionarias para dispositivos de SPME en su utilización habitual: i) rotura al atravesar el septum de los viales o el septum del inyector (sílice), ii) maleabilidad y plasticidad (acero inoxidable), iii) oxidables y maleables (cobre), iv) coste (platino, oro y plata). El dispositivo de SPME con la fase estacionaria descrita en esta invención es químicamente estable en la mayoría de los disolventes orgánicos utilizados en cromatografía líquida (acetonitrilo, etanol, metanol, acetona...) o en cromatografía de gases (hexano, cloroformo...) y en agua. Por tanto, no existen pérdidas ni deformaciones del material sorbente que hagan perder las cualidades del dispositivo. Materiales sorbentes unidos a sustratos mediante pegamentos o enlaces no covalentes presentan pérdidas de material y desprendimientos, impidiendo su uso en 'direct-immersion' o desorción asistida por disolventes (ver por ejemplo: https://www.siqmaaldrich.com/content/dam/siqma-aldrich/docs/Supelco/General lnformation/1/SPME for GC brochure MRK final web.pdf).

Las fibras de SPME descritas en esta invención, debido a la estabilidad química, y robustez que presentan, pueden utilizarse tanto en sistemas de desorción líquida asistida por vortex para análisis en cromatografía líquida. Esta estrategia de desorción no es utilizada con los dispositivos de SPME existentes previamente puesto que en ellos se rompe la fibra o se destruye la fase estacionaria.

Las fibras de SPME descritas en esta invención, debido a la robustez del sustrato y la unión covalente de la red metal-orgánica, además de la biocompatibilidad de sustrato y MOF pueden ser utilizadas en aplicaciones in vivo, donde los sustratos de sílice, por su fragilidad, son descartados.

El dispositivo de SPME con las fases estacionarias fabricadas según esta metodología se activa a 150°C durante 3 horas para evacuar el disolvente que hubiera podido quedar en los poros del MOF. Una vez activado, el dispositivo de SPME es estable para utilizarlo en técnicas de espacio en cabeza (head-space, HS), en inmersión directa (direct immersion, DI). Cuando se utiliza el dispositivo en HS, su RSD máxima (%) para análisis en el mismo día, en varios días, o con varias fibras es de 13, 15 y 15%, respectivamente. Cuando se utiliza el dispositivo en DI, su RSD (%) para análisis en el mismo día, en varios días, o con varias fibras es de 10, 17 y 20%, respectivamente.

Breve descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1.- Esquema representativo del pretratamiento de la fibra metálica. I = base, II = (3-aminopropiltrietoxisilano aplicado durante 3h a temperatura ambiente.

Figura 2.- Imagen de microscopía electrónica de barrido de una de las fibras con el recubrimiento de MOF.

Figura 3.- Cromatograma obtenido durante la determinación de 10 hidrocarburos policíclicos aromáticos (a = naftaleno, b = acenaftileno, c = acenafteno, d = fluoreno, e = fenantreno, f = antraceno, g =fluoranteno, h = pireno, i = benz(a)antraceno, yj = criseno) a una concentración de 50 ppb en 10 mL de agua mediante un dispositivo de SPME con la fase estacionaria MOF preparada mediante el procedimiento descrito y utilizando la técnica de head-space (HS) con un tiempo de extracción de 60 minutos y una temperatura de extracción de 75°C y agitación. Tras la extracción, se realiza la desorción en el inyector de un cromatógrafo de gases a 280°C durante 4 minutos.

Figura 4. Comparativa de las áreas de pico del cromatograma obtenido para la fibra de SPME (utilizando HS-SPME-cromatografía de gases) con la fase estacionaria fabricada según esta invención y una fibra de SPME comercial con PDMS como fase estacionaria (a = naftaleno, b = acenaftileno, c = acenafteno, d = fluoreno, e = fenantreno, f = antraceno, g = fluoranteno, h = pireno, i = benz(a)antraceno, y j = criseno).

Realización de la invención

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

En una realización de la invención se obtiene la fase estacionaria de secuencia atómica radial Ni/Ti-O-Si-CH2-(CH2)4-CH2-NH2-AI-O-C-red metal-orgánica (MOF) mediante tres pasos:

i) inmersión del núcleo en una disolución alcalina, ii) adhesión de un silano con funcionalización amino-terminal y iii) crecimiento del MOF mediante técnica solvotermal.

El procedimiento detallado se expone a continuación:

1. Se utiliza una fibra de nitinol y se sumerge en una disolución de H202 (5-30% v/v) durante 1-3 horas a reflujo. Se extrae la fibra y se lava con agua destilada y etanol. Se introduce entonces la fibra en un vial que contiene (3-aminopropil) trietoxisilano durante 2-24 horas a 30-50°C. Se extrae la fibra y se lava con etanol (Figura 1).

2. Se sumerge 1 cm de la fibra pretratada en una disolución acuosa (15 mL) que contiene 1 mmol de ácido mesacónico, 1 mmol de nitrato de aluminio nonahidratado y 0,5 mmol de urea en un vial de vidrio de 26 mL, sellado con teflón y tapado.

3. Se mantiene el vial a 150°C durante al menos 2 horas, para después sacarlo del horno y dejarlo enfriar al aire.

4. Se extrae la fibra de la disolución y se lava abundantemente con agua destilada, etanol y acetona.

5. El dispositivo de SPME con la fibra recubierta con la fase estacionaria MOF se introduce en el inyector de un cromatógrafo de gases y se mantiene a 150°C durante 3 horas bajo un flujo constante de N2 para activar el MOF y eliminar cualquier molécula que haya podido quedar atrapada en los poros.

6. Se realiza una determinación analítica de 10 hidrocarburos policíclicos aromáticos a una concentración de 50 ppb en 10 mL de agua mediante la técnica de head-space (HS) con un tiempo de extracción de 60 minutos y una temperatura de extracción de 75°C y agitación. Tras la extracción, se realiza la desorción en el inyector de un cromatógrafo de gases a 280°C durante 4 minutos. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 3.

7. Las áreas de pico obtenidas para el dispositivo de SPME con la fase estacionaria obtenida según el método descrito y la comparativa con un dispositivo de SPME con fase estacionaria convencional de polidimetilsiloxano (PDMS) en las mismas condiciones se muestran en la Figura 4. Como se observa, para hidrocarburos de pequeño tamaño, la nueva fase estacionaria mejora notablemente el rendimiento, mientras que, para hidrocarburos pesados, el rendimiento es similar.

En otra realización de la invención, la fase estacionaria de secuencia atómica radial Ni/Ti—O—Si-CH2-(CH2)4-CH2-NH-C0-(C6H4)-C00-AI-0-C-red metal-orgánica (MOF) se obtiene en cuatro pasos, i) inmersión del núcleo en una disolución alcalina, ii) adhesión de un silano con funcionalización amino-terminal, iii) formación de amida con un cloruro de ácido y iv) crecimiento del MOF mediante técnica solvotermal, según el procedimiento:

1. Se utiliza una fibra de nitinol y se sumerge en una disolución de H2O2 (5-30% v/v) durante 1-3 horas a reflujo. Se extrae la fibra y se lava con agua destilada y etanol. Se introduce entonces la fibra en un vial que contiene (3-aminopropil) trietoxisilano durante 2-24 horas a 30-50°C. Se extrae la fibra y se lava con etanol (Figura 1).

2. Se sumerge la fibra en una disolución de tetrahidrofurano en la que se ha disuelto cloruro de tereftaloilo y trietilamina (en cantidades equimolares). Esta disolución se lleva a reflujo durante 24 horas. Tras este periodo, la fibra se lava con agua destilada y acetona.

3. Se sumerge 1 cm de la fibra pretratada en una disolución acuosa (15 mL) que contiene 1 mmol de ácido fumárico, 1 mmol de nitrato de aluminio nonahidratado y 0,5 mmol de urea en un vial de vidrio de 26 mL, sellado con teflón y tapado. Se mantiene el vial a 150 °C durante al menos horas, para después sacarlo del homo y dejarlo enfriar al aire.

4. Se extrae la fibra de la disolución y se lava abundantemente con agua destilada, etanol y acetona.

5. El dispositivo de SPME con la fibra recubierta con la fase estacionaria MOF se introduce en el inyector de un cromatógrafo de gases y se mantiene a 150 °C durante 3 horas bajo un lujo constante de N2 para activar el MOF y eliminar cualquier molécula que haya podido quedar atrapada en los poros.

En otra realización de la invención se obtiene la fase estacionaria de secuencia atómica radial 20 Ni/Ti-0-Si-CH2-(CH2)4-CH2-NFl2-AI-0-C-red metal-orgánica (MOF) mediante tres pasos: i) inmersión del núcleo en una disolución alcalina, ii) adhesión de un silano con funcionalización amino-terminal y iii) crecimiento del MOF mediante técnica solvotermal.
El procedimiento detallado se expone a continuación:

1. Se utiliza una fibra de nitinol y se sumerge en una disolución de H202 (5-30% v/v) durante 1-3 horas a reflujo. Se extrae la fibra y se lava con agua destilada y etanol. Se introduce entonces la fibra en un vial que contiene (3-aminopropil) trietoxisilano durante 2-24 horas a 30-50°C. Se extrae la fibra y se lava con etanol (Figura 1).

2. Se sumerge 1 cm de la fibra pretratada en una disolución acuosa (15 mL) que contiene 1 mmol de ácido tereftálico, 1 mmol de nitrato de aluminio nonahidratado en un reactor de teflón de 23 mL.

3. Se mantiene el reactor a 220 °C durante 72 horas, para después sacarlo del horno y dejarlo enfriar al aire.

4. Se extrae la fibra de la disolución y se lava abundantemente con agua destilada, etanol y acetona.

5. El dispositivo de SPME con la fibra recubierta con la fase estacionaria MOF se introduce en el inyector de un cromatógrafo de gases y se mantiene a 350 °C durante 3 horas bajo un flujo constante de N2 para activar el MOF y eliminar cualquier molécula que haya podido quedar atrapada en los poros.

6. La fibra así tratada puede utilizarse para la determinación de moléculas no volátiles mediante direct-immersion, para después realizar la elución en un pequeño volumen de un disolvente orgánico (compatible con las fases móviles habituales de HPLC) y agitación por vortex y finalmente realizar la inyección para la determinación analítica en un cromatógrafo HPLC. Pueden utilizarse otro tipo de disolventes, e incorporar a continuación una etapa de 10 cambio de disolventes para asegurar la compatibilidad con HPLC.

REIVINDICACIONES

1. Fase estacionaria para dispositivo de microextracción en fase sólida que comprende un sustrato de nitinol, un intermedio unido covalentemente al sustrato y una red metal-orgánica unida covalentemente al intermedio, donde el intermedio es Ni/Ti— O—Si— CH2—(CH2)4—CH2—NH2—Al—O—C—red metal-orgánica o Ni/Ti—O— Si—CH2- (CH2)4—CH2— NH-CO-(C6H4)-COO-Al-O-C-red metal-orgánica, y donde la red metal-orgánica es mesaconato de aluminio(lll), fumarato de aluminio(lll), tereftalato de aluminio(lll) o una mezcla de las mismas.

2. Procedimiento de obtención de la fase estacionaria según reivindicación 1 que comprende, al menos, las siguientes fases: inmersión del núcleo en una disolución alcalina, adhesión de un silano con funcionalización amino-terminal y crecimiento del MOF mediante técnica solvotermal.

3. Dispositivo de microextracción en fase sólida que comprende una fase estacionaria según la reivindicación 1.

4. Uso del dispositivo según reivindicación 3 para el análisis de hidrocarburos policíclicos aromáticos mediante un uso en espacio en cabeza.

5. Uso del dispositivo según reivindicación 3 para el análisis de moléculas no volátiles en direct-immersion utilizando disolventes orgánicos por desorción y vortex para inyección en cromatografía líquida.

Figura 1

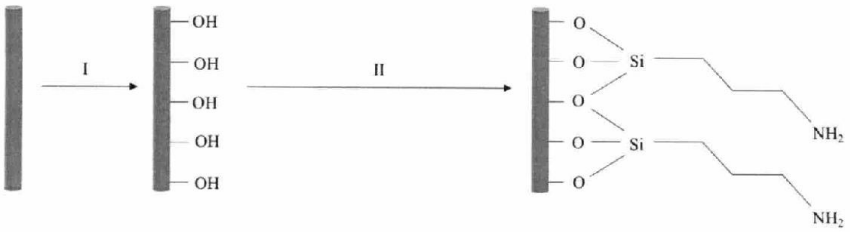

Figura 2

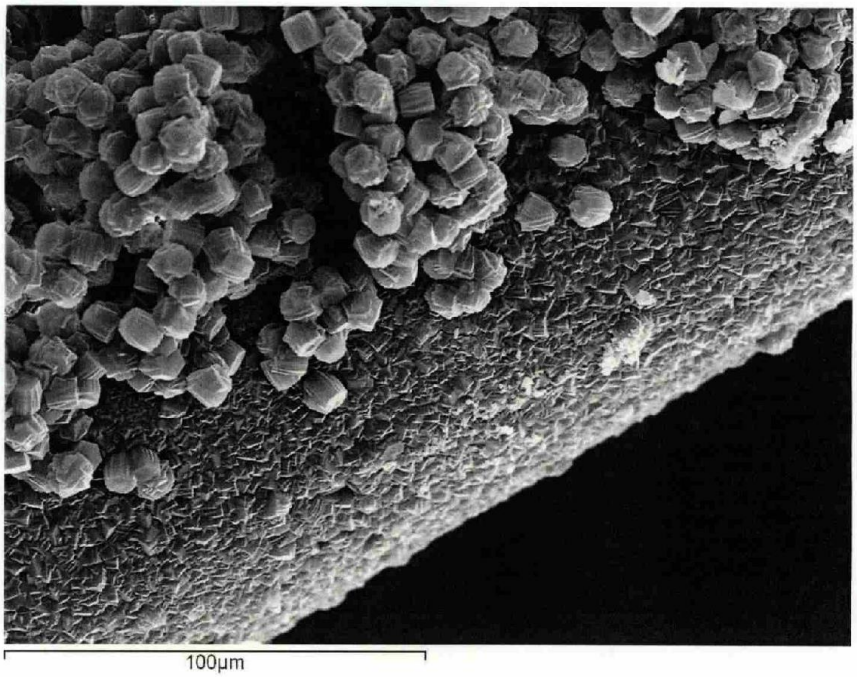

Figura 3

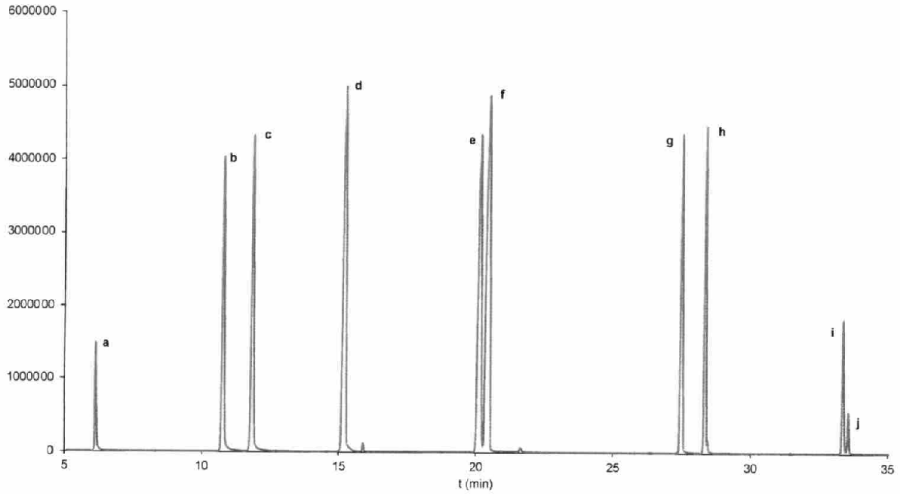
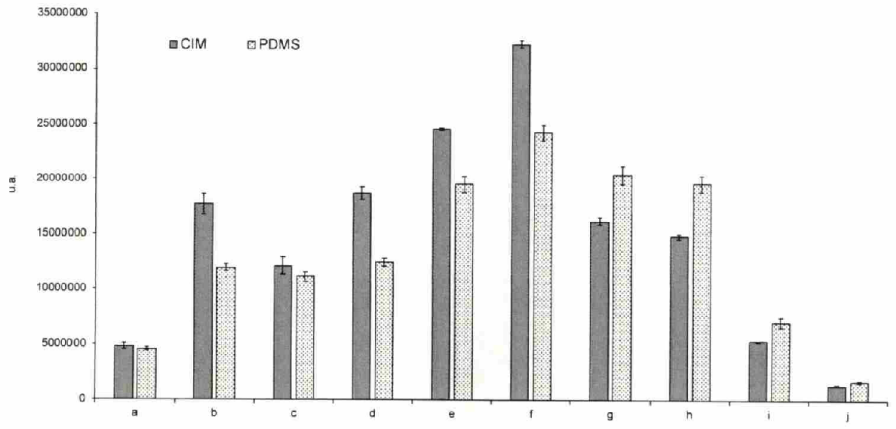
Figura 4