



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 177 380**

② Número de solicitud: 200000309

⑤ Int. Cl.7: **C02F 1/28**

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **09.02.2000**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2002**

Fecha de la concesión: **14.07.2004**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.08.2004**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.08.2004

⑦ Titular/es: **Universidad de Granada
Acera de San Ildefonso, nº 42, 2ª planta
18071 Granada, ES**

⑧ Inventor/es: **Mascaro Lazacano, Carmen;
Cifuentes Melchor, Javier;
Rosales Lombardo, María José y
Osuna Carrillo de Albornoz, Antonio**

⑨ Agente: **No consta**

⑩ Título: **Procedimiento para la eliminación de contaminantes biológicos del agua.**

⑪ Resumen:

Procedimiento para la eliminación de contaminantes biológicos del agua.

Se ha desarrollado un procedimiento para purificación de aguas u otros fluidos, capaz de eliminar contaminantes biológicos, tales como: virus, bacterias, protozoos patógenos y sus quistes. Está basado en la capacidad de adsorción de proteínas de polímeros fluorados como el PVDF. Permite la recuperación posterior de los organismos retenidos posibilitando un análisis posterior de interés epidemiológico, tanto cuali como cuantitativo.

ES 2 177 380 B1

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

DESCRIPCION

Procedimiento para la eliminación de contaminantes biológicos del agua.

Objeto de la invención

Consiste en el desarrollo de un procedimiento para la purificación de aguas de bebida, residuales o recreativas, capaz de eliminar contaminantes biológicos, tales como protozoos o sus quistes, levaduras, bacterias y virus. El método se ha valorado para la eliminación de agentes de epidemias por vía hídrica, como son *Cryptosporidium parvum* y *Giardia*, de amebas como las del género *Acanthamoeba*, agentes de encefalitis y queratitis, (al tiempo que vehículos de *Legionella pneumophila*), bacterias como *Bacillus cereus*, y el fago T4 de *E. coli*. Se ha determinado igualmente su capacidad de adsorción de proteínas en muestras de aguas con diferente conductividad, al objeto de determinar su eficacia a niveles de saturación y en diferentes condiciones de salinidad.

El procedimiento está basado en la demostrada capacidad de adsorción de proteínas de algunos polímeros fluorados como el fluoruro de polivinideno (PVDF), El PVDF, un termoplástico fluorinado, es un polímero con alta capacidad de retención de proteínas, formado de radicales vinilo libres polimerizados a partir del monómero fluoruro de vinilideno.

Es muy conocido y utilizado como material piezoelectrico, ortotrópico, termoreológicamente simple, con unos coeficientes piezoelectricos de tensión constantes bajo condiciones experimentales de estrés, frecuencias y temperaturas. Su capacidad intrínseca para retener proteínas hace que sea empleado en análisis de aminoácidos, secuenciación de proteínas, transferencia de bandas ("western transfer"), mapeo de péptidos, y transferencia de manchas ("dot blots"). Al ser químicamente muy resistente, (ácidos orgánicos, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, alcoholes, solventes halogenados, ambientes oxidantes) y también a altas temperaturas, se emplea para revestir cables eléctricos, y en la industria química para recipientes. Tiene gran resistencia al tiempo; sus propiedades permanecen constantes tras muchos años de uso continuo.

Este polímero una vez activado, capta las proteínas de las paredes y membranas de los organismos que puedan encontrarse en el agua, lo que conlleva su retención. Se lleva a cabo empleando éste en forma de multifilamentos, lo que crea una gran superficie adsorptiva. Puede aplicarse indistintamente a grandes o pequeños volúmenes de agua, así como a otros fluidos. Permite la recuperación posterior de los organismos retenidos, posibilitando efectuar un posterior estudio de interés, diagnóstico y/o epidemiológico, tanto cuali como cuantitativo. Posee, por ello, una doble utilidad, eliminación por una parte, y detección o diagnóstico por otra.

Antecedentes

Se han patentado numerosos sistemas de filtración y depuración de aguas con el propósito de potabilizarlas, eliminando contaminantes químicos o biológicos. La mayor parte de ellos se basan en el empleo de fibras o membranas filtrantes, con tamaños de poro variables.

Los medios filtrantes usados más habitualmente para la filtración -depuración de aguas están basados en el uso de tierra de diatomeas, carbón activo granulado, carbón fibroso, medios metálicos granulados, distintos tipos de arenas neutralizantes, arena de sílice, alumina activada, resinas intercambiadoras de iones, polímeros adsorbentes, adsorbentes químicos, óxido de manganeso, materiales porosos (plásticos, cerámicos o de papel), y filtros de fibra de vidrio.

La mayoría de los sistemas de filtración de aguas patentados, dirigidos a eliminar la contaminación aniónica o catiónica, están basados en el uso de materiales tales como la hialina recubiertas de resinas cambiadoras de iones. Se emplean filtros que combinan materiales orgánicos, celulosa o sus derivados o polímeros con un tamaño de poro pequeño, que retiene las partículas mayores que el tamaño de poro, o bien materiales inorgánicos como sílice ó fibra de vidrio, recubiertos de las sustancias intercambiadoras para hacer que aumente su eficacia en la retención de partículas eléctricamente cargadas.

Los sistemas de filtración microbiológica están basados mayoritariamente en un proceso de eliminación física mediante membranas microporosas filtrantes. Estas son de materiales celulósicos, o polímeros sintéticos. A algunos de estos filtros se les agregan agentes bactericidas, tales como Iodo o derivados, Bromo o derivados, sales de amonio cuaternario, y/o metales como plata o sus sales, metales pesados, o sales como el carbonato de calcio.

Relativos a quistes de protozoos patógenos agentes de afecciones intestinales

Al menos un 35% de los trastornos gastrointestinales padecidos por el hombre están ligados al agua de suministro y son, por tanto, previsibles. El control protozoológico de las aguas de bebida está claramente estipulado en las legislaciones de los países más desarrollados desde hace años (USEPA.1989. National Primary Drinking Water Regulations. Final Rule Fed.Reg.54:27486-541; Federal Register Canada 1989. National Primary Drinking Water Regulations.54:27544; American PublicHealth Association. Standard Methods.1992.9-125), estipulándose que los tratamientos de aguas deben eliminarlos en un 99,9%. La legislación española no contempla aún el control protozoológico de aguas de bebida, depuradas o recreacionales. Las directrices de la OMS establecen que el agua de suministro no debe albergar quistes de ningún protozoo patógeno (W.H.O. 1984. Guidelines for Drinking Water Quality.Vol.1. Recommendations. Ginebra). Los dos protozoos patógenos de transmisión hídrica más importantes son *Cryptosporidium* y *Giardia*, ambos objeto de amplio estudio en los países desarrollados, en lo relativo a detección de brotes epidémicos, seguimiento e implantación de medidas de control (Kramer y col 1996.NMWRCDC Surveill Summ.45:1-33). Se sabe desde los años 60, que *Giardia* es el agente patógeno más común en brotes epidémicos por agua. Causa el 25% de todos los casos de gastroenteritis en Norte América. Los quistes pueden sobrevivir hasta 3 meses en el agua, y son altamente resistentes a la cloración. La infección se puede desencadenar

a partir de un solo quiste. El período de incubación es típicamente de una semana, los trastornos intestinales (diarrea esteatorreica) duran unas 2 semanas, aunque la enfermedad puede cronificarse durante años, con graves problemas de malabsorción. El tratamiento que se prescribe en nuestro país (Metronidazol) es teratogénico y mutagénico, por lo que está contraindicado en niños y embarazadas. Por otra parte, cada día se detectan más cepas de *Giardia* Metronidazol-resistentes. Si bien en giardiasis esporádica la más afectada es la población infantil (colegios, guarderías), cuando la afección es epidémica por contaminación del agua de suministro no discrimina edad, afectándose en igual medida la población adulta y la infantil.

Cryptosporidium es igual que *Giardia* un agente de procesos diarreicos. Las diferencias fundamentales estriban en: 1° - se trata de una zoonosis. 2° - es un patógeno potencialmente mortal para inmunodeprimidos, lactantes y personas mayores. Al tratarse de una zoonosis la contaminación de las redes de suministro suele provenir de heces animales, siendo especialmente importantes los animales estabulados. En nuestra región el ganado bovino y caprino es el epidemiológicamente más relevante. Los animales afectados arrojan al medio ambiente billones de formas de resistencia (ooquistes) al día, que se diseminan en el medio, pueden contaminar directamente los acuíferos, y aparecer en las aguas depuradas que se emplean para riego agrícolas u ornamentales, o en abonos de origen animal. La población de alto riesgo son por una parte los profesionalmente expuestos (veterinarios, matarifes, empleados de granjas, etc.), y por otra los que padecen inmunodepresión, congénita, yatrogénica o adquirida, y sus cuidadores (incluyendo médicos, enfermeras, etc.). En inmunocompetentes la criptosporidiosis es una afección autolimitada, con un período de incubación de 7-10 días, diarrea tipo colérica que remite de forma espontánea en un mes o más. En inmunodeficientes la afección se cronifica, se hace recalcitrante y el parásito difunde del intestino a otras localizaciones. No existe terapia específica. La primera epidemia de *Cryptosporidium* por vía hídrica se describió en USA en 1984 (D'.Antonio y cols 1985. Ann.Intern.Med.103:886), tras ello en Inglaterra, Escocia, Suecia, Italia, España, Canadá, y prácticamente en todos los países donde se ha investigado al efecto. La epidemia más relevante fue la de Milwaukee en 1993 (Mackenzie y cols. 1994. New England J. Med.331:161-7), donde se afectaron 403.000 personas, lo que condujo a un mayor esfuerzo en las medidas de control. Esta epidemia demostró que los "standards" de calidad de aguas no eran indicativos de la presencia o ausencia de quistes de protozoos. La epidemia de marzo de 1997 en Hertfordshire y norte de Londres dió una gran importancia económica al problema, pues las familias afectadas (300.000) exigieron una indemnización (un total de 3 millones de libras), a la empresa suministradora de agua por verse obligados a hervir el agua de bebida, durante los 16 días que duró el estado de alerta.

El problema se plantea también en piscinas públicas, los ooquistes de *Cryptosporidium* sopor-

tan la cloración, y ello ha dado lugar a epidemias de criptosporidiosis por contaminación del agua con ooquistes. En los países en vías de desarrollo, *C. parvum* es uno de los agentes más importantes de procesos diarreicos en población infantil, en ellos la mayor fuente de contaminación es también en el agua, en este caso por la ausencia de fuentes adecuadas de suministro.

La presencia de amebas anfitoicas (*Naegleria* y *Acanthamoeba*) en aguas recreacionales, (piscinas, lagos artificiales, etc.), puede llevar a brotes aislados o epidémicos de afecciones del sistema nervioso central, que cursando en forma aguda o crónica llevan a la muerte de pacientes inmunocompetentes (*Naegleria*) o con las defensas comprometidas (*Acanthamoeba*). Especialmente peligrosas son las piscinas climatizadas donde la temperatura del agua favorece el desarrollo exhaustivo de las amebas. En los filtros domiciliarios usualmente empleados, se multiplican las poblaciones de amebas que llegan a ellos con el agua de suministro en bajas concentraciones. Si el usuario se descuida en el recambio del cartucho filtrante, (carbón o arena) las poblaciones bacterianas que en él se acumulan ofrecen alimento fácil a estas amebas que, al no afectarse por el cloro, proliferan exhaustivamente. Algunos casos mortales de encefalitis por *Acanthamoeba* han sido debidos a este hecho.

Un problema relacionado son las queratitis debidas a *Acanthamoeba*, consecuencia directa del lavado de ojos con agua donde se desarrollan las amebas, o de la aplicación de lentillas a las que se han fijado. En este sentido, se investigan líquidos de lavado o procedimientos físicos, que inactiven a *Acanthamoeba*, lo que es difícil pues las formas quísticas están protegidas por dos paredes extremadamente resistentes. La mayoría de los casos en los últimos años están asociados al uso de lentillas blandas y al desarrollo de las amebas en los líquidos de lavado. Un agua segura es sólo aquella donde no se desarrollan *Naegleria fowleri* o *Acanthamoeba spp*, es decir donde se han eliminado mediante filtración u otros sistemas las amebas potencialmente patógenas o sus quistes.

Las amebas de agua dulce potencialmente patógenas plantean también un problema en acuarios y piscifactorías, son patógenos oportunistas cuyo desarrollo en las branquias de peces conduce a una patología, que se agrava al asociarse otros oportunistas como hongos y bacterias.

Legionelosis

Las epidemias de legionelosis (*Legionella pneumophila*) están asociadas a la existencia de amebas (*Acanthamoeba* y otros géneros) en los circuitos cerrados de refrigeración (Moffat, J.F. & Tompkins, L.S., 1992, Infection and Immunity, pp: 296-301; Neumeister, B. y cols., 1997, Applied and Environmental Microbiology, pp:1219-24). *Legionella* es una bacteria que no puede sobrevivir aislada, precisa un soporte celular, que son precisamente amebas. Si no hay amebas en el agua, no hay *Legionella*. Es más, hay trabajos indicativos de que la patogenidad bacteriana es dependiente del paso previo por el citoplasma de *Acanthamoeba*.

Otros sistemas de filtración para eliminación de contaminación biológica

Quistes de protozoos patógenos

El único artículo relacionado, (Microporous polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane filter to separate contaminating viral particles from biologically important proteins. Biologicals 24(2,137-145.1996)), emplea una membrana filtrante de PVDF. Esta, con un tamaño de poro de 0.45 a 0.22 μm , se valoró para eliminar partículas virales de medios de cultivo, suero bovino fetal, y otros líquidos que se emplean para cultivos en el laboratorio. Se emplea pues como un medio para filtración esterilizante, pues provee un tamaño de poro similar al de las membranas de nitrocelulosa o de acetato de celulosa empleadas habitualmente para la filtración de medios de cultivo e inyectables. Los autores hallan una gran efectividad en la eliminación de partículas virales mayores de 50 nm.

Los sistemas patentados para filtración de agua son numerosos como ya se ha indicado en antecedentes. La mayoría son filtros con cartuchos recargables de hilo de algodón, hilo de "zamarri-lla", o filtros de membrana. El precio de estos filtros es variable, un equipo pequeño, de camping, para uso individual (N°C8800 Water Filter Coghlan's), viene a costar unos 29.9US, y 13.39 US el recambio. En el caso de membranas, si hay muchas partículas en el agua es necesario poner varias mallas de distinta luz, pues caso contrario se obturan y colman muy pronto. La luz del filtro debe ser muy inferior al tamaño de las partículas que se pretende eliminar. En el caso de *Giardia* y *Cryptosporidium*, la seguridad estriba en el uso de filtros de "una micra absoluta", lo que hace el procedimiento excesivamente costoso e inaplicable a grandes volúmenes de agua. Las plantas comerciales de filtración incluyen la adición de un coagulante al agua previo a la filtración por filtros de arena. La filtración convencional incluye: coagulación, floculación, sedimentación o flotación y filtración. La filtración directa no precisa sedimentación.

Explicación de la invención

La invención consiste en un procedimiento para procesar agua u otros fluidos a través de una matriz activada de hilo de PVDF formado por multifilamentos, de entre 5 y 90 μm de diámetro con forma de membrana o columna que proveen una gran superficie para la retención de agentes patógenos presentes en aguas, (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *Acanthamoeba*, *Naegleria* y otros protozoos patógenos), así como levaduras, bacterias y virus. Es además aplicable a la concentración de agentes patógenos para detectar o diagnosticar determinar su presencia cualitativa y cuantitativa en aguas y en otros fluidos.

Se usa fibra de PVDF de unas 30 μm de diámetro, en el caso ensayado, y/o de hilo del mismo material (cada hilo está formado por 80 fibras de 30 μm), situada en una matriz, como cartucho filtrante, en una columna o en cualquier otro sistema que permita el paso de agua u otro fluido que contenga en suspensión o solución el material biológico a eliminar. La eliminación de contaminantes es tanto debida al impedimento físico de su paso a través de la matriz, como a

un proceso de retención inherente al polímero empleado.

Se puede usar para eliminar agentes patógenos de:

- Agua de suministro
- Aguas residuales tras decantación
- Aguas de instalaciones deportivas
- Agua de lavado de lentillas
- Aguas de acuarios y piscifactorías

También puede usarse la invención para retener agentes patógenos procedentes de muestras biológicas de origen animal o vegetal, que posteriormente y tras su procesamiento pueden ser usados para diagnóstico específico del organismo que se busca.

Manera de realizar la invención

Las pruebas experimentales llevadas a cabo en el laboratorio se han realizado a pequeña escala, y elevando el nivel de contaminantes a límites extremos, que nunca se van a hallar en condiciones naturales.

Se diseñó para ello una columna filtrante montada en un contenedor de plástico, vidrio o metal, de 5 ml de volumen que alberga fibra de PVDF (fabricada por POLISILK.S.A.) con un peso seco de 111 mg y un volumen de matriz de 1.8 ml. La matriz se mantenía en OHNa 0.1 M previo a su activación, durante al menos 13 horas. Se activaba, previo a su uso, en OHNa 0.5 M durante 90 min., mediante dos lavados de 45 minutos cada uno. Conservándose en una solución de OHNa 0.1 M, con 0.05% de Azida sódica, hasta su uso. Ya montada la columna en el soporte se hace pasar agua ultrapura para eliminar la solución conservante. El flujo de la muestra a procesar se estableció en 4.5 ml/minuto, para un volumen total de 25 ml de agua a filtrar en cada uno de los ensayos, siendo el volumen muerto 17.5 ml.

Para la recuperación tanto de las partículas orgánicas retenidas como de las proteínas, se emplea una solución de detergente constituida por SDS al 2%; Tritón X-100 al 1%, en 50 mM de Tris-HCl, a pH 9 (Szewczik, B. and D. F. Summers. 1988. Anal. Biochem. 168:48-53.) El detergente se hace circular por la columna, determinándose la recuperación de lo retenido, de acuerdo con cada uno de los protocolos ensayados. El procedimiento se ha valorado con éxito para la retención y posterior recuperación de: fago T4 de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum* y *Acanthamoeba* sp. Se valoró con albúmina de huevo la retención de proteínas empleando aguas con diferentes conductividades (49, 229, 375, 667 y 1.218 micro Siemens/ml), determinándose que el porcentaje de proteínas retenidas aumenta gradualmente con la conductividad del agua.

Se muestran, como ejemplo, las pruebas llevadas a cabo con *Cryptosporidium parvum*. Se emplearon ooquistes procedentes de heces de bovino, concentrados y purificados (Rosales, Mas-caró, Arnedo & Castilla. 1994. Acta Tropica.

56:371-373). Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica N° 1, expresados en porcentajes de retención tras cada pase por la columna. Se partió de una suspensión que albergaba 428.000 ooquistes/ml. La retención fue total a partir del 6° pase. En la misma gráfica se muestra la recuperación conseguida tras varios pases de la solución de detergente a través de la columna. La recuperación acumulada al 5° pase ascendió a

395.000/ml, es decir un 92.3% de los ooquistes introducidos.

Dada la capacidad de unión de proteínas o microorganismos tales como bacterias, levaduras o proteínas, puede ser usada como matriz para inmovilización de organismos o enzimas empleados en los procesos de fermentación o de producción industrial donde se requiera su empleo.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la eliminación de contaminantes biológicos del agua **caracterizado** por estar constituido por una matriz activada de filamentos de fluoruro de polivilideno (PVDF) con un grosor de entre 5 y 90 micrómetros de diámetro dispuestos en forma de membrana o columna que actúan de filtro.

2. Uso del filtro **caracterizado** en la reivindicación 1 para eliminación de agentes patógenos de agua de suministro.

3. Uso del filtro **caracterizado** en la reivindicación 1 para eliminación de agentes patógenos de aguas residuales tras su decantación.

4. Uso del filtro **caracterizado** en la reivindicación 1 para eliminación de agentes patógenos de aguas de instalaciones recreativas.

5. Uso del filtro **caracterizado** en la reivin-

dicación 1 para eliminación de agentes patógenos de agua de lavado de lentillas.

6. Uso del filtro **caracterizado** en la reivindicación 1 para eliminación de agentes patógenos de aguas de acuarios y piscifactorías.

7. Uso del filtro **caracterizado** en la reivindicación 1 para eliminación de protozoos, bacterias, levaduras y virus de agua de otros líquidos que los contenga.

8. Uso del filtro **caracterizado** en la reivindicación 1 para retención de agentes patógenos procedentes de muestras biológicas de origen animal o vegetal, que posteriormente y tras su procesado pueden ser usados para diagnóstico específico del organismo que se busca.

9. Uso del filtro **caracterizado** en la reivindicación 1 como matriz donde se adhieren bacterias, levaduras o enzimas requeridas en procesos industriales.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DIBUJOS

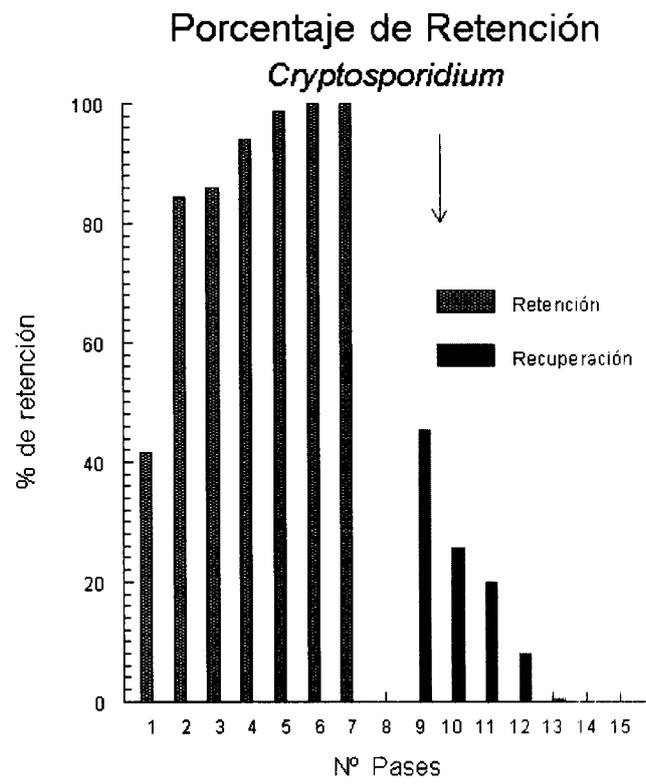


Figura n° 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 177 380

② Nº de solicitud: 200000309

③ Fecha de presentación de la solicitud: 09.02.2000

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C02F 1/28

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 5736051 A (DEGEN et al.) 07.04.1998, columna 3, líneas 19-29; columna 12, línea 13 - columna 13, línea 21.	1
A	ES 2049919 T (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA) 01.05.1994	1
A	JP 02-135189 A (MITSUI PETROCHEM IND CO LTD) 24.05.1990 (resumen) [en línea] [recuperado el 10.10.2002]. Recuperado de: EPO WPI Database, DW 199027, Nº acceso 1990-204863 [25]	1

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

04.11.2002

Examinador

N. Vera Gutiérrez

Página

1/1