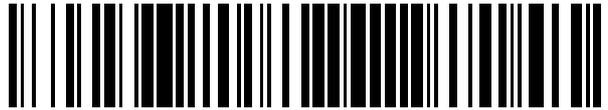


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: &)' ')' +

21 Número de solicitud: 201400961

51 Int. Cl.:

A01N 59/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

&+ '0/8'8\$%&

43 Fecha de publicación de la solicitud:

%\$'\$("8\$%)

71 Solicitantes:

I B=J9FG=858`7CAD@ H9BG9`89`A58F=8
fB\$`\$i Ł
GYWYQb`7 cbIfUrcg`mDUHbhYgž7 #8 cbcgc`7 cfIfg
)`!`%`d`UbHJ
&,\$%)`AUXf]X`9G`m
A=B=GH9F=C`89`89: 9BG5`fj`\$`i Ł

72 Inventor/es:

75 @C`; 5FF=8C`žAUf]J@i fXYg`m
75 G5G`<l 9FH5Gž>Uj]Yf

54 Título: A frcXc`XY`YghYf]`jnUWQb`Včb`7C&`mU] i U

57 Resumen:

Método de esterilización de materiales, que han sido contaminados biológicamente, utilizando CO₂ y agua. Más concretamente, la invención se ha desarrollado para el caso de que el material a esterilizar sea material sensible como por ejemplo material electrónico y óptico y ropa técnica. La presente invención igualmente se refiere al equipo para la esterilización desarrollado para llevar a cabo el método de la invención. Las condiciones en las que se realiza el tratamiento permiten conservar las propiedades del material esterilizado y, por tanto, permiten la reutilización del mismo.

9G&)' ' ')' +5%

MÉTODO DE ESTERILIZACIÓN CON CO₂ Y AGUA

DESCRIPCIÓN

OBJETO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un método de esterilización de materiales que han sido contaminados por microorganismos, utilizando CO₂ y agua.

10 Más concretamente, la invención se ha desarrollado para el caso de que el material a esterilizar sea un material sensible frente a condiciones extremas de presión y temperatura, como por ejemplo es el material electrónico y óptico, y la ropa técnica, aunque puede ser utilizado para cualquier tipo de material.

15 La presente invención igualmente se refiere al equipo para la esterilización desarrollado para llevar a cabo el método de la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Son conocidos diversos métodos de esterilización que tienen como objeto la destrucción bacterias o virus que hayan contaminado diversos materiales.

25 Sin embargo estos métodos implican unas condiciones de temperatura o de presión o se utilizan en ellos unos aditivos que si son aplicados a determinados materiales los destruyen, lo que implica la no posible reutilización de los mismos, con la carga económica que esto conlleva.

30 Por ejemplo se han desarrollado métodos de esterilización con CO₂ supercrítico para esterilizar alimentos. Así el documento titulado "*Microbial inactivation of paprika using high-pressure CO₂*" L. Torres, E. Torres, J. of Supercritical Fluids 52 (2010) 134-141 describe a adición de agua directamente al pimentón (paprika) para alcanzar un grado determinado de humedad previo a su desinfección con el CO₂ en condiciones supercríticas. Para obtener los mejores resultados de desinfección la temperatura que se utiliza en dicho método está por encima de los 70°C. En el caso de determinados materiales como puede ser ropa técnica o dispositivos electrónicos, estas condiciones no son aceptables ya que por encima de los 35 70°C se estropearían estos materiales y tampoco sería aceptables como ocurre en el documento antes citado mezclarlos con agua previamente a la aplicación del CO₂

supercrítico ya que esta carga de agua puede estropear los dispositivos electrónicos o vestimenta especializada.

Otro documento donde se describe un método de esterilización con CO₂ supercrítico es la solicitud de patente internacional con número de publicación WO2007008618, donde se desarrolla un método para la esterilización especialmente de elementos médicos e implantes. Este documento se enfoca especialmente a destruir cierto tipo de esporas tal como la *Bacillus subtilis* y *Geobacillus stearothermophilus* que son especialmente resistentes a los métodos ya conocidos de esterilización. En este sentido, en el documento se describe que para esporas especialmente resistentes como las mencionadas, el uso del agua como aditivo, no es suficiente para obtener el grado de esterilización deseado y que siempre es necesaria la presencia de agua oxigenada.

Por último señalamos una publicación donde se describe la esterilización de un material sensible como es un pen drive. En dicho documento titulado "*Sterilization of Bacillus pumilus spores using supercritical fluid carbón dioxide containing various modifier solutions*" de Edison Shieh, J. Of Microbiological Methods, 76(2009), 247-252, se describe la esterilización de un pen drive con CO₂ supercrítico y con diferentes aditivos como agua oxigenada. Específicamente se dice que la presencia solo de agua junto a CO₂ supercrítico no es suficiente para alcanzar la descontaminación del pen drive.

Por ello, por lo que se conoce en el estado de la técnica, se deriva que es necesario y de gran interés el desarrollo de un método de esterilización que no destruya el material a esterilizar pero que de igual manera sea capaz de eliminar los microorganismos más resistentes y que sea sencillo y limpio, sin ser necesaria la presencia de otros aditivos que no sea el agua.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han desarrollado un método de esterilización para cualquier tipo de material pero especialmente diseñado para que materiales sensibles a condiciones extremas, como elementos ópticos o electrónicos o tejidos de última generación sean recuperables tras el tratamiento de esterilización.

Al mismo tiempo el método es capaz de eliminar los microorganismos más resistentes, en presencia de CO₂ y agua.

En particular el método de la invención es capaz de eliminar esporas reduciendo su número inicial en seis unidades logarítmicas. Las esporas son estructuras muy resistentes que pueden sobrevivir a altas temperaturas y a condiciones muy desfavorables. Procesos de esterilización conocidos pueden eliminar virus o bacterias pero para eliminar las esporas son
5 necesarias condiciones extremas de temperatura y presión.

En la presente invención se propone el uso de CO₂ a alta presión como agente esterilizante, en condiciones de presión y temperatura alrededor o por encima del punto crítico (31°C y 74 bar), donde el CO₂ tiene unas especiales propiedades como de un gas denso con las que
10 puede penetrar muy bien en sólidos inactivando microorganismos.

Por lo tanto un primer aspecto de la invención se refiere a un método de esterilización con CO₂ y agua de un material portador de microorganismos que comprende la etapa de:
poner en contacto el material a esterilizar con CO₂ a una presión comprendida entre 50 bar
15 y 500 bar, una temperatura entre 25°C y 70°C, en presencia de una cantidad de agua, comprendida entre el 10% y el 100% en peso respecto al peso del material a esterilizar durante un tiempo comprendido entre 15 minutos y 60 minutos; donde la adición del agua se realiza mediante solubilización y arrastre por el CO₂ o inyectándola paralelamente al CO₂.

20 Las ventajas de este método son varias. La más importante es que permite la recuperación del material esterilizado ya que las condiciones del tratamiento no son extremas. La temperatura de aplicación es relativamente baja. Las condiciones de presión son suaves. Por tanto, es un método energéticamente más económico ya que las temperaturas de temperatura y presión que se alcanzan no son tan altas como en otros métodos de
25 esterilización. Desde el punto de vista tecnológico, el proceso es simple. El CO₂ es inerte, no tóxico, apto para consumo humano, accesible y barato, y en condiciones ambientales es gas, de tal forma que no deja ningún residuo en el producto final. Además al ser capaz de esterilizar con un aditivo como agua, es un método muy limpio desde el punto de vista ecológico.

30 Es muy importante en la presente invención, señalar que gracias a las condiciones utilizadas, los tiempos se acortan de manera muy importante respecto a otros métodos en los que se utiliza CO₂ y aditivos, e incluso en los métodos donde se utiliza condiciones más extremas de presión y temperatura.

35 Estos tiempos cortos se consiguen gracias al contacto óptimo que existe entre el material y el CO₂. El CO₂ se recircula sobre el material a alta velocidad, lo que mejora el contacto y

aumenta el tiempo de contacto. Esto aumenta la eficacia del método y hace posible que los tiempos de este método de esterilización sean mucho menores respecto a otros métodos en los que se utiliza CO₂ y aditivos.

- 5 La adición del agua se realiza mediante solubilización y arrastre del H₂O por el CO₂ o inyectándola paralelamente al CO₂.

En un segundo aspecto de la invención se describe un equipo para esterilización que comprende:

- 10 a. Un recipiente para contener el material a esterilizar con una línea de recirculación del CO₂;
- b. Un sistema de suministro del CO₂;
- c. Una línea de recuperación del CO₂;
- d. Una fuente de suministro de agua;
- 15 e. Dispositivos para el control y lectura de la presión y la temperatura;
- f. Dispositivos para operar de manera segura;
- g. Sistema para la despresurización del recipiente.

Se utiliza en ciclo cerrado, por tanto, sin apenas emisiones a la atmósfera y con alta
20 eficiencia energética.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Las FIG. 1 muestra un esquema del equipo de esterilización con CO₂ y agua

25

EXPOSICIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se ha dicho anteriormente el primer aspecto de la invención es un método de esterilización de un material portador de microorganismos que comprende la etapa de:

- 30 poner en contacto el material a esterilizar con CO₂ a una presión comprendida entre 50 bar y 500 bar, una temperatura entre 25°C y 70°C, en presencia de una cantidad de agua, comprendida entre el 10% y el 100% en peso respecto al peso del material a esterilizar durante un tiempo comprendido entre 15 minutos y 60 minutos; donde la adición del agua se realiza mediante solubilización y arrastre por el CO₂ o inyectándola paralelamente al CO₂.

35

Cuando en la presente invención se utiliza el término "microorganismo" se refiere a bacterias, virus, hongos, levaduras, mohos, esporas o combinaciones de ellos. Estos

microorganismos pueden ser patógenos. En una materialización preferente el microorganismo es una espora.

También de manera preferente el microorganismo a tratar puede ser un "arma biológica".

- 5 Por ellas se entiende cualquier patógeno, bacteria virus, espora, u hongo, que cause enfermedades y que por lo tanto pueda utilizarse como arma de guerra. Preferentemente *Bacillus Anthracis*, *Francisella Tularensis*, *Clostridium Botulinum*, *Vibrio Cholera*, *Bricella Spp*, *Yersinia Pestis*, *Shigela Spp*. Virus preferentes son: el virus que causa la viruela o los causantes de encefalitis equinas (virus de la EEV y WEEV) y de hemorragias virales tipo
- 10 Ébola (*Filovirus*), fiebre de lass, Junin, (*Arenavirus*) y amarilla o Dengüe (*Flavivirus*).

- El método de la invención gracias a las condiciones no extremas permite la reutilización de los materiales esterilizados. Por lo tanto de manera preferente el material es un material textil de última generación, ropa técnica, un material electrónico, un material óptico o un
- 15 material sanitario, y en general materiales termosensibles.

- Particularmente el material es un equipamiento militar. El equipamiento militar se refiere a distintos materiales de uso militar como tejidos o elastómeros o equipos de respiración autónoma (ERA) o de protección ocular, trajes de protección NBQ (Nuclear biológico y
- 20 químico), tales como los diversos tejidos de fabricación, las calzas y guantes. También se puede entender por equipamiento militar dispositivos sensibles electrónicos o eléctricos que pudiera llevar un combatiente como por ejemplo radios, móviles, tablets, smartphones, armas o equipamiento de campaña militar.

- 25 Preferentemente el material a tratar es un equipo de protección individual (EPI) de distintos colectivos en contacto con agentes biológicos como, personal sanitario, bomberos, miembros de protección civil, así como personal de laboratorios de biotecnología, agrarios, veterinarios y de cocinas, o en plantas de eliminación de residuos.

- 30 En realizaciones preferentes la cantidad de agua entre comprendida entre el 10% y el 40%, entre el 10% y el 30% en peso respecto al peso del material. Más preferentemente entre un 20% y el 30%.

- En realizaciones preferentes la presión se encuentra comprendida entre 50 bar y 500 bar,
- 35 entre 50 bar y 150 bar o entre 50 bar y 100 bar.

En realizaciones preferentes la temperatura se encuentra comprendida entre 30°C y 50°C, o entre 30°C y 40°C.

5 En realizaciones preferentes el tiempo se encuentra comprendido entre 15 minutos y 45 minutos o entre 15 minutos y 30 minutos.

En materializaciones preferentes el agua se acidifica en un rango de pH de 3 a 5, preferentemente 3 a 4.

Al acidificar el agua, se consiguen los mismos resultados a temperaturas menores.

10 En la realización más preferente la temperatura se encuentra entre 30°C y 40°C, el tiempo entre 30°C y 40°C y el pH entre 3 y 4.

Un segundo aspecto de la invención como se ha dicho se refiere a un equipo para esterilización que comprende:

- 15
- a. Un recipiente para contener el material a esterilizar con una línea de recirculación de CO₂;
 - b. Un sistema de suministro del CO₂;
 - c. Una línea de recuperación del CO₂;
 - 20 d. Una fuente de suministro de agua;
 - e. Dispositivos para el control y lectura de la presión y la temperatura;
 - f. Dispositivos para operar de manera segura;
 - g. Sistema para la despresurización del recipiente.

25 Preferentemente el recipiente que contiene el material a esterilizar presenta dispositivos que favorecen el contacto entre el CO₂ y el material, tales como agitadores tipo jet o cestas rotatorias, dispersores o atomizadores del CO₂, una línea de recirculación del CO₂ a alta velocidad.

30 Preferentemente el sistema de suministro de CO₂ es en modo bombeo o en modo compresor.

Preferentemente la línea de recuperación del CO₂ presenta un equipamiento para la limpieza del mismo y ajuste de sus condiciones de presión y temperatura para su posterior reuso.

35

Preferentemente la fuente de suministro de agua es un sistema de bombeo que la inyecte junto al CO₂, un recipiente que la contenga a través del cual pase el CO₂ y que permita su introducción disuelta o arrastrada por el CO₂.

- 5 Preferentemente los dispositivos para la operar de manera segura son válvulas de alivio y discos de ruptura tanto en el recipiente donde se alojan los materiales como en los recipientes de almacenamiento del CO₂, así como alarmas por alta presión y temperatura.

10 Preferentemente el sistema para la despresurización del recipiente es una válvula calentada o un sistema de equilibramiento de presiones y una línea de venteo.

En la FIG. 1 muestra el diagrama de flujo de una instalación concreta para el caso de operación en modo bombeo e introduciendo el agua en la línea de recirculación del CO₂ a alta velocidad. El CO₂ se suministra desde el tanque de almacenamiento (1) y se refrigera
15 en un cambiador (2), previo al bombeo para evitar la cavitación. En este cambiador, la fracción líquida del CO₂ almacenado en el tanque se enfría en contacto indirecto con una mezcla refrigerante que está a -25 °C formada por etilenglicol-agua al 50%. La bomba (3) lleva el CO₂ hasta la presión de tratamiento (<150 bar). Como durante la compresión no se calienta suficientemente, debe calentarse más, hasta la temperatura de operación en un
20 cambiador de calor (4) típicamente 40°C. A continuación entra al esterilizador (5) donde se ha introducido previamente el material sensible a descontaminar.

Durante la esterilización, el CO₂ se recircula a alta velocidad con la misma bomba (4), realizando el circuito mostrado con línea punteada. La turbulencia generada por el paso a
25 alta velocidad de la mezcla supercrítica favorece el contacto con el material en todos los recovecos del mismo para asegurar la desactivación del arma biológico.

En la línea de recirculación, hay instalado un filtro (6). El CO₂ cargado de suciedad (normalmente partículas en suspensión) deja el esterilizador por la parte superior, pasando a
30 través de dicho filtro que retiene esta suciedad. También hay un depósito para alojar el agua ácida, (7). El CO₂ a su paso por este depósito se humedece para volver al esterilizador. Con la recirculación a alta velocidad del CO₂ húmedo sobre el material depositado en el esterilizador se opera durante el periodo determinado como mínimo para la esterilización, típicamente 15 min.

35 Finalizado este ciclo propiamente de esterilización, comienza el ciclo de despresurización para descargar el material tratado y recuperar el CO₂ que debe ser recirculado al proceso.

Así que en este momento, se hace pasar la mezcla esterilizante CO₂-agua por una línea en la que hay un separador, (8) donde el agua queda retenida. Después, el CO₂ limpio y seco se despresuriza en una válvula y se almacena en un tanque de alta presión por ejemplo, 35 bar, (9).

5 El CO₂ que aún quede en el esterilizador se lleva a otro tanque de almacenamiento (10) de baja presión, por ejemplo a 15 bar que implicaría llegar a -30°C. Para evitar la congelación de agua atmosférica en la tubería o del poco agua que el CO₂ llevase causando tapones de hielo en la línea, en esta segunda despresurización, se calienta en la línea con un elemento calefactor, (11) hasta 10°C. La cantidad almacenada a baja presión se puede retornar al esterilizador en el primer momento de llenado, simplemente por diferencia de presión. La línea de recuperación y almacenamiento del CO₂ se muestra señalada en discontinuo.

15 Finalmente, el resto del CO₂ que queda en el esterilizador se libera a la atmosfera a través de una línea de venteo (12) para poder abrir y descargar el material tratado. Esta cantidad debe ser repuesta con CO₂ fresco de la bala (1). En total se estima que cada ciclo de operación como el descrito podría tardar del orden de 30 min.

EJEMPLOS

20 La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos los cuales no pretenden ser limitativos al alcance de la misma. En todos ellos, se ha utilizado como modelo de microorganismo contaminante, esporas de *Bacillus thuringiensis*, dado que es de la misma familia y comparte mucha información genética con el Ántrax, que es el bioarma mas empleado. Además dado que son formas esporuladas del género bacillus, serán representativas de los microorganismos más difíciles de eliminar. En el primer ejemplo, se muestra la inactivación de estas esporas en tejidos técnicos del traje militar NBQ (nuclear, biológico y radioactivo). En el segundo, en un material electrónico sensible, concretamente un móvil.

30

Ejemplo 1

Microorganismo

La cepa utilizada es *Bacillus thuringiensis* (CET197T; ATCC10792; CIP 53.137; DSM 2046)
5 procedente de la colección española de cultivos tipo.

Se utiliza para su cultivo el medio específico recomendado por el proveedor: "nutrient
broth/agar I" que contiene: 5 g de extracto de carne, 10 g de peptona, 5 g de NaCl, 15 g de
agar (solo para medio sólido) y 1 L agua destilada, ajustándose el pH a 7,2. Para la
10 generación de esporas, se adiciona 0,1g de $MnSO_4 \cdot H_2O$. Todos los reactivos son
suministrados por Sigma Aldrich, España.

Generación y concentración de esporas de *B. thuringiensis*

Se recupera el microorganismo a partir de un eppendorf, en un matraz con unos 100 mL de
15 caldo específico, y se cultiva en un baño con agitación (150 rpm) durante 8 horas a 45 °C.
Posteriormente se adiciona 0,1 mL de este cultivo mediante siembra en superficie sobre
placas Petri con el medio específico que además contiene 0,1 gL^{-1} de Mn ($MnSO_4 \cdot H_2O$,
Panreac). A continuación se incuban en la estufa 2 días a 45 °C.

20 Pasado este tiempo se hace un lavado de las mismas adicionando dos tandas de 7,5 mL de
 H_2O destilada sobre cada una en la superficie. En cada lavado, se realiza un arrastre con
un portaobjetos estéril por toda la superficie de la placa para recoger las esporas formadas.
El agua de lavado se centrifuga a 10.000 r.p.m durante 10 min. Se retira el sobrenadante y
el pellet se resuspende en H_2O destilada estéril. Después se somete a tratamiento térmico
25 (90°C durante 15 min) para inactivar las formas vegetativas que pudieran quedar en la
suspensión, obteniendo una concentración de 10^8 ufc mL^{-1} de esporas viables.

Contaminación de los materiales de equipamiento NBQ (Nuclear Biológico y Químico) según
normativa OTAN.

30 La normativa OTAN para el nivel más exigente de esterilización, marca una contaminación
de partida de los materiales de 10^7 ufc $\cdot g^{-1}$. Para lograrlo se introducen 5 g de cada tejido
ensayado en la suspensión de esporas de concentración 10^8 ufc $\cdot mL^{-1}$ durante 10 minutos y
se deja secar en cámara de flujo laminar.

35 En cuanto a los materiales electrónicos, la contaminación se realiza tratando de simular, en
la medida de lo posible, un ataque terrorista, es decir, dispersando las esporas.

Concretamente se realiza de la siguiente forma: en cámara de flujo laminar, se atomiza una suspensión diluida de 10^7 ufc \cdot mL $^{-1}$ de esporas de *B. thuringiensis* sobre el material electrónico cubriendo toda la superficie de éste y se deja secar a temperatura ambiente también dentro de la cámara de flujo laminar.

5
Determinación de la contaminación de *B. thuringiensis* en los tejidos del traje NBQ y el material electrónico antes y después del tratamiento con CO₂ Supercrítico.

El tejido se introduce en una bolsa con 10 mL medio y se deja inmerso en él por media hora.
10 Cogiendo 1 mL de ese medio, se prepara una tabla de diluciones seriadas para obtener la concentración de esporas por recuento de unidades formadoras de colonia (ufc) en las placas de Petri con el medio específico y la sal de Mn.

La contaminación en el material electrónico, se determina pasando una torunda estéril por la
15 superficie del mismo. A continuación la torunda se introduce en 10 mL de medio específico y se prepara la tabla de diluciones seriadas de la misma forma.

Los resultados se expresan en ambos casos como el logaritmo del recuento después del
tratamiento (N) dividido por el recuento inicial (N₀). La máxima desviación estándar en las
20 lecturas es de 0,7 ciclos logarítmicos.

Tratamiento de las muestras con CO₂ supercrítico para la desactivación de *B. thuringiensis*

El equipo utilizado para los ensayos de los ejemplos es una forma concreta de la instalación
25 reivindicada, a escala laboratorio, donde el CO₂ no se recupera por utilizarse en pequeña cantidad.

El procedimiento es el siguiente. Se carga el recipiente con el material a tratar en cámara
de flujo laminar y se lleva al equipo de alta presión manteniendo la esterilidad. Para los
30 ensayos sobre tejidos del traje NBQ, se emplean trozos de aproximadamente 5 g que se introducen en un recipiente de 50 mL. Cuando se trata material electrónico se hace en el recipiente de 250 mL. El recipiente correspondiente se encaja en su lugar y se cierra. A continuación se abre el suministro de CO₂ y se pone la bomba en funcionamiento para alcanzar la presión de trabajo. Se bombea el CO₂ a una velocidad de 4 g \cdot min $^{-1}$ con el fin de
35 generar turbulencia con una alta velocidad de paso. Después se precalienta mediante paso por un serpentín calefactado y así pasa por el lecho de un relleno empapado en agua. El CO₂ húmedo entra por la parte inferior del recipiente y atraviesa el tejido contaminado o el

material electrónico comenzando así el tiempo de operación. Trascurrido el tiempo establecido, se apaga la bomba, se cierra el suministro de CO₂ y comienza la despresurización de forma muy lenta para evitar la congelación. Una vez despresurizado y separado del equipo, el recipiente se lleva de forma estéril a cámara de flujo laminar, donde se recoge la muestra tratada para realizar los posteriores análisis microbiológicos.

Medida de pH

El pH se mide durante el tratamiento mediante tiras reactivas (MERCK, España) introducidas en el recipiente de esterilización junto con los materiales, de dos rangos: 4,0-7,0 y 2,5-4,5.

Desactivación de *B. Thuringiensis* en tejidos de traje NBQ

Los trajes NBQ para uso militar, están pensados para proteger el torso y las extremidades de la exposición directa ante agentes químicos, biológicos y para evitar el contacto con partículas radiactivas. Suelen estar hechos de una capa exterior de color verde o de camuflaje impermeabilizado, una capa de fibras sintéticas tratadas con retardantes del fuego o aluminizadas para su uso contra armas de fuego (tejido carbonizado) y con una capa interna de algodón impregnada en carbón activo (espuma de carbón activo). El conjunto se complementa con otros elementos para la protección de las extremidades como guantes de butilo y calzas (o botas) diseñadas para el fin. Para la cara es imprescindible el uso de sistemas filtrantes como las máscaras antigás o equipos de respiración autónoma (ERA), los cuales disponen de botellas de aire respirable.

Resultados

En la Tabla 1 se muestra la cantidad de agua medida en peso respecto el material a tratar que es necesaria añadir para lograr crecientes grados de desactivación de *B. thuringiensis* en un tejido exterior de traje NBQ.

Tabla 1. Desactivación de *B. thuringiensis* en tejido exterior de traje NBQ a distintos porcentajes de humedad. Otras condiciones de operación: presión, 350 bar; temperatura, 70°C; tiempo de operación, 60 minutos.

% agua respecto del tejido	pH	Log (N/N ₀)
18	5,0	-3,4
20	4,7	-4,1
23	4,5	-5,3
25	3,9	-7,0 (total)

Estos resultados, por un lado, confirman la necesidad de la presencia de agua para lograr la desactivación de *B. thuringiensis* y, por otro lado, la necesidad de alcanzar un bajo pH, debido a la formación de ácido carbónico, para conseguirlo.

5

En la Tabla 2 se muestra el efecto de añadir ácido cítrico al agua. Dada la importancia que tiene el bajo pH, se prueba a tratar el tejido exterior con el CO₂ mezclado con agua pero acidificada a pH 3,9 con ácido cítrico, que es un ácido orgánico poco agresivo y nada tóxico ya que incluso se utiliza como aditivo conservante alimentario. La cantidad añadida necesaria para alcanzar ese pH es del 10 % en peso respecto del agua.

10

Tabla 2. Impacto de la adición de agua acidificada con ácido cítrico hasta pH=3,9 en la desactivación de esporas de *B. thuringiensis* impregnadas en tejido exterior de traje NBQ en diferentes condiciones de operación. El tiempo de operación fue de 15 min y se introdujo aproximadamente un 30% en peso de agua respecto del tejido.

15

Presión (bar)	Temperatura (°C)	Log (N/N ₀)
350	70	-7,0 (Total)
150	70	-7,0 (Total)
150	60	-7,0 (Total)
150	50	-4,2
150	40	-3,3

20 Como se observa, la adición de agua acidificada, no solo es capaz de desactivar totalmente las esporas, sino que permite rebajar la agresividad de las condiciones de operación y el tiempo de operación para conseguirlo.

Así, a condiciones de 150 bar, 60°C y 15 min sería posible descontaminar trajes NBQ infectados con esporas de armas biológicas acorde a los estándares más restrictivos de la OTAN.

- 5 Además, los tejidos tratados no perdieron ni propiedades mecánicas ni físico-químicas. Salían prácticamente secos del tratamiento.

Ejemplo 2. Desactivación de *B. Thuringiensis* en material electrónico sensible

- 10 La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos aplicando el mismo tratamiento del Ejemplo 1 a un móvil al que previamente se había atomizado una suspensión acuosa de esporas hasta alcanzar una contaminación de 10^7 ufc g^{-1} de la forma que se ha indicado en el Ejemplo 1. El tratamiento también fue eficaz en este material electrónico, incluso cuando el agua introducida en el CO_2 suponía menos de un 20% en peso respecto del móvil. Es más,
15 cuando se adicionó cantidad suficiente de ácido cítrico para rebajar el pH a 3,3, se logró la muerte de las esporas a tan sólo 40-45°C. Los resultados se confirmaron también en una radio y en un pen drive.

- 20 Tabla 3. Impacto del uso de CO_2 supercrítico mezclado con agua acidificada con ácido cítrico en la desactivación de esporas de *B. thuringiensis* que contaminaban un móvil a diferentes pH y decrecientes temperaturas. La presión de operación fue de 150 bar y el tiempo de tratamiento de 15 min, lo que permitió introducir un total de alrededor del 20% en peso de agua respecto del móvil.

Temperatura (°C)	pH	log (N/N ₀)
60	3,9	-7,0 (Total)
55	3,9	-7,0 (Total)
45	3,3	-7,0 (Total)
40	3,3	-5,9

- 25 Los tres materiales electrónicos después de estos tratamientos fueron recuperados en perfecto estado con plena capacidad funcional.

REIVINDICACIONES

1. Método de esterilización con CO₂ y agua de un material portador de microorganismos que comprende la etapa de:
5 poner en contacto el material a esterilizar con CO₂ a una presión comprendida entre 50 bar y 500 bar, una temperatura entre 25°C y 70°C, en presencia de una cantidad de agua, comprendida entre el 10% y el 100% en peso respecto al peso del material a esterilizar durante un tiempo comprendido entre 15 minutos y 60 minutos; donde la adición del agua se realiza mediante solubilización y arrastre por el CO₂ o inyectándola
10 paralelamente al CO₂.
2. Método de esterilización según reivindicación 1, donde el material portador de microorganismo es ropa técnica.
- 15 3. Método de esterilización según reivindicación 1, donde el material portador de microorganismos es material electrónico.
4. Método de esterilización según reivindicación 1, donde el material portador de microorganismo es un material óptico.
20
5. Método de esterilización según reivindicación 1, donde el material portador de microorganismo es un material sanitario.
6. Método de esterilización según reivindicaciones 1-5, donde el microorganismo es un
25 patógeno.
7. Método de esterilización según reivindicaciones 1-6, donde el microorganismo es una espora.
- 30 8. Método de esterilización según reivindicaciones 1-7, donde la cantidad de agua está comprendida entre el 10% y el 40% en peso respecto al peso del material a esterilizar.
9. Método de esterilización según reivindicaciones 1-7, donde la cantidad de agua está comprendida entre el 20% y el 30% en peso respecto al peso del material a esterilizar.
35
10. Método de esterilización según reivindicaciones 1-9, donde el agua se acidifica hasta alcanzar pH comprendido entre 3 y 5.

11. Método de esterilización según reivindicaciones 10, donde el agua se acidifica hasta alcanzar pH comprendido entre 3 y 4.
- 5 12. Equipo para la esterilización que comprende:
- a. Un recipiente para contener el material a esterilizar con una línea de recirculación del CO₂;
 - b. Un sistema de suministro del CO₂;
 - c. Una línea de recuperación del CO₂;
 - 10 d. Una fuente de suministro de agua;
 - e. Dispositivos para el control y lectura de la presión y la temperatura;
 - f. Dispositivos para operar de manera segura;
 - g. Sistema para la despresurización del recipiente.
- 15 13. Equipo para la esterilización según reivindicación 12 donde la fuente de suministro de agua es un sistema de bombeo que la inyecta junto al CO₂ o un recipiente que la contenga a través del cual pasa el CO₂ y que permite su introducción disuelta o arrastrada por el CO₂.

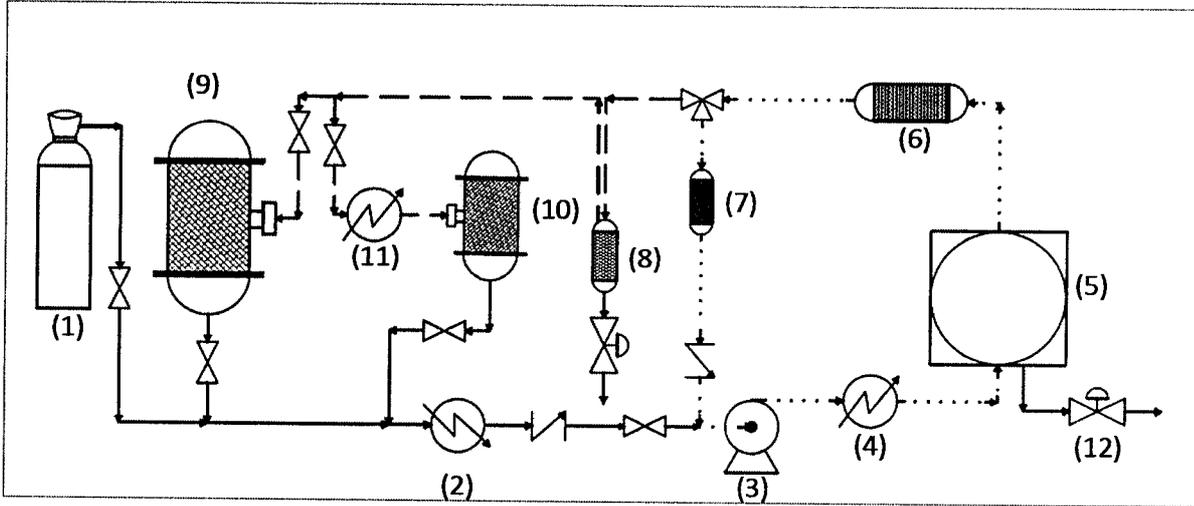


FIG.1



- ②① N.º solicitud: 201400961
②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.11.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01N59/04** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 6149864 A (DILLOW ANGELA K et al.) 21.11.2000, todo el documento.	1-9,12-13
Y		10-11
Y	HAAS G J et al. Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. Journal of Food Safety 1989 VOL: 9 No: 4 Págs: 253-266 ISSN 0149-6085. Ver todo el documento.	10-11
X	PARK H S et al. Disinfection of wheat grains contaminated with <i>Penicillium oxalicum</i> spores by a supercritical carbon dioxide-water cosolvent system. International journal of food microbiology Netherlands 1 Jun 2012 VOL: 156 No: 3 Págs: 239-244 ISSN 1879-3460 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.032 pubmed:22551673. Ver todo el documento.	12-13
Y		1-11
Y	US 2010080790 A1 (MATTHEWS MICHAEL A et al.) 01.04.2010, todo el documento.	1-11
X	CALVO L et al. Microbial inactivation and butter extraction in a cocoa derivative using high pressure CO2. Journal of Supercritical Fluids Agosto 2007 Elsevier nl VOL: 42 No: 1 Págs: 80-87 ISSN 0896-8446 (Impreso) Doi: doi:10.1016/j.supflu.2007.01.009. Ver todo el documento.	12-13
Y		1-9
X	ZHANG J et al. Sterilizing Bacillus pumilus spores using supercritical carbon dioxide. Journal of microbiological methods Netherlands Sep 2006 VOL: 66 No: 3 Págs: 479-485 ISSN 0167-7012 (Impreso) Doi: pubmed:16516991. Ver todo el documento.	12-13
Y		1-9
A	GARCIA-GONZALEZ L et al. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. International journal of food microbiology Netherlands 10 Jun 2007 10.06.2007 VOL: 117 No: 1 Págs: 1-28 ISSN 0168-1605 (Impreso) Doi: pubmed:17475355. Ver todo el documento.	1-13

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
31.03.2015

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/5

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

A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES WPIAP EPODOC TXPEA TXPEB TXPEC TXPEE TXPEF TXPEH TXPEI TXPEP TXPEPEA TXPES TXPUSE0A TXPUSE1A TXPUSEA TXPUSEB TXPW0EA BIOSIS COMPDX EMBASE INSPEC MEDLINE NPL XPESP XPOAC.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.03.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-13	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 6149864 A (DILLOW ANGELA K et al.)	21.11.2000
D02	HAAS G J et al. Journal of Food Safety 1989 VOL: 9 No: 4 Págs: 253-266 ISSN 0149-6085.	30.11.1988
D03	PARK H S et al. International journal of food microbiology Netherlands 1 Jun 2012 VOL: 156 No: 3 Págs: 239-244 ISSN 1879-3460 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.032 pubmed:22551673.	
D04	US 2010080790 A1 (MATTHEWS MICHAEL A et al.)	01.04.2010
D05	CALVO L et al. Journal of Supercritical Fluids Agosto 2007 Elsevier nl VOL: 42 No: 1 Págs: 80-87 ISSN 0896-8446 (Impreso) Doi: doi:10.1016/j.supflu.2007.01.009	Agosto 2007
D06	ZHANG J et al. Journal of microbiological methods Netherlands Sep 2006 VOL: 66 No: 3 Págs: 479-485 ISSN 0167-7012 (Impreso) Doi: pubmed:16516991.	Sept 2006
D07	GARCIA-GONZALEZ L et al. International journal of food microbiology Netherlands 10 Jun 2007 10.06.2007 VOL: 117 No: 1 Págs: 1-28 ISSN 0168-1605 (Impreso) Doi: pubmed:17475355.	10.06.2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica un método para esterilizar un material que tiene microorganismos (patógenos o esporas), que se basa en poner en contacto el material a esterilizar con CO₂ a una presión de entre 50 y 500 bar, una temperatura de entre 25 y 70 °C, y una cantidad de agua de entre el 10 y el 100% del peso del material, durante un tiempo de entre 15 y 60 minutos, y en el que la adición de agua se realiza mediante solubilización y arrastre por el CO₂, o inyectándola paralelamente al CO₂. Este método permite esterilizar materiales del tipo de ropa técnica, o material electrónico, óptico y sanitario. Además, el método incluye la opción de que el agua se acidifique hasta un pH de entre 3 y 5, o de entre 3 y 4. Se reivindica también un equipo para esterilización que comprende un recipiente que contenga el material a esterilizar, un sistema de suministro de CO₂, una línea de recuperación de CO₂, una fuente de suministro de agua, dispositivos de control y lectura de presión y temperatura, dispositivos para operar de manera segura, y un sistema de despresurización del recipiente.

NOVEDAD y ACTIVIDAD INVENTIVA

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el método y el equipo de la solicitud tal y como están reivindicados, por lo que las reivindicaciones 1 a 13 de la solicitud son nuevas según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

Sin embargo, existen documentos en el estado de la técnica que divulgan métodos de esterilización y aparatos con este fin semejantes a los reivindicados. Estos documentos, bien solos o combinados entre sí, podrían conducir al experto en la materia a los mencionados método y equipo, por lo que las reivindicaciones 1 a 13 de la presente solicitud no tienen actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes, como a continuación se explica.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se describe un método de esterilización (en este caso de polímeros empleados para implantes), que, como el de la solicitud, emplea dióxido de carbono en condiciones supercríticas (CS-CO₂, por sus siglas en inglés) para matar distintas bacterias, incluidos patógenos y esporas. Las condiciones de presión y temperatura utilizadas en el documento D01, así como los tiempos de esterilización, coinciden con los rangos reivindicados en la solicitud. Asimismo, se demuestra que la adición de agua favorece la esterilización frente a las muestras "secas", y se indica que el agua puede ser añadida junto al CO₂, o de forma separada. También el equipo de esterilización empleado en este documento tiene los mismos componentes que el reivindicado en la solicitud. Por tanto, el documento D01 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 9 y 12 a 13 de la presente solicitud. Si bien en este documento no se menciona la posibilidad de acidificar el agua, el documento D02 demuestra que el pH ácido tiene un efecto sinérgico con la esterilización con SC-CO₂, por lo que la evidente combinación de los documentos D01 y D02 por parte del experto en la materia afectará la actividad inventiva de las reivindicaciones 10 y 11 de la presente solicitud, según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

En el documento D03 se describe un método de esterilización de granos de trigo contaminados con esporas de un hongo, basado en SC-CO₂, y con agua como co-solvente, en condiciones de presión, tiempo y temperatura coincidentes con las de la solicitud. La diferencia entre D03 y el método de la invención radica en la manera de adicionar el agua (no establece que sea simultáneamente a la adición del CO₂), y a la acidificación del agua. Tales condiciones se encuentran en el documento D04, que divulga un método de esterilización con SC-CO₂, y en el que, si bien las condiciones no son exactamente las de la solicitud, en él se indica que este sistema de esterilización puede emplearse para ropa, y material hospitalario (ver párrafo [0035]), que el agua mejora la eficacia esterilizadora del CO₂ (ver párrafo [0084]), que se conoce en el estado de la técnica que el pH ácido mejora la actividad esterilizadora del CO₂ (ver párrafos [0094] a [0099]), y que los aditivos (aunque en este caso no se trate de agua, son líquidos igualmente) pueden ser introducidos junto al CO₂ empleando una válvula de varios puertos, o incluirse directamente en la corriente del CO₂ (ver párrafo [0169]). Por todo ello, el experto en la materia podrá combinar la información divulgada en los documentos D03 y D04 para llegar al método de la invención, por lo que las reivindicaciones 1 a 11 de la misma no cumplen el requisito de actividad inventiva, según el artículo 8 de la Ley de Patentes. Además, cada uno de estos dos documentos del estado de la técnica describe un equipo de esterilización con las características generales de las reivindicaciones 12 y 13 de la solicitud, por lo que tanto el documento D03 como el D04 afectan la actividad inventiva de estas dos reivindicaciones.

Del mismo modo, en el documento D05 se describe la inactivación de microorganismos (incluyendo esporas) empleando corriente de CO₂ a alta presión, en condiciones de presión y temperatura similares a las de la solicitud, y con adición de agua (que no se realiza conjuntamente con el CO₂). Las condiciones utilizadas en el documento D06 también son semejantes a las de la solicitud, pero en este caso se utiliza un aditivo diferente del agua (H₂O₂), que se añade junto con el SC-CO₂. También en este caso se considera que el experto en la materia encontraría obvia la combinación de los documentos D05 y D06 para desarrollar el método de las reivindicaciones 1 a 9 de la solicitud, que, por tanto, no tendrán actividad inventiva a la luz de lo divulgado en los documentos D05 y D06. También los equipos de esterilización descritos en cada uno de estos dos documentos afectan la actividad inventiva de las reivindicaciones 12 y 13 de la presente solicitud.

Por último, se cita el documento D07, considerado como un documento general del estado de la técnica cercano a la solicitud, pero que no afecta su novedad ni su actividad inventiva. Se trata de una revisión de los métodos de inactivación de microorganismos empleando dióxido de carbono a alta presión.