

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 710**

51 Int. Cl.:

G01N 15/06 (2006.01)
C02F 1/44 (2006.01)
G01N 33/18 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
C02F 1/00 (2006.01)
G01N 31/22 (2006.01)
G01N 21/77 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2014 PCT/FI2014/050648**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15028711**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2014 E 14765972 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 3039403**

54 Título: **Método para detectar partículas exopoliméricas transparentes en una muestra de agua**

30 Prioridad:

26.08.2013 FI 20135857

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

26.10.2018

73 Titular/es:

**KEMIRA OYJ (100.0%)
Porkkalankatu 3
00180 Helsinki, FI**

72 Inventor/es:

**SAARI, EIJA;
KARISALMI, KAISA;
HESAMPOUR, MEHRDAD;
VIRKKI, HELI;
NIEMELÄ, MIIA y
KORTE, EIJA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 687 710 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

Método para detectar partículas exopoliméricas transparentes en una muestra de agua

La invención se refiere a un método para detectar partículas exopoliméricas transparentes en una muestra de agua según los preámbulos de las reivindicaciones independientes adjuntas.

5 Las partículas exopoliméricas transparentes, TEP, pueden estar presentes en entornos acuosos, tanto en aguas naturales como en aguas de proceso industriales o aguas residuales. Son partículas biopoliméricas transparentes compuestas principalmente por polisacáridos ácidos de fitoplancton y bacterioplancton, y pueden tener una forma de cuerdas deformables, discos o películas de hasta 100 µm de largo. Los TEP son muy pegajosas, flexibles y reactivas en la superficie, y se comportan como geles y aumentan la viscosidad. Pueden experimentar coalescencia para formar geles de mayor tamaño y redes porosas, y provocan fácilmente bioincrustaciones, por ejemplo incrustaciones de membranas en los procesos de desalinización, especialmente durante la fluorescencia de algas.

Hasta ahora, la importancia de TEP para diversos problemas de proceso en industrias ricas en agua se ha pasado por alto en gran medida, debido a que han sido extremadamente difíciles de detectar y cuantificar. Las TEP son transparentes, lo que significa que no se pueden detectar de forma directa. Un método para detectar TEP se describe por parte de U. Passow y A.L. Alldredge en *Limnol. Oceanogr.* 40 (7), 1995, 1326-1335. En el método descrito, TEP se tiñe con colorante catiónico Azul Alcian y se determina colorimétricamente la cantidad de colorante complejo con TEP. El método de detección comprende una pluralidad de diferentes pasos: filtración, tinción, lavado, inmersión y determinación colorimétrica. Está claro que el método no es adecuado para uso industrial, donde se requiere una respuesta rápida. Además, la interacción entre el tinte y TEP se basa en la interacción iónica y no es selectiva. Por ejemplo, posibles polímeros aniónicos o impurezas aniónicas impiden la determinación de TEP.

El documento US 2007/0036682 divulga un detector de glucosa microóptica. Proporciona un sistema microfluído totalmente integrado para la detección de la fluorescencia que comprende una fuente de luz, una monocapa auto-ensamblada de un compuesto revestido sobre una superficie de oro que emite fluorescencia en presencia de un sacárido, un procesador de luz y un detector.

25 El documento WO 2004/009497 divulga un método para observar y/o controlar la bioincrustación en sistemas de separación de membrana. El método utiliza cantidades mensurables de agente (s) fluorogénico (s) añadidas a una corriente de alimentación para observar y/o controlar el nivel de proliferación microbiana durante la separación de la membrana y la purificación de la corriente de alimentación durante la separación de la membrana.

30 S. Utchike y col., *Limnol. Oceanogr.* : Methods 7, 2009, 449-458, divulga un ensayo de lectina fluorescente para cuantificar polisacáridos marinos en forma de partículas en placas de filtración de 96 pocillos. El método desarrollado cuantifica polisacáridos en forma de partículas más ampliamente y complementa la cuantificación de Azul Alcian de partículas exopoliméricas transparentes, que son un subconjunto de la agrupación oceánica de polisacáridos en forma de partículas. El método utiliza concanavalina A de lecitina marcada fluorescentemente que se une a polisacáridos que contienen glucosa y manosa.

35 Un objetivo de la presente invención es minimizar o incluso eliminar las desventajas existentes en la técnica anterior.

Un objetivo de la invención es también proporcionar un método con el que se puedan detectar de manera rápida y fiable partículas exopoliméricas transparentes.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un método con el que la cantidad de partículas exopoliméricas transparentes pueda controlarse de forma fácil.

40 Estos objetivos se logran con la invención que tiene las características presentadas a continuación en las partes características de las reivindicaciones independientes.

Un método típico de acuerdo con la presente invención para detectar partículas exopoliméricas transparentes en una muestra de agua, comprende

- obtener una muestra de agua,
- 45 • introducir un reactivo fluorocromático en la muestra de agua, siendo el reactivo fluorocromático específico para los grupos de hidróxido vecinales de partículas exopoliméricas transparentes, por lo que la señal de fluorescencia del reactivo cambia cuando entra en contacto con partículas exopoliméricas transparentes, es decir, TEP,
- detectar la señal de fluorescencia procedente de la muestra de agua y determinar el nivel de TEP de la muestra.

Ahora se ha descubierto sorprendentemente que se puede obtener un análisis rápido y fiable de la cantidad de partículas exopoliméricas transparentes si se les permite interactuar con un reactivo fluorocromático específico, y

luego se detecta la señal de fluorescencia. Esto permite la creación de un método rápido, que puede usarse para el análisis industrial de TEP en diferentes aguas naturales o de proceso. La invención hace posible mejorar la eficacia operativa en procesos con un uso intensivo de agua, donde la concentración de TEP puede variar significativamente, por ejemplo, debido a variaciones estacionales. El presente método proporciona también la posibilidad de obtener una mayor visión en el proceso de tratamiento de agua.

En la presente invención, se introduce un reactivo fluorocromático en la muestra de agua. En este contexto, el término "fluorocromático" significa un compuesto que experimenta fluorescencia. El reactivo se añade en una cantidad conocida y predeterminada, lo que hace que las señales obtenidas sean comparables entre sí. Una persona experta en la técnica puede, sin una carga excesiva, determinar las cantidades de reactivo adecuadas para cada sistema.

De acuerdo con una realización de la invención, el reactivo fluorocromático es específico para grupos de hidróxido vecinales. En otras palabras, el reactivo fluorocromático es específico para partículas exopoliméricas transparentes que comprenden al menos dos grupos hidróxido unidos a átomos adyacentes. Por lo tanto, el reactivo es selectivo frente a, por ejemplo dioles y trioles. La señal de fluorescencia del reactivo cambia cuando entra en contacto con grupos de hidróxido vecinales de partículas exopoliméricas transparentes.

De acuerdo con una realización de la invención, el reactivo fluorocromático es un derivado de ácido borónico, por ejemplo un derivado de ácido fenilborónico, tal como ácido 3- (dansilamino) fenilborónico (DAPB), ácido 3,4,5-trifluorofenilborónico, ácido 2-fluoro-5-nitrofenilborónico, ácido 2-metoxifenilborónico, ácido N-bencil-3-piridinofenilborónico, ácido o-dimetilaminometilfenilborónico, ácido 3-cloro-4-fluorofenilborónico o ácido 4-bromofenilborónico. Además, el reactivo fluorocromático puede ser un derivado de ácido borónico, tal como ácido 8-quinolinborónico (8-QBA); ácido 5-quinolinborónico (5-QBA); ácido 6- (dimetilamino)-naftalen-2-borónico (6-DMANBA); o ácido fenoxatin-4-borónico (4-POBA). La respuesta que indica una interacción entre TEP y el derivado de ácido borónico se comunica mediante cambios en la intensidad de fluorescencia, ya sea a través de la inactivación mejorada o de la fluorescencia mejorada de formación de quelatos.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el reactivo fluorocromático es ácido 3-(dansilamino) fenilborónico (DAPB). El ácido 3-(dansilamino)-fenilborónico es barato y se encuentra fácilmente disponible, por lo que es adecuado para fines industriales. DAPB interacciona con dioles vecinales y determinados aminoalcoholes para formar complejos cíclicos que tienen una intensidad de fluorescencia y una emisión máxima dependiente del entorno del fluoróforo.

De acuerdo con una realización de la invención, se detecta la señal de fluorescencia del reactivo fluorocromático no interaccionado libre, por ejemplo cuando se usa ácido 3-(dansilamino)fenilborónico (DAPB) como reactivo fluorocromático. Esto significa que la señal detectada disminuye al aumentar la concentración de TEP. La cantidad del reactivo fluorocromático, que se usa, es suficiente cuando todavía se puede obtener una señal de fluorescencia típica para el reactivo que no ha reaccionado. Cuando la señal detectada es menor que un valor de señal umbral predeterminado, es una clara indicación de que la concentración de TEP en la muestra de agua ha excedido el nivel permitido.

De acuerdo con otra realización de la invención, se detecta la señal de fluorescencia del reactivo fluorocromático que ha interaccionado, por ejemplo, cuando se usa ácido 8-quinolinborónico (8-QBA), ácido 5-quinolinborónico (5-QBA) o ácido 6-(dimetilamino)-naftalen-2-borónico (6-DMANBA) como reactivo fluorocromático. Esto significa que la señal detectada aumenta al aumentar la concentración de TEP. Cuando la señal detectada es más intensa que un valor de señal umbral predeterminado, es una clara indicación de que la concentración de TEP en la muestra de agua ha excedido el nivel permitido.

De acuerdo con una realización de la invención, la muestra de agua a analizar por medio de TEP se obtiene de un proceso de tratamiento de agua, y la alimentación de uno o varios productos químicos de proceso se ajusta y/o selecciona basándose en la señal de fluorescencia detectada. Por ejemplo, si la señal detectada indica que la concentración de TEP excede el nivel permitido, es posible comenzar a alimentar nuevos productos químicos al proceso para reducir la concentración de TEP. Alternativa o simultáneamente, la dosis de productos químicos de proceso alimentados constantemente puede modificarse para reducir la concentración de TEP. Ejemplos de tales productos químicos, cuya alimentación puede ajustarse y/o seleccionarse en base a la señal detectada, son coagulantes y floculantes. Cuando la alimentación y/o la dosificación de los productos químicos de tratamiento se realiza en función de la señal detectada, se puede reducir el coste de los productos químicos, ya que se puede evitar la sobrealimentación.

De acuerdo con una realización de la invención, el pH de la muestra de agua se ajusta a un valor constante antes de la introducción del reactivo fluorocromático. Se ha observado que, al menos para algunos reactivos, la señal de fluorescencia detectada también puede depender del pH de la muestra, en cuyo caso se prefiere ajustar el pH a un valor constante para eliminar la dependencia del pH de la señal detectada. El ajuste del pH se puede realizar mediante la introducción de un agente tampón adecuado, p. ácido bórico/cloruro de potasio/hidróxido de sodio, o mediante la introducción de una base fuerte adecuada, tal como NaOH, o ácido, en la muestra de agua. En procesos en los que el pH es constante y muy cercano al valor al que se obtiene la intensidad de fluorescencia máxima del

reactivo, no es necesaria una etapa de ajuste del pH. La persona experta en la técnica puede determinar el intervalo de pH óptimo para el reactivo fluorocromático usado y para cada sistema de muestra usando métodos conocidos.

5 Cuando se usa un derivado de ácido fenilborónico, como ácido 3-(dansilamino)fenilborónico (DAPB) como reactivo fluorocromático, el pH de la muestra se puede ajustar a un nivel >7 , más preferentemente >8 , para optimizar la intensidad de la fluorescencia. señal. El pH de la muestra de agua puede ajustarse al intervalo de 7 a 10, más típicamente de 8,5 a 9,5.

Cuando se usa ácido 8-quinolinborónico (8-QBA) como reactivo fluorocromático, el pH de la muestra puede ajustarse a pH 4-10, más preferentemente pH 4,5-7,5, para optimizar la intensidad de la señal de fluorescencia.

10 Cuando se usa ácido 5-quinolinborónico (5-QBA) como reactivo fluorocromático, el pH de la muestra puede ajustarse a pH >4 , más preferentemente pH $>7,5$, para optimizar la intensidad de la señal de fluorescencia. El pH de la muestra de agua puede ajustarse al intervalo de 7 a 10, más típicamente de 8,5 a 9,5.

Cuando se usa ácido fenoxatin-4-borónico (4-POBA) como reactivo fluorocromático, el pH de la muestra puede ajustarse a pH 2-7, más preferentemente pH 2-4, para optimizar la intensidad de la señal de fluorescencia.

15 Preferentemente, la muestra de agua se obtiene o se toma como una corriente secundaria de una corriente de proceso acuosa, por ejemplo en un proceso de tratamiento de agua que comprende una unidad de pretratamiento y una unidad de ósmosis inversa. La muestra de agua se puede tomar antes o después de la unidad de pretratamiento. Se puede introducir un agente de ajuste de pH, tal como agente tamponador, en la corriente secundaria de la muestra de agua, y preferentemente, después de alcanzar el nivel de pH deseado, el reactivo fluorocromático se puede introducir continuamente o en intervalos predeterminados a la corriente secundaria de la muestra de agua y la señal de fluorescencia se puede detectar, respectivamente, de forma continua o en intervalos predeterminados. La señal detectada opcionalmente se puede filtrar, si fuese necesario, y/o se puede analizar de forma matemática. El nivel de TEP en la corriente de proceso se determina comparando la señal detectada con señal (es) de referencia predeterminada(s).

25 El nivel de TEP de la corriente de proceso se puede determinar comparando la señal detectada con señal(es) de referencia predeterminada(s). Por ejemplo, cuando se detecta la inactivación de la señal del reactivo fluorocromático en presencia de TEP, se puede usar una señal de fluorescencia de reactivo en agua ultrapura como señal de referencia, con lo que se obtiene una señal máxima sin ningún TEP. Alternativamente, se puede calcular un valor relativo para la cantidad de TEP comparando la señal detectada con la señal de agua ultrapura. La señal de agua ultrapura recibe el valor 100 y, si hay TEP presente en la muestra, la inactivación de la señal se ajusta en consecuencia.

Dado que las aguas naturales pueden ser un medio turbio, el predominio de la dispersión de la luz puede volverse significativo y distorsionar el espectro de emisión de fluorescencia. En ese caso, es posible, por ejemplo, corregir la señal de fluorescencia detectada considerando la dispersión de Raman.

35 De acuerdo con una realización de la invención, la señal de fluorescencia se detecta usando espectrofotometría o espectrofluorometría, por ejemplo, usando cubeta, cubeta de flujo pasante o una sonda. Todos estos métodos de detección se conocen por parte de la persona experta en la técnica.

40 El método según la presente invención es adecuado para todos los procesos con un uso intensivo de agua, donde pueda estar presente TEP. Ejemplos de tales procesos son diferentes procesos de purificación de agua, tales como desalinización, pretratamiento y procesos de fabricación con un uso intensivo de agua, tales como fabricación de pasta papelera y papel. Típicamente, procedimientos en los que la invención es útil incluyen al menos una etapa de microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y/u ósmosis inversa.

El método descrito en la presente memoria se puede usar para detectar o determinar polisacáridos extracelulares (EPS).

Parte Experimental

45 El agua salobre se trató con diferentes dosis de cloruro férrico (nombre comercial: PIX-111, Kemira Oyj) a pH 5,5. Se tomaron muestras de 750 μl de agua tratada y agua de referencia no tratada y se añadieron 250 μl de solución tampón de ácido bórico/cloruro de potasio/hidróxido de sodio, pH 9.

50 Se preparó reactivo de ácido 3-(dansilamino)fenilborónico (DAPB) $2,00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ disolviéndolo en 1 ml de sulfóxido de dimetilo y diluyendo a 50 ml con agua. Se añadieron 20 μl de esta solución de DAPB a cada muestra de agua tamponada y se midió la fluorescencia de las muestras usando un espectrofluorómetro, la longitud de onda de excitación fue de 325 nm y se integraron las intensidades de emisión entre 470-600 nm. La suma de emisión se dividió luego entre la intensidad de pico de dispersión Raman a 650 nm. El resultado se comparó posteriormente con la muestra de referencia de agua ultrapura. La unidad es la disminución (%) de la intensidad relativa de la muestra frente al agua ultrapura (referencia).

5 Con fines de comparación, las partículas exopoliméricas transparentes también se determinaron a partir de las mismas muestras de agua usando el método de Villacorte (Villacorte LO, MD Kennedy, Amy GL, Schippers JC (2009): The fate of transparent exopolymer particles (TEP) in integrated membrane systems: Removal through pre-treatment processes and deposition on reverse osmosis membranes. Water Research 43: 5039-5052) y los resultados se compararon, véase Tabla 1. A partir de los resultados se puede apreciar que los resultados relativos del método de acuerdo con la invención se correlacionan con los resultados obtenidos con el método de Villacorte. La unidad de medida en el método de Villacorte es mg equivalente de Xanthan por litro usando un factor de calibración arbitrario de 0,114 mgXeq.

Tabla 1. Resultados relativos de mediciones TEP.

Tratamiento \ método	TEP total (Villacorte), MEDIA	TEP relativo (DAPB), MEDIA
Sin tratamiento	1,60	75,5
25 ppm PIX-111	1,02	65,4
75 ppm PIX-111	0,73	31,8

10

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar partículas exopoliméricas transparentes en una muestra de agua, comprendiendo el método
 - obtener una muestra de agua,
 - introducir un reactivo fluorocromático en la muestra de agua, siendo el reactivo fluorocromático específico para grupos de hidróxido vecinales de partículas exopoliméricas transparentes, por lo que la señal de fluorescencia del reactivo cambia cuando entra en contacto con partículas exopoliméricas transparentes,
 - detectar la señal de fluorescencia de la muestra de agua y determinar el nivel de partículas exopoliméricas transparentes de la muestra.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo fluorocromático es un derivado de ácido borónico, tal como ácido 8-quinolinborónico; ácido 5-quinolinborónico; ácido 6-(dimetilamino)-naftalen-2-borónico; o ácido fenoxatin-4-borónico.
3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo fluorocromático es un derivado de ácido fenilborónico, como ácido 3-(dansilamino)fenilborónico, ácido 3,4,5-trifluorofenilborónico, ácido 2-fluoro-5-nitrofenilborónico, ácido 2-metoxifenilborónico, ácido N-bencil-3-piridinofenilborónico, ácido o-dimetilaminometilfenilborónico, ácido 3-cloro-4-fluorofenilborónico o ácido 4-bromofenilborónico, preferentemente ácido 3-(dansilamino) fenilborónico.
4. Método según la reivindicación 1, caracterizado por obtener la muestra de agua de un proceso de tratamiento de agua, y ajustar y/o seleccionar la alimentación de uno o varios productos químicos de proceso en función de la señal de fluorescencia detectada.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 anteriores, caracterizado por ajustar el pH de la muestra de agua a un valor constante antes de la introducción del reactivo fluorocromático.
6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque el reactivo fluorocromático es un derivado de ácido fenilborónico, tal como ácido 3-(dansilamino)fenilborónico, y el pH de la muestra de agua se ajusta a un nivel >7, más preferentemente >8.
7. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque el reactivo fluorocromático es ácido 8-quinolinborónico y el pH de la muestra de agua se ajusta a pH 4-10, más preferentemente a pH 4,5-7,5.
8. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque el reactivo fluorocromático es ácido 5-quinolinborónico y el pH de la muestra de agua se ajusta a pH >4, más preferentemente a pH >7,5.
9. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque el reactivo fluorocromático es ácido fenoxatin-4-borónico; el pH de la muestra de agua se ajusta a pH 2-7, más preferentemente pH 2-4.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 anteriores, caracterizado por
 - obtener la muestra de agua como una corriente secundaria de una corriente de proceso acuosa,
 - introducir el reactivo fluorocromático en la corriente secundaria y detectar la señal de fluorescencia,
 - opcionalmente filtrar la señal,
 - determinar el nivel de partículas exopoliméricas transparentes en la corriente de proceso comparando la señal detectada con señal(es) de referencia predeterminada(s).
11. Método según la reivindicación 1, caracterizado por detectar la señal de fluorescencia del reactivo fluorocromático libre que no ha interaccionado.
12. Método según la reivindicación 1, caracterizado por detectar la señal de fluorescencia del reactivo fluorocromático que ha interaccionado.
13. Método según la reivindicación 1, caracterizado por detectar la señal de fluorescencia mediante el uso de espectrofotometría o espectrofluorometría.
14. Uso del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para controlar la cantidad de partículas exopoliméricas transparentes en procesos con un uso intensivo de agua, tales como procesos de purificación de agua o procesos de fabricación con un uso intensivo de agua.
15. Uso según la reivindicación 14, caracterizado porque el proceso incluye al menos una etapa de microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y/u ósmosis inversa.