

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 946 885**

21 Número de solicitud: 202230060

51 Int. Cl.:

**C02F 1/48** (2013.01)

**C02F 101/30** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**27.01.2022**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.07.2023**

Fecha de concesión:

**23.11.2023**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**30.11.2023**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (100.0%)  
Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Calle  
Einstein 3  
28049 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**MUÑOZ GARCÍA, Macarena;  
ORTIZ SUÁREZ, David;  
NIETO-SANDOVAL RODRÍGUEZ, Julia;  
MARTÍNEZ DE PEDRO, Zahara y  
CASAS DE PEDRO, José Antonio**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **Procedimiento de separación de huevos de helminto para la obtención de aguas regeneradas**

57 Resumen:

Procedimiento de separación de huevos de helminto para la obtención de aguas regeneradas.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la separación de huevos de helminto de matrices de agua depurada o regenerada basado en la interacción de dichos huevos de helminto con materiales magnéticos que contienen hierro, como la magnetita, lo que da lugar a la formación de agregados entre los huevos de helminto y el material magnético de hierro fácilmente separables del agua mediante aplicación de un campo magnético. La presente invención también se relaciona con procedimientos de cuantificación e identificación de los huevos de helminto separados.

ES 2 946 885 B2

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

Procedimiento de separación de huevos de helminto para la obtención de aguas regeneradas

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la separación de huevos de helminto de aguas regeneradas y depuradas por su interacción con materiales magnéticos de hierro, como la magnetita, así como a procedimientos de cuantificación e identificación de los huevos de helminto separados.

### **Antecedentes de la invención**

Los helmintos son gusanos parasitarios causantes de una gran variedad de infecciones que pueden afectar tanto al ser humano como a los animales, así como al desarrollo de las plantas [Jimenez, B. et al., *Water Science & Technology*, 55 (2007) 485-493]. Estos organismos se reproducen a través de huevos cuya aparición en las aguas residuales es frecuente al ser excretados por individuos infectados. La utilización de estas aguas, sin un tratamiento que garantice la completa eliminación de dichos huevos, constituye la principal vía para su dispersión en el medio ambiente [Gyawali, P., *Water Science & Technology*, 77 (2018) 1048-1061]. En función del uso del agua los huevos de helminto pueden acabar contaminando el suelo, las plantas y cultivos, así como otras masas de agua, constituyendo un grave riesgo para la salud humana y los diversos ecosistemas [Jex, A.R. et al., *Nature* 479 (2011) 529-533; Stolk, W.A. et al., *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (2016) e0004560]. Por todo ello, la presencia de huevos de helminto se ha convertido en un importante indicador del riesgo sanitario asociado con la utilización y, especialmente, la reutilización de las aguas [World Health Organization, *Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater* (2006), ISBN: 92-4-154686-7].

Los helmintos se pueden clasificar en dos grandes grupos: los platelmintos, o gusanos planos, y los nematelmintos, también conocidos como nemátodos o gusanos cilíndricos [Jimenez, B. et al., *Water Science & Technology*, 56 (2007) 43-51]. El ciclo de vida de los helmintos es relativamente sencillo. Los huevos eclosionan en condiciones ambientales favorables dando lugar a larvas que finalmente se convierten en gusanos adultos. En función de la especie, este ciclo puede incluir a uno o dos hospedadores, y dentro del organismo hospedador, los helmintos pueden alojarse en diferentes órganos [Jimenez, B. et al., *Water Science &*

Technology, 55 (2007) 485-493]. En cualquier caso, es importante destacar que la principal vía de infección es la ingestión oral de los huevos, siendo la infección por vía cutánea prácticamente despreciable [Gyawali, P., Water Science & Technology, 77 (2018) 1048-1061]. Por ejemplo, en el ser humano los huevos de la especie *Ascaris* eclosionan en el intestino, y  
5 las larvas migran a través del torrente sanguíneo hacia los pulmones y la tráquea. De allí, bajan nuevamente al intestino donde se transforman en gusanos adultos, que liberarán una media de 200.000 huevos al día que serán excretados por las heces de la persona infectada [Gyawali, P., Water Science & Technology, 77 (2018) 1048-1061]. Los efectos agudos más comunes relacionados con la infección por helmintos son diarrea, hemorragias, dolor  
10 abdominal y anemia. Los pacientes con infecciones crónicas ven también reducidas sus habilidades cognitivas. Otros efectos comunes son los retrasos madurativos en las personas menores de 15 años y un mayor riesgo de complicaciones en el parto [Mascarini-Serra, L. et al., Journal of Global Infectious Diseases, 3 (2011) 175-182; Ravindran, V.B. et al., Water, 11 (2019) 1212].

15

Los huevos de helminto son el agente causante de las infecciones por este tipo de parásitos, ya que, a diferencia de los gusanos, son extremadamente resistentes a los tratamientos de desinfección [Jimenez, B. et al., Water Science & Technology, 55 (2007) 485-493]. El tamaño y forma de estos huevos es variado, aunque de manera general se encuentra en el intervalo  
20 de 20 a 80  $\mu\text{m}$ , con una densidad de 1,06 – 1,15  $\text{g}/\text{cm}^3$  [Ayres, R.M. y Mara, D.D., Analysis of wastewater for use in agriculture. A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques (1992) ISBN: 92-4-154484-8]. La característica clave de estos huevos es que están recubiertos por una estructura impermeable que les confiere una altísima resistencia en condiciones ambientales muy diversas. Se trata de un complejo recubrimiento formado por  
25 varias capas de distinta composición, las cuales varían en función de la especie de helminto [Ravindran, V.B. et al., Water, 11 (2019) 1212]. Este recubrimiento permite que los huevos de helminto puedan permanecer en estado latente durante años, lo que les diferencia de virus y bacterias, que pueden sobrevivir meses, o protozoos, que permanecen activos durante  
semanas [Jimenez, B. et al., Water Science & Technology, 55 (2007) 485-493]. Por ejemplo,  
30 los huevos del nemátodo *Ascaris lumbricoides* pueden sobrevivir hasta 15 años en el medio ambiente en condiciones favorables [Hagel, I. y Giusti, T., Infectious Disorders - Drug Targets, 10 (2010) 349-367]. De hecho, y también a diferencia de virus, bacterias o protozoos, los huevos de helminto son resistentes a los procesos habituales de desinfección como el cloro o la radiación ultravioleta [Rocha, M.C.V. et al., Water Research, 103 (2016) 245-255]. Y,  
35 además, tienen la capacidad de infectar a los organismos hospedadores aunque se encuentren en una baja concentración [World Health Organization, Integrated guide to sanitary

parasitology (2004) ISBN: 92-9021-386-8]. Por todo ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado a los huevos de helminto como microorganismos patógenos de alto riesgo entre aquellos que pueden aparecer en el agua [World Health Organization, Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater (2006), ISBN: 92-4-154686-7].

5

El gusano redondo (*Ascaris lumbricoides*), el tricocéfalo (*Trichuris trichiura*) y los anquilostomas (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*) son las principales especies de helminto que infectan a los humanos, mientras que los gusanos planos *Taenia saginata* y *Taenia solium* son los responsables más comunes de las infecciones en ganado bovino y porcino, respectivamente [Amoah, I.D. et al., Acta Tropica, 169 (2017) 187-201]. Con diferencia, el procedente del nemátodo *Ascaris* es el huevo de helminto más frecuente en las aguas residuales, constituyendo aproximadamente el 85% de los géneros presentes, seguido de *Trichuris*, *Toxocara* y *Taenia* [Jimenez, B. et al., Water Science & Technology, 2007, 56, 147–155]. Por ello, el género *Ascaris* es considerando el helminto de referencia para evaluar la eficacia de los procesos de tratamiento de aguas residuales [Rocha, M.C.V. et al., Water Research, 103 (2016) 245-255]. Se estima que la ascariasis afecta a más de 800 millones de personas en el mundo, mientras que unos 500 millones tienen trichuriasis y 450 millones están infectados con anquilostomas [Pullan, R.L. et al., Parasit Vectors, 7 (2014) 37-56; World Health Organization, Investing to Overcome the global impact of neglected tropical diseases third Who report on neglected tropical diseases (2015)].

10  
15  
20

La reutilización de las aguas residuales depuradas es una prioridad a nivel mundial dada la escasez de este importante recurso. El desarrollo urbano y la agricultura, además del cambio climático, están aumentando significativamente la presión sobre la disponibilidad de agua y están contribuyendo también al deterioro de su calidad. La reutilización supone, por tanto, una gran oportunidad para reducir la presión sobre la demanda de agua, limitando la extracción de las masas de agua continentales, reduciendo el impacto de los vertidos de aguas depuradas en las masas de agua receptoras y fomentando el ahorro de agua a través de los usos múltiples de las aguas residuales urbanas regeneradas. No obstante, es vital garantizar que las aguas regeneradas no supongan ningún riesgo para la salud y el medio ambiente. Es aquí donde los huevos de helminto tienen una especial relevancia frente al resto de microorganismos patógenos, dada su alta persistencia. Se estima que hasta un 90% de los huevos de helminto presentes en las aguas de irrigación de cultivos pueden adherirse a la superficie de vegetales de hoja verde, como las espinacas o el perejil, donde pueden aparecer en concentraciones de 1 huevo por gramo de vegetal [Navarro, I. y Jimenez, B., Water Science & Technology, 63 (2011) 1499-1505; Gyawali, P., Water Science & Technology, 77 (2018)

25  
30  
35

- 1048-1061]. De hecho, numerosos estudios han demostrado ya la asociación entre la ascariasis y la reutilización de aguas para el riego de cultivos [Seidu, R. et al., *Journal of Water and Health*, 6 (2008) 461-471; Rutkowski, T. et al., *Agricultural Water Management* 88 (2007), 83-91; Pham-Duc, P. et al., *Parasitology International*, 62 (2013) 172-180]. Por todo ello, y con
- 5 el fin de proteger la salud humana y el medio ambiente, se ha desarrollado una estricta legislación que regula la calidad de las aguas regeneradas según su utilización final [por ejemplo, en España, el Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de aguas depuradas].
- 10 La OMS, ya en el año 1989, advirtió del importante riesgo que suponen los huevos de helminto cuando las aguas depuradas se utilizan para el riego de cultivos o para la acuicultura [World Health Organization, *Guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture* (1989), ISBN: 92-4-120778-7]. Así, estableció para tales usos, un límite igual o inferior a 1
- 15 huevo de helminto por litro de agua. En el año 2006, se fijó un límite aún más restrictivo, 0,1 huevo de helminto por litro cuando personas menores de 15 años estén expuestas a dichas aguas [World Health Organization, *Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater* (2006), ISBN: 92-4-154686-7]. En su apuesta por promover la reutilización de aguas depuradas [«Cerrar el círculo: un plan de acción de la UE para la economía circular» 2015],
- 20 la Unión Europea ha aprobado en el año 2020 el Reglamento UE 2020/741 relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua. Fundamentalmente, se refiere a riego agrícola, aunque también se contemplan usos adicionales tales como la reutilización del agua en la industria, y con fines medioambientales y recreativos. En el caso de los huevos de
- 25 helminto, se establece un límite de 1 huevo por litro. En España, donde la reutilización de las aguas es especialmente necesaria dada la escasez de este recurso, hace ya más de una década que se aprobó el Real Decreto 1620/2007, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Esta normativa recoge las limitaciones de la OMS y es incluso más restrictiva (0,1 huevo/litro) para diversas opciones de uso urbano, agrícola,
- 30 industrial y ambiental del agua regenerada.
- 35 La eliminación de los huevos de helminto de las aguas residuales supone un importante desafío. Sus anteriormente mencionadas características (pequeño tamaño, densidad ligeramente superior a la del agua y caparazón impermeable de alta resistencia) hacen que sean especialmente refractarios a los procesos de tratamiento convencionales. En las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), los huevos de helminto se eliminan
- fundamentalmente por sedimentación [Schwartzbrod, J. et al., *Water Science & Technology*, 21 (1989) 295-297; Wen, Q. et al., *Journal of Environmental Management*, 90 (2009) 1442-

1447; Sengupta, M.E. et al., *Water Research*, 45 (2011) 465-660]. De hecho, la gran mayoría de documentos de patente centrados en la eliminación de huevos de helminto en las EDAR están enfocadas al tratamiento de los fangos obtenidos [Buckholtz, H., US 10.010.827 B2; Hammond, G. et al., US 2014/202222 A1]. No obstante, aunque los huevos de helminto pasan  
5 mayoritariamente a los lodos a lo largo del tratamiento, su total eliminación del agua no está garantizada con los sistemas convencionales presentes en las EDAR siendo necesarios sistemas adicionales [Ravindran, V.B. et al., *Water*, 11 (2019) 1212]. Tratamientos terciarios avanzados como el cloro o la radiación ultravioleta, aplicados en las condiciones habituales, tampoco permiten garantizar la completa desactivación de los huevos [Rocha, M.C.V. et al.,  
10 *Water Research*, 103 (2016) 245-255]. Por ello, el desarrollo de nuevas tecnologías en este ámbito resulta de especial interés.

Una de las alternativas más estudiadas para la separación de huevos de helminto es la técnica de “lagooning”, que básicamente consiste en una sedimentación de sólidos con elevados  
15 tiempos de retención en lagunas de gran superficie. No obstante, este sistema tampoco ha demostrado ser completamente eficaz y, además, requiere grandes extensiones de terreno para su implantación [Jimenez, B. et al., *Water Science & Technology*, 56 (2007) 43-51; El Fels, L. et al., *Environmental Science and Pollution Research*, 26 (2019) 570-576]. Los procesos de filtración se presentan como la opción más prometedora para la separación de  
20 huevos de helminto hasta la fecha. De hecho, hay varios documentos de patente basados en esta técnica (Dautais, J.P. et al., US 2009/230057 A1; Arabi, S. et al., US 2020/140307 A1). En cualquier caso, es importante destacar que los sistemas de micro- y ultrafiltración han mostrado ser efectivos en la separación de gusanos adultos y larvas, pero no completamente eficaces en la eliminación de huevos [O’Connor, N.A. et al., *Water Science & Technology*, 76  
25 (2017) 1332-1346]. Este hecho, unido al alto consumo de energía y a la necesidad de una limpieza continua del sistema de filtración, hacen que su aplicación a gran escala esté muy limitada.

Dado que la separación de los huevos de helminto de las aguas es especialmente compleja,  
30 la mayoría de las tecnologías en evaluación tienen como objetivo alcanzar únicamente su desactivación. En este contexto, destacan la radiación ultravioleta, la aplicación de ozono, la utilización de microondas, el empleo de agentes químicos (ej. cloruro de amonio) y los procesos de oxidación avanzada. La desactivación de huevos de helminto mediante radiación ultravioleta requiere tiempos excepcionalmente largos comparados con los habitualmente  
35 utilizados en los tratamientos terciarios convencionales [de Lemos Chernicharo, C.A. et al., *Water Science & Technology*, 47 (2003) 185-192; Brownell, S.A. y Nelson, K.L., *Applied and*

Environmental Microbiology, 72 (2006) 2178-2184], lo que conlleva un alto coste. En la misma línea, la aplicación de ozonización está limitada por las altas concentraciones de ozono y los largos tiempos de reacción requeridos para desactivar los huevos de helminto [Orta de Velásquez, M.T. et al., Ozone: Science & Engineering, 26 (2004) 359-366; Zamudio-Pérez, E. et al., Ozone: Science & Engineering, 36 (2014) 570-581]. El empleo de microondas es una alternativa innovadora que ha mostrado reducir considerablemente el tiempo de operación comparado con las tecnologías anteriores [Mun, S. et al., Chemosphere, 77 (2009) 285-290; Novak, J.F. et al., US 6.618.957 B2]. No obstante, su aplicación a gran escala no resulta técnicamente viable. La utilización de diferentes agentes químicos para la desactivación de huevos de helminto ha sido también ampliamente investigada, destacando el empleo de especies cloradas como el cloruro de amonio [Pecson, B.M., y Nelson, K.L., Environmental Science & Technology, 39 (2005) 7909-7914]. De hecho, hay varios documentos de patente centrados en la combinación de diferentes especies orgánicas e inorgánicas para la desactivación de huevos de helminto [Feitelson et al., US 6.124.359; Mussari F.P. y Zahn A., WO 2011/130553 A2]. No obstante, la adición de reactivos químicos al agua puede generar un problema adicional de contaminación. Por otra parte, los procesos de oxidación avanzada han sido también ampliamente estudiados. Entre ellos, destacan la peroxidación asistida por radiación ultravioleta (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [Guadagnini, R.A. et al., Water Science & Technology, 68 (2013) 1825-1829] y los procesos Fenton [Morales, A.A. et al., Journal of Water and Health, 11 (2013) 419-429; Morales-Pérez, A.A. et al., Water Science & Technology, 73 (2016) 1000-1009], foto-Fenton [Bandala, E.R. et al., Journal of Water and Health, 10 (2012) 20-30] y electro-Fenton [Robles, I. et al., Chemosphere, 250 (2020) 126260]. El alto coste de los reactivos y el elevado consumo energético son las principales limitaciones de estos procesos. Recientemente, se han desarrollado membranas electroquímicas para llevar a cabo de manera conjunta la separación y desactivación de los huevos de helminto [Yang, Y. et al., Environmental Science Water Research & Technology, 5 (2019) 51-59]. No obstante, los resultados obtenidos hasta la fecha no son muy prometedores, pues tras 4 horas tan sólo se obtuvo una desactivación del 85% de los huevos de *Ascaris* empleando una corriente de 25 mA/cm<sup>2</sup> y una compleja membrana como electrodo (SnO<sub>2</sub>/Co-TiO<sub>2</sub>/Ir<sub>0,7</sub>Ta<sub>0,3</sub>O<sub>x</sub>).

30

Por otro lado, además del adecuado tratamiento de las aguas residuales para su reutilización, resulta esencial realizar un control exhaustivo de la concentración de huevos de helminto en estas corrientes. El método Bailenger modificado, propuesto por la OMS, es el más utilizado actualmente para la cuantificación e identificación de huevos de helminto en las aguas [Ayres, RM. y Duncan Mara, D., Analysis of wastewater for use in agriculture - A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques, (2006) ISBN: 92-4-154484-8]. En este método,

35

los huevos de helminto se separan por etapas sucesivas de centrifugación. Posteriormente, se emplea tampón acético-acetato para re-suspender la muestra y etil acetato o éter para la extracción, permitiendo separar los huevos de otras sustancias presentes en el agua, principalmente grasas. Finalmente, los huevos se separan por densidad utilizando una disolución salina y se cuentan al microscopio empleando portamuestras “McMaster”. Este método se caracteriza por su sencillez y bajo coste, pero presenta importantes inconvenientes. La separación de los huevos del agua es el principal escollo, pues el porcentaje de huevos que se separa es desconocido, existiendo una gran variabilidad en los resultados obtenidos [Ayres, R.M. y Mara, D.D., Analysis of wastewater for use in agriculture. A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques (1992) ISBN: 92-4-154484-8]. Por otra parte, la presencia de materia orgánica en el agua, incluso en muy baja concentración, supone una importante interferencia, pues muchos de los huevos serán arrastrados con ella en el proceso de separación utilizado. Finalmente, se trata de un método muy laborioso, que consume mucho tiempo, fundamentalmente en la etapa de separación de los huevos.

Actualmente, se están investigando diferentes alternativas para la detección y cuantificación de los huevos de helminto en matrices acuosas. Caben ser destacadas las tecnologías basadas en el análisis genético, así como en el desarrollo de software de procesamiento de imágenes [Amoah, I.D. et al., Acta Tropica, 169 (2017) 187-201]. No obstante, previo a su aplicación es necesaria la separación y concentración de los huevos presentes en la matriz acuosa, que se sigue realizando fundamentalmente por técnicas de sedimentación, aunque también pueden aplicarse filtración y flotación [Ravindran, V.B. et al., Water, 11 (2019) 1212]. La citometría de flujo ha recibido también un especial interés, pero se encuentra muy limitada pues solo permite detectar huevos que se encuentren en el intervalo de tamaño de 3 a 20  $\mu\text{m}$  [Ravindran, V.B. et al., Water, 11 (2019) 1212].

A la vista de estos antecedentes, el desarrollo de un procedimiento que permita separar de forma rápida, eficaz, económica y respetuosa con el medio ambiente los huevos de helminto de aguas depuradas o regeneradas representa un hallazgo de especial interés en este campo, donde actualmente no existe una técnica específica y efectiva para la completa separación de los huevos del medio acuoso. Así pues, un procedimiento de separación de estas características tendría una clara aplicación tanto como proceso de tratamiento de agua que permita la retirada de los huevos de helminto (tanto de aguas depuradas como de origen natural), así como método analítico para la determinación de la concentración de los huevos de helminto contenidos en dichas aguas.

## Sumario de la invención

De forma inesperada, los inventores han descubierto un procedimiento de separación de  
5 huevos de helminto del agua depurada o regenerada con un alto rendimiento de separación,  
empleando materiales de bajo coste y respetuosos con el medioambiente, utilizando  
partículas de materiales magnéticos de hierro. El procedimiento es de carácter universal  
respecto a la naturaleza del huevo de helminto, es decir, funciona con los dos tipos de  
helmintos (nemátodos y platelmintos) con independencia de su especie, por lo que no  
10 depende de su naturaleza o tamaño. Tal como se muestra en los ejemplos, los rendimientos  
de separación de los huevos son superiores al 95%. El procedimiento de la invención también  
logra la separación de los huevos de helminto de matrices acuosas de diferentes  
características (por ejemplo, con diferente salinidad y pH). Asimismo, se ha demostrado su  
efectividad tanto en agua desionizada como en efluentes reales provenientes de una EDAR.  
15 El procedimiento de la presente invención es particularmente ventajoso ya que conlleva una  
reducción significativa del tiempo necesario para lograr la separación de los huevos de  
helminto del agua, respecto a otros métodos recogidos en el estado de la técnica, tales como  
la sedimentación y la filtración. Asimismo, presenta una mayor reproducibilidad en el  
rendimiento de separación obtenido, con una reproducibilidad en los resultados obtenidos  
20 superior al 95%. El procedimiento de la presente invención presenta como ventaja adicional  
la simplicidad del equipamiento requerido y la viabilidad de su escalado para el tratamiento de  
grandes caudales de agua.

Por ello, en un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para  
25 la separación de huevos de helminto de una matriz de agua depurada o regenerada que  
comprende huevos de helminto, comprendiendo el procedimiento:

- a) proveer una matriz de agua depurada o regenerada que comprende huevos de helminto,
- b) añadir partículas de un material magnético de hierro a la matriz de agua depurada o  
regenerada provista en la etapa a) para formar agregados de los huevos de helminto con  
30 las partículas del material magnético de hierro, y
- c) separar los agregados de los huevos de helminto con las partículas del material magnético  
de hierro de la mezcla obtenida en la etapa b) mediante aplicación de un campo magnético.

En un segundo aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento de  
35 cuantificación de huevos de helminto en una matriz de agua depurada o regenerada que  
comprende huevos de helminto, comprendiendo el procedimiento:

- d) realizar las etapas a)-c) del procedimiento definido en el primer aspecto, y
- e) cuantificar los huevos de helminto separados en la etapa d).

En un tercer aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento de  
5 identificación de huevos de helminto en una matriz de agua depurada o regenerada que  
comprende huevos de helminto, comprendiendo el procedimiento:

- f) realizar las etapas a)-c) del procedimiento definido en el primer aspecto, y
- g) identificar los huevos de helminto obtenidos en la etapa f).

## 10 Descripción de las figuras

Figura 1: Distribución de tamaños de partícula de la magnetita 0,2  $\mu\text{m}$  utilizada en los  
ejemplos.

15 Figura 2: Imagen de microscopía óptica de los huevos de la especie *Ascaris* en agua (2.A) e  
imagen de microscopía electrónica de barrido de los agregados de huevos de la especie  
*Ascaris* y las partículas de magnetita una vez separados del agua (2.B).

Figura 3: Imagen de microscopía óptica de los huevos de la especie *Trichuris* en agua (3.A) e  
20 imagen de microscopía electrónica de barrido de los agregados de huevos de la especie  
*Trichuris* y las partículas de magnetita una vez separados del agua (3.B).

Figura 4: Imagen de microscopía óptica de los huevos de la especie *Taenia* en agua (4.A) e  
imagen de microscopía electrónica de barrido de los agregados de huevos de la especie  
25 *Taenia* y la magnetita una vez separados del agua (4.B).

## Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para la  
30 separación de huevos de helminto de una matriz de agua depurada o regenerada que  
comprende huevos de helminto, comprendiendo el procedimiento:

- a) proveer una matriz de agua depurada o regenerada que comprende huevos de helminto,
- b) añadir partículas de material magnético de hierro a la matriz de agua depurada o  
regenerada provista en la etapa a) para formar agregados de los huevos de helminto con  
35 las partículas del material magnético de hierro, y

c) separar los agregados de los huevos de helminto con las partículas del material magnético de hierro de la mezcla obtenida en la etapa b) mediante aplicación de un campo magnético.

En el contexto de la presente invención, el término “huevo de helminto” o “huevos de helminto”  
5 se refiere a los huevos procedentes de helmintos parásitos que suponen un alto riesgo para la salud humana y el medio ambiente. El tamaño y forma de estos huevos es variado, aunque de manera general se encuentran en el intervalo de 20 a 80  $\mu\text{m}$  [Ayres, R.M. y Mara, D.D., Analysis of wastewater for use in agriculture. A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques (1992) ISBN: 92-4-154484-8]. El tamaño de los huevos se analiza  
10 mediante microscopía óptica, por ejemplo, utilizando las condiciones descritas en los ejemplos. Se mide la longitud y el ancho de los huevos de helminto y se le asigna el tamaño de la mayor de sus dimensiones (longitud).

Los huevos se pueden clasificar en función del filo del helminto del que provengan, pudiendo  
15 distinguirse los huevos de nemátodos y los de platelmintos. Se han identificado un total de veintiséis helmintos parásitos cuyos gusanos se encuentran en las heces y que, por tanto, son susceptibles de contaminar las aguas [World Health Organization, Integrated guide to sanitary parasitology (2004) ISBN: 92-9021-386-8]. Entre ellos, destacan dos especies por su especial riesgo para la salud humana: *Ascaris spp.* y *Trichuris spp.*, y una por su riesgo para el ganado  
20 bovino y porcino: *Taenia spp.* [World Health Organization, Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater (2006), ISBN: 92-4-154686-7].

Los huevos de la especie *Ascaris* presentan un tamaño medio, con una longitud de 45-75  $\mu\text{m}$  y una anchura de 35-50  $\mu\text{m}$  [World Health Organization, Integrated guide to sanitary  
25 parasitology (2004) ISBN: 92-9021-386-8]. La forma de éstos es oval, ligeramente redondeada. Su pared exterior es gruesa y rugosa, con una capa intermedia incolora muy gruesa y una fina membrana interna. El recubrimiento del huevo es de color marrón dorado mientras que su contenido es incoloro o amarillo pálido. El interior del huevo no está segmentado y presenta gránulos rugosos. Un ejemplo particular de la especie *Ascaris* es  
30 *Ascaris lumbricoides*,

Los huevos de la especie *Trichuris* presentan un tamaño medio, con una longitud de 50-58  $\mu\text{m}$  y una anchura de 22-27  $\mu\text{m}$  [World Health Organization, Integrated guide to sanitary  
35 parasitology (2004) ISBN: 92-9021-386-8]. La forma de los mismos es similar a la de un limón o barril. Su pared exterior es gruesa y de superficie lisa, de color marrón-anaranjado, mientras que la interna es muy fina y prácticamente transparente. El interior del huevo no está

segmentado y presenta gránulos. Un ejemplo particular de la especie *Trichuris* es *Trichuris trichiura*.

Los huevos de la especie *Taenia* presentan un tamaño pequeño, con una longitud de 35-40  
5  $\mu\text{m}$  y una anchura de 30-35  $\mu\text{m}$  [World Health Organization, Integrated guide to sanitary  
parasitology (2004) ISBN: 92-9021-386-8]. La forma de los mismos es redondeada. Su pared  
exterior es gruesa y de superficie lisa. El color del huevo va del amarillo pálido al marrón. El  
recubrimiento del huevo es de color marrón anaranjado mientras que su contenido es amarillo.  
El interior del huevo no está segmentado y presenta una masa granular redondeada. Ejemplos  
10 particulares de la especie *Taenia* son *Taenia saginata* y *Taenia solium*.

Una ventaja del procedimiento de la invención es su carácter universal ya que la separación  
magnética de los agregados formados es efectiva con independencia de la naturaleza, forma  
y tamaño de los huevos de helminto.

15 En una realización preferida, los huevos de helminto se seleccionan del grupo que consiste  
en huevos de *Ascaris spp.*, *Trichuris spp.*, *Taenia spp.* y mezclas de los mismos. En una  
realización preferida, los huevos de helminto son de *Ascaris spp.* En una realización particular,  
los huevos de helminto son de *Trichuris spp.* En otra realización particular, los huevos de  
20 helminto son de *Taenia ssp.*

En una realización preferida, los huevos de helminto se seleccionan del grupo que consiste  
en huevos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Taenia saginata*, *Taenia solium* y  
mezclas de los mismos. En una realización particular, los huevos de helminto son de *Ascaris*  
25 *lumbricoides*. En otra realización particular, los huevos de helminto son de *Trichuris trichiura*.  
En otra realización particular, los huevos de helminto son de *Taenia saginata*. En otra  
realización particular, los huevos de helminto son de *Taenia solium*.

En el contexto de la presente invención, la expresión “agua depurada” se refiere al agua  
30 depurada de acuerdo con la definición proporcionada en el Real Decreto 1620/2007, es decir,  
la expresión “agua depurada” o “aguas depuradas” se refiere a “aguas residuales que han  
sido sometidas a un proceso de tratamiento que permita adecuar la normativa de vertidos  
aplicable”. En concreto, y de acuerdo con el Real Decreto 509/1996, por el que se establecen  
las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas, se trata de agua residual  
35 que ha sido sometida a diferentes tratamientos físico-químicos y/o biológicos que permiten  
reducir el contenido en sólidos en suspensión a una cantidad igual o inferior a 35 mg/L, la

demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) a 25 mg/L O<sub>2</sub>, y la demanda química de oxígeno (DQO) a 125 mg/L O<sub>2</sub>. En particular, el agua depurada no contiene microplásticos.

En el contexto de la presente invención, la expresión “agua regenerada” se refiere al agua  
5 regenerada de acuerdo con la definición proporcionada en el Real Decreto 1620/2007, es decir, la expresión “agua regenerada” o “aguas regeneradas” se refiere a “aguas residuales depuradas que han sido sometidas a un proceso de tratamiento adicional complementario que permite adecuar su calidad al uso al que se destinan”, como por ejemplo, tratamientos de filtración avanzados (ultrafiltración, nanofiltración u ósmosis inversa), ozonización, aplicación  
10 de radiación ultravioleta y/o procesos de oxidación avanzada (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o foto-Fenton, entre otros). Las propiedades del agua regenerada varían en función del uso final, tal como se especifica en el Anexo I.A. del Real Decreto 1620/2007 (dicho anexo se incorpora por referencia a la presente invención). Además de cumplir con los valores máximos de contenido en sólidos en suspensión, la demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) y la demanda  
15 química de oxígeno (DQO) fijados para las aguas depuradas, en particular, el agua regenerada contiene como máximo 10000 UFC/100mL de *E. coli*, máximo 35 mg/mL de sólidos en suspensión y máximo 15 UNT de turbidez. De forma más preferida, además de cumplir con los criterios del agua depurada, el agua regenerada contiene como máximo 200 UFC/100mL de *E. coli*, máximo 20 mg/mL de sólidos en suspensión y máximo 10 UNT de  
20 turbidez. De forma aún más preferida, además de cumplir con los criterios del agua depurada, el agua regenerada contiene como máximo 0 UFC/100mL de *E. coli*, máximo 10 mg/mL de sólidos en suspensión y máximo 2 UNT de turbidez. En particular, el agua regenerada no contiene microplásticos.

25 Los sólidos en suspensión se pueden determinar utilizando procedimientos conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo la gravimetría con filtro de fibra de vidrio (“Standard methods for the examination of water and wastewater”, “2540 Solids” (APHA, AWWA, WPCF, 1992)). La turbidez también se puede determinar utilizando procedimientos conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo nefelometría (“Standard methods for the examination  
30 of water and wastewater”, “2130 Turbidity” (APHA, AWWA, WPCF, 1992)). El recuento de *E. coli* se puede determinar utilizando procedimientos conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo utilizando β-glucuronidasa positiva (“Standard methods for the examination of water and wastewater”, “9223 Enzyme substrate coliform test” (APHA, AWWA, WPCF, 1992)). La demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) se puede determinar utilizando  
35 procedimientos conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo el método de incubación durante cinco días (“Standard methods for the examination of water and

wastewater”, “5210 Biochemical Oxygen Demand (COD)” (APHA, AWWA, WPCF, 1992)). La demanda química de oxígeno (DQO) se puede determinar utilizando procedimientos conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo el método de digestión utilizando dicromato potásico (“Standard methods for the examination of water and wastewater”, “5220  
5 Chemical Oxygen Demand (COD)” (APHA, AWWA, WPCF, 1992)).

En una realización particular, la matriz de agua depurada o regenerada no comprende microplásticos. En el contexto de la presente invención, el término “microplástico” o “microplásticos” se refiere a un material plástico de diámetro promedio inferior a 5 mm,  
10 preferiblemente en el rango de 0,1  $\mu\text{m}$  a 5 mm. El tamaño de los microplásticos se puede determinar mediante microscopía óptica, midiendo la longitud y el ancho de los microplásticos y asignándole el tamaño de la mayor dimensión (longitud). El diámetro promedio se define como el promedio de la longitud de las partículas de microplásticos (sumatorio de las longitudes de las partículas analizadas entre el número de partículas analizadas).

15 Los microplásticos pueden estar formados por cualquier material plástico, preferiblemente polímeros orgánicos sintéticos, tales como poliésteres, en particular fibras de poliéster y polietileno tereftalatos (PET), polietilenos (PE) incluyendo polietilenos de alta densidad (HDPE) y de baja densidad (LDPE), policloruros de vinilo (PVC), polipropilenos (PP),  
20 poliestirenos (PS), policarbonatos (PC), poliuretanos (PU) y poliéster, tales como las fibras de poliéster.

En una realización particular, el procedimiento se aplica a agua depurada. En otra realización particular, el procedimiento de la invención se aplica a agua regenerada.

25 El objetivo de la aplicación del procedimiento de la presente invención es el de la separación de los huevos de helminto del agua depurada o regenerada de forma que ésta pueda ser apropiada para los fines recogidos en el Real Decreto 1620/2007 (urbano, agrario, industrial, recreativo y ambiental). El uso urbano incluye el riego de jardines privados, descarga de  
30 aparatos sanitarios, riego de zonas verdes urbanas, baldeo de calles, sistemas contra incendios y lavado industrial de vehículos. El uso agrario incluye el riego de cultivos con sistema de aplicación del agua que permita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles para alimentación humana en fresco, así como el riego de cultivo leñosos que impida el contacto del agua regenerada con los frutos consumidos en la alimentación  
35 humana, el riego de cultivos de flores ornamentales, viveros, invernaderos sin contacto directo del agua regenerada con las producciones, riego de cultivos industriales no alimentarios,

forrajes ensilados, cereales y semillas oleaginosas. El uso industrial incluye aguas de proceso y limpieza, torres de refrigeración y condensadores evaporativos. El uso recreativo incluye el riego de campos de golf, estanques, masas de agua y caudales circulantes ornamentales, en los que está impedido el acceso del público al agua. Finalmente, el uso recreativo incluye la  
5 recarga de acuíferos por percolación o inyección directa, el riego de bosques y zonas verdes y la silvicultura, así como mantenimiento de humedales, caudales mínimos y similares. Por todo ello, las depuradoras de aguas residuales son las principales instalaciones de interés para la aplicación del procedimiento de la presente invención. Asimismo, este procedimiento de separación de los huevos de helminto es también de interés para el desarrollo de métodos  
10 analíticos con el fin de cuantificar e identificar los huevos de helminto en aguas regeneradas.

El procedimiento de la presente invención permite la separación de los huevos de helminto independientemente de la salinidad del agua depurada o regenerada. Es efectivo tanto en agua dulce, con bajas concentraciones de sales, inferiores a 0,1 g/L, como en aguas salobres,  
15 con una salinidad de 5 g/L. Preferiblemente, la matriz de agua depurada o regenerada presenta una salinidad en el intervalo de 0,05 a 5 g/L, más preferiblemente de 0,1 a 2 g/L.

El término "salinidad" hace referencia a la concentración de sales inorgánicas en la matriz de agua depurada o regenerada. Las sales más frecuentes en estas matrices son sales de  
20 cationes seleccionados del grupo que consiste en litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, estroncio y bario, con aniones seleccionados del grupo que consiste en fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, nitrato, fosfato, carbonato y borato, como por ejemplo NaCl, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, entre otros. La salinidad se puede determinar realizando la medida de conductividad eléctrica a 25 °C mediante un conductivímetro.

25 En una realización preferida, se acondiciona el pH de la matriz de agua depurada o regenerada provista en la etapa a) antes de realizar la etapa b) de modo que el pH se encuentre en el intervalo de 5 a 9.

30 Preferiblemente, el pH de la matriz de agua depurada o regenerada debe estar entre 3 y 10, más preferiblemente entre 5 y 9, aún más preferiblemente entre 6 y 8, lo más preferido aproximadamente 7. El pH de la matriz de agua depurada o regenerada se puede acondicionar añadiendo una base, como por ejemplo hidróxido sódico, hidróxido potásico o carbonato sódico, entre otras, o un ácido, como por ejemplo ácido nítrico, ácido clorhídrico o  
35 ácido sulfúrico, entre otros, hasta alcanzar un valor de pH dentro del intervalo definido anteriormente. El pH se puede determinar mediante un pH-metro.

En una realización preferida se acondiciona la matriz de agua depurada o regenerada de modo que el pH se encuentre en el intervalo de 3 a 10.

- 5 En una realización particular se acondiciona la matriz de agua depurada o regenerada de modo que el pH se encuentre en el intervalo de 5 a 9.

La etapa a) del procedimiento de la invención es proveer una matriz de agua depurada o regenerada que comprende huevos de helminto. La matriz de agua depurada o regenerada se puede proveer por lotes si se realiza en procedimiento por lotes (o de forma discontinua) o se puede proveer de forma continua si se realiza el procedimiento en continuo. El volumen de la matriz de agua depurada o regenerada provista en la etapa a) preferiblemente es de 0,01 a 10000 L en caso de trabajar por lotes. Y el caudal de matriz de agua depurada o regenerada provista en la etapa a) preferiblemente es de 1 a 10000 L/s en caso de trabajar en continuo.

15

La siguiente etapa, etapa b), es la adición de partículas de material magnético de hierro a la matriz de agua depurada o regenerada provista en la etapa a) para formar agregados de los huevos de helminto con las partículas del material magnético de hierro.

- 20 El término “material magnético de hierro” hace referencia a cualquier sustancia sólida que comprende al menos una especie de hierro y con propiedades ferromagnéticas, es decir, que es atraída por un imán. En una realización particular, el material magnético de hierro es de naturaleza inorgánica. Preferiblemente, el material magnético de hierro presenta una saturación magnética de entre 5 y 100 emu/g (entre  $5 \cdot 10^3$  y  $10^5$  A/m), más preferiblemente de entre 30 y 90 emu/g (entre  $30 \cdot 10^3$  y  $90 \cdot 10^3$  A/m), aún más preferiblemente entre 65 y 90 emu/g (entre  $65 \cdot 10^3$  y  $90 \cdot 10^3$  A/m), lo más preferido entre 70 y 90 emu/g (entre  $70 \cdot 10^3$  y  $90 \cdot 10^3$  A/m). Las propiedades magnéticas del material magnético de hierro se pueden determinar empleando un magnetómetro con sensor SQUID (*superconducting quantum interference device*). La imanación (M) del material magnético de hierro se mide en función del campo magnético externo aplicado (H) en el intervalo de -10000 a 10000 Oe (lo que equivale a -797700 a 797700 A/m) a temperatura ambiente. El valor de saturación magnética del material es aquel valor de M alcanzado cuando cualquier incremento posterior en H no provoca un aumento en la magnetización del material. Preferiblemente, el material de hierro presenta un contenido en hierro de al menos el 10% en peso respecto al peso total del material, preferiblemente de al menos 20% en peso, más preferiblemente de al menos 25% en peso, aún más preferiblemente de al menos 30% en peso, aún más preferiblemente de al menos el

35% en peso, aún más preferiblemente de al menos el 40% en peso, aún más preferiblemente de al menos el 45% en peso, aún más preferiblemente de al menos el 50% en peso, aún más preferiblemente de al menos 55% en peso, aún más preferiblemente de al menos 60% en peso, aún más preferiblemente de al menos 65% en peso. El porcentaje de hierro se puede  
5 determinar empleando un espectrómetro de fluorescencia de rayos X por reflexión total (TXRF), utilizando el procedimiento descrito en los ejemplos.

Preferiblemente el material magnético de hierro comprende una especie de hierro seleccionada del grupo que consiste en Fe(II), Fe(III), Fe metálico y mezcla de los mismos.  
10 Un ejemplo serían los minerales magnéticos de hierro, tales como la magnetita (formado por óxido ferroso-diférrico  $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ , a veces se formula como  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), la maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), la ilmenita ( $\text{FeTiO}_3$ ) y la pirrotita ( $\text{Fe}_{0,8-1}\text{S}$ ), entre otros. En una realización preferida, el material magnético de hierro es el mineral magnetita.

15 El uso de minerales magnéticos de hierro, en particular de la magnetita, es ventajoso desde el punto de vista económico y ambiental ya que son materiales abundantes, respetuosos con el medioambiente y de fácil separación de las matrices acuosas.

El material magnético de hierro está en forma de partículas. El término "partícula" hace  
20 referencia a que el material magnético de hierro está en forma de polvo o gránulos con un diámetro promedio inferior a 5 mm, preferiblemente cuyo diámetro promedio está comprendido entre 0,05  $\mu\text{m}$  y 5 mm, más preferiblemente entre 0,05  $\mu\text{m}$  y 1 mm, aún más preferiblemente entre 0,05  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ , aún más preferiblemente entre 0,05  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , aún más preferiblemente entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ , aún más preferiblemente entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 5  
25  $\mu\text{m}$ , aún más preferiblemente entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 1  $\mu\text{m}$ , aún más preferiblemente entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,5  $\mu\text{m}$ , lo más preferido entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,3  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, la distribución de tamaño de partículas debe ser suficientemente estrecha en el intervalo de tamaño establecido. La determinación del tamaño de partícula y su distribución puede realizarse mediante  
30 microscopía electrónica de barrido, por ejemplo, utilizando las condiciones descritas en los ejemplos. Para la determinación de la distribución del tamaño de partícula, resulta conveniente utilizar los valores estadísticos D10, D50 y D90, que son los que interceptan el 10%, 50% y 90% en volumen de las partículas acumuladas. En el intervalo preferido el D10 (indica que el 10% en volumen de las partículas de la muestra presentan un diámetro menor que este valor) es inferior o igual a 0,3  $\mu\text{m}$ , el D50 (indica que el 50% en volumen de las partículas de la  
35 muestra presentan un diámetro menor que este valor, y representa el tamaño medio de grano) es inferior o igual a 0,50  $\mu\text{m}$  y el D90 (indica que el 90% en volumen de las partículas de la

muestra presentan un diámetro menor que este valor) es inferior o igual a 0,8  $\mu\text{m}$ . En el intervalo más preferido el D10 (indica que el 10% en volumen de las partículas de la muestra presentan un diámetro menor que este valor) es inferior o igual a 0,15  $\mu\text{m}$ , el D50 (indica que el 50% en volumen de las partículas de la muestra presentan un diámetro menor que este valor, y representa el tamaño medio de grano) es inferior o igual a 0,20  $\mu\text{m}$  y el D90 (indica que el 90% en volumen de las partículas de la muestra presentan un diámetro menor que este valor) es inferior o igual a 0,35  $\mu\text{m}$ . Las partículas de material magnético de hierro pueden obtenerse mediante molturado del material y posterior tamizado en los intervalos de tamaños anteriormente descritos. El tamaño de las partículas de material magnético de hierro hace referencia al diámetro promedio de dichas partículas, que se define como el promedio de la longitud (sumatorio de las longitudes de las partículas analizadas entre el número de partículas analizadas), siendo la longitud la dimensión mayor de cada partícula de material magnético de hierro. Para un conocimiento más preciso del tamaño de partícula se pueden emplear técnicas de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, en particular microscopía electrónica de barrido tal como se describe en los ejemplos.

Los términos “agregados de los huevos de helminto con las partículas del material magnético de hierro”, “agregados huevo de helminto/material magnético de hierro” o “agregados” hacen referencia a una agrupación de partículas formadas por los huevos de helminto y las partículas del material magnético de hierro debido a la interacción que se produce entre ambos.

La adición de las partículas de material magnético de hierro a la matriz de agua depurada o regenerada se puede realizar de forma discontinua si se realiza en procedimiento de forma discontinua (o por lotes) o se puede realizar de forma continua si se realiza el procedimiento en continuo.

En una realización particular, el procedimiento de la invención se realiza de forma discontinua, es decir, por lotes.

En otra realización particular, el procedimiento de la invención se realiza de forma continua.

En una realización preferida, la cantidad de partículas de material magnético de hierro (en concentración final medida en la propia matriz de agua depurada o regenerada a tratar) añadidos a la matriz de agua depurada o regenerada en la etapa b) se encuentra en el rango de 1 mg/L a 4000 g/L, más preferiblemente de 10 mg/L a 1000 g/L, aún más preferiblemente

de 10 mg/L a 100 g/L, aún más preferiblemente de 10 mg/L a 10 g/L, lo más preferido de 100 mg/L a 1 g/L.

En una realización particular, la cantidad de partículas de material magnético de hierro  
5 añadidos a la matriz de agua depurada o regenerada en la etapa b) se encuentra en el rango de 0,01 mg a 10 g de material magnético por cada huevo de helminto presente en la matriz de agua depurada o regenerada a tratar, preferiblemente de 0,01 mg a 1 g de material magnético por cada huevo de helminto presente en la matriz de agua depurada o regenerada a tratar, aún más preferiblemente de 0,1 mg a 500 mg de material magnético por cada huevo  
10 de helminto presente en la matriz de agua depurada o regenerada a tratar, lo más preferido de 0,1 mg a 1 mg de material magnético por cada huevo de helminto presente en la matriz de agua depurada o regenerada a tratar.

El número de huevos de helminto presentes en una matriz de agua depurada o regenerada  
15 se puede determinar mediante técnicas convencionales, tales como el método de Bailenger modificado (Ayres, R.M. y Mara, D.D., Analysis of wastewater for use in agriculture. A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques (1992) ISBN: 92-4-154484-8). En este método, la separación de los huevos del agua se consigue mediante sedimentación y sucesivas centrifugaciones. A continuación, el pellet obtenido se trata con  
20 distintos disolventes con el fin de retirar grasas y materia orgánica. Finalmente, el pellet se re-suspende en una disolución salina, que permite que los huevos floten, los cuales son finalmente analizados mediante microscopía óptica utilizando un portamuestras McMaster.

En una realización preferida, la mezcla obtenida en la etapa b) se somete a agitación antes  
25 de realizar la etapa c). La agitación favorece la interacción de los huevos de helminto y las partículas de material magnético de hierro para formar los agregados. La agitación se puede realizar mediante cualquier método convencional conocido por el experto en la materia, como por ejemplo, agitación mecánica, magnética o electrostática, y más preferiblemente, mecánica.

30 El procedimiento de la presente invención es particularmente ventajoso respecto a otros procedimientos del estado de la técnica debido a la reducción significativa del tiempo necesario para lograr la separación. Asimismo, presenta una mayor reproducibilidad en el rendimiento de separación obtenido. Tal como se muestra en los ejemplos, la separación es  
35 prácticamente inmediata, siendo necesario un tiempo de contacto entre los huevos de helminto y las partículas de material magnético de hierro inferiores a 1 min. Por ello, en una

realización particular, la mezcla obtenida en la etapa b) se mantiene en contacto, preferiblemente con agitación, durante un tiempo desde 15 segundos a 2 min, más preferiblemente desde 15 segundos a 1 minuto, lo más preferido aproximadamente 30 segundos.

5

Una vez formados los agregados, éstos se separan de la matriz de agua en la etapa c) mediante la aplicación de un campo magnético.

Dicho campo magnético se puede generar con un imán o electroimán, preferiblemente  
10 mediante un imán.

El procedimiento de la presente invención presenta como ventaja adicional la simplicidad del equipamiento requerido y la viabilidad de su escalado para el tratamiento de grandes caudales de agua.

15

El procedimiento descrito permite separar todos los sólidos magnéticos de la matriz de agua depurada o regenerada. Los sólidos magnéticos comprenden tanto los agregados como las partículas de material magnético que no han formado agregados y se encuentran libres de huevos de helminto.

20

En una realización particular, el agua obtenida tras aplicar el procedimiento de la presente invención contiene menos de 1 huevo de helminto por cada 10 L de volumen de agua, preferiblemente menos de 1 huevo de helminto por cada 100 L de volumen de agua.

25 La cuantificación de huevos de helminto comprendido en los sólidos magnéticos separados puede llevarse a cabo previa separación de las partículas de material magnético libres. En una realización particular, la separación de las partículas de material magnético libres se realiza mediante un tratamiento físico. Dicho tratamiento físico se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia, aunque de manera  
30 preferida, la recuperación se consigue mediante sedimentación, aprovechando la mayor densidad de las partículas de material magnético libres respecto a los agregados que no hayan interactuado con los huevos de helminto. La separación de las partículas de material magnético libres por sedimentación puede realizarse empleando disoluciones salinas de densidad variable que favorezcan la flotación de los agregados.

35

Es posible reutilizar los sólidos magnéticos separados de la matriz de agua depurada o regenerada en el procedimiento descrito. Las partículas de material magnético libre sedimentadas de acuerdo con el procedimiento descrito en el párrafo anterior podrían ser directamente reutilizadas en el proceso de separación de huevos de helminto de matrices de  
5 agua depurada o regenerada.

En otra realización particular, todos los sólidos magnéticos separados de la matriz de agua depurada o regenerada pueden ser reutilizados tras un tratamiento térmico que garantice la inactivación de los huevos de helminto. Dicho tratamiento térmico se puede llevar a cabo  
10 mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia, aunque de manera preferida, la inactivación de los huevos de helminto se consigue mediante el calentamiento de los sólidos magnéticos separados del agua en la etapa c) hasta una temperatura superior a 60 °C, preferiblemente a una temperatura comprendida entre 60 y 120 °C, más preferiblemente a una temperatura comprendida entre 60 y 110 °C, aún más preferiblemente  
15 a una temperatura comprendida entre 70 y 100 °C. Para ello, se calienta la mezcla utilizando resistencias eléctricas, vapor, radiación o cualquier sistema de calefacción. En una realización particular, dicho calentamiento tiene una duración de 5 min a 1 hora, más preferiblemente de 5 a 30 min, más preferiblemente de 5 a 15 min, lo más preferido aproximadamente 10 min.

20 En otra realización particular, todos los sólidos magnéticos separados de la matriz de agua depurada o regenerada pueden ser reutilizados tras un tratamiento de oxidación avanzada que garantice la inactivación de los huevos de helminto. Los procesos de oxidación avanzada han demostrado ser efectivos en la inactivación de huevos de helminto (Bandala, E.R. et al., Journal of Water and Health, 10 (2012) 20-30; Robles, I. et al., Chemosphere, 250 (2020)  
25 126260). Por otra parte, los materiales magnéticos de hierro son susceptibles de utilizarse como catalizadores en procesos de oxidación avanzada para degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos presentes en el agua (Munoz, M. et al., Applied Catalysis B: Environmental, 203 (2017) 106-173; Munoz, M. et al., Catalysis Today, 313 (2018) 142-147). Así, en una realización preferida, la inactivación de los huevos de helminto contenidos en los  
30 agregados se llevaría a cabo mediante oxidación avanzada utilizando el propio material magnético como catalizador. En concreto, el proceso de oxidación avanzada podría ser de tipo Fenton como el Fenton heterogéneo o procesos asistidos como, sono-Fenton, foto-Fenton o electro-Fenton.

35 En otra realización particular que pretende reutilizar las partículas de material magnético y, a su vez, eliminar los huevos de helminto, se lleva a cabo un tratamiento térmico de calcinación

de todos los sólidos magnéticos separados de la matriz de agua depurada o regenerada (agregados y partículas de material magnético libres). Dicho tratamiento térmico se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia, aunque de manera preferida, la recuperación se consigue mediante combustión de los huevos de  
5 helminto en atmósfera de aire calentando los sólidos magnéticos separados de la matriz de agua depurada o regenerada. Para ello, se calientan los sólidos magnéticos hasta una temperatura comprendida entre 250 y 600 °C, preferiblemente hasta una temperatura comprendida entre 300 y 500 °C. En particular, el calentamiento se realiza a una velocidad comprendida entre 0,5 y 20 °C/min, más preferiblemente a una velocidad de aproximadamente  
10 5 °C/min. En una realización particular, se calienta hasta una temperatura comprendida entre 250 y 600 °C a una velocidad comprendida entre 0,5 y 20 °C/min, preferiblemente a aproximadamente 5 °C/min. En otra realización particular se calienta hasta una temperatura comprendida entre 300 y 500 °C a una velocidad comprendida entre 0,5 y 20 °C/min, preferiblemente a aproximadamente 5 °C/min. Generalmente, la temperatura de inicio del  
15 calentamiento es temperatura ambiente (20-25 °C). Preferiblemente el calentamiento se efectúa mediante un ciclo térmico.

En un segundo aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento de cuantificación de huevos de helminto en una matriz de agua depurada o regenerada que  
20 comprende huevos de helminto, comprendiendo el procedimiento:

- d) realizar las etapas a)-c) del procedimiento definido en el primer aspecto, y
- e) cuantificar los huevos de helminto separados en la etapa d).

Este procedimiento es particularmente adecuado para el análisis de matrices acuosas.  
25

La etapa d) es la realización del procedimiento descrito en detalle en el primer aspecto de la presente invención, que comprende las siguientes etapas, tal como se ha definido anteriormente:

- a) proveer una matriz de agua depurada o regenerada que comprende huevos de  
30 helminto,
- b) añadir partículas de material magnético de hierro a la matriz de agua depurada o regenerada provista en la etapa a) para formar agregados de los huevos de helminto con las partículas del material magnético de hierro, y
- c) separar los agregados de los huevos de helminto con las partículas del material  
35 magnético de hierro de la mezcla obtenida en la etapa b) mediante aplicación de un campo magnético.

La etapa e) es cuantificar los huevos de helminto en los agregados de los huevos de helminto con las partículas del material magnético obtenidos en la etapa d).

- 5 Dicha cuantificación se puede realizar mediante el método de Bailenger modificado (Ayres, R.M. y Mara, D.D., Analysis of wastewater for use in agriculture. A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques (1992) ISBN: 92-4-154484-8).

En un tercer aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento de  
10 identificación de huevos de helminto en una matriz de agua depurada o regenerada que comprende huevos de helminto, comprendiendo el procedimiento:

- f) realizar las etapas a)-c) del procedimiento definido en el primer aspecto, y
- g) identificar los huevos de helminto obtenidos en la etapa f).

- 15 Este procedimiento es particularmente adecuado para el análisis de matrices de agua depurada o regenerada.

La etapa f) es la realización del procedimiento descrito en detalle en el primer aspecto de la presente invención, que comprende las siguientes etapas, tal como se ha definido  
20 anteriormente:

- a) proveer una matriz de agua depurada o regenerada que comprende huevos de helminto,
- b) añadir partículas de material magnético de hierro a la matriz de agua depurada o regenerada provista en la etapa a) para formar agregados de los huevos de helminto  
25 con las partículas del material magnético de hierro, y
- c) separar los agregados de los huevos de helminto con las partículas del material magnético de hierro de la mezcla obtenida en la etapa b) mediante aplicación de un campo magnético.

- 30 La etapa g) es identificar los huevos de helminto en los agregados de los huevos de helminto con las partículas del material magnético obtenidos en la etapa f).

Dicha identificación se puede realizar mediante técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo microscopía óptica.

35

A continuación, se describen ejemplos ilustrativos que revelan las características y ventajas de la invención. Sin embargo, no deben interpretarse como limitativos del objeto de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

## 5 Ejemplos

### ***Materiales y métodos***

#### ***Cálculo del rendimiento en la separación de huevos de helminto***

10

Los experimentos de separación de huevos de helminto se realizaron en viales o botellas de vidrio empleando un volumen de matriz acuosa de 50 mL a 1 L. A la misma, se adicionó una cantidad conocida de huevos de helminto y, a continuación, de material magnético de hierro. La suspensión se agitó mecánicamente durante 30 s. Después, se aplicó un campo generado con un imán para separar los agregados huevo/material magnético de hierro de la matriz acuosa.

15

Para calcular el rendimiento en la separación de huevos de helminto, la matriz acuosa (tras la separación de los sólidos magnéticos) fue analizada siguiendo el método de Bailenger modificado (Ayres, R.M. y Mara, D.D., Analysis of wastewater for use in agriculture. A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques (1992) ISBN: 92-4-154484-8). En este método, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

20

25

30

35

1. Sedimentación de la muestra durante 2 h en recipiente abierto y de paredes rectas. Este paso sólo es necesario cuando se parte de muestras de gran volumen (1 L o superior).
2. Retirada del 90% del sobrenadante utilizando una bomba de aspiración o una pipeta. Este paso sólo es necesario cuando se parte de muestras de gran volumen (1 L o superior).
3. Centrifugación de la muestra obtenida a 1000 g durante 15 min. Enjuague del recipiente con solución detergente (1 mL de Triton X-100 en 1 L de agua de grifo), y adición de los enjuagues al sedimento.
4. Retirada del sobrenadante. Si en el paso anterior se utilizaron varios tubos centrifugos, se transfieren esos volúmenes a un solo tubo y se vuelve a centrifugar.
5. Suspensión del pellet obtenido en un volumen igual de tampón acetoacético (pH 4,5).
6. Adición de dos volúmenes de acetato de etilo o éter y mezclar la solución en un mezclador de vórtice.

7. Centrifugación de la muestra a 1000 g durante 15 min. La muestra se habrá separado en tres fases distintas. Los huevos de helminto estarán en la capa inferior.
8. Registro del volumen de la fase inferior. A continuación, se vierte con cuidado el resto del sobrenadante en una acción suave.
- 5 9. Resuspensión del pellet en cinco volúmenes de solución de sulfato de zinc (33% peso/volumen), y registro del volumen final. Mezclado en mezclador de vórtice.
10. Retirada rápida de una alícuota con una pipeta Pasteur y transferencia a un portamuestras McMaster para su examen final.
11. Se deja reposar durante cinco minutos el portamuestras McMaster en una superficie plana. Esto permite que todos los huevos floten a la superficie.
- 10 12. Cuantificación de los huevos de helminto en microscopio óptico utilizando el portamuestras McMaster, con un aumento de 10x o 40x. Se cuentan todos los huevos vistos dentro de una cuadrícula en ambas cámaras del portamuestras McMaster.
13. Cálculo del número de huevos de helminto por litro siguiendo la ecuación:

15

$$N = \frac{AX}{PV}$$

donde:

N = número de huevos por litro de muestra

20 A = número de huevos contados en el portamuestras McMaster o la media de los recuentos de dos o tres portamuestras

X - volumen del producto final (ml)

P - volumen del portamuestras McMaster (0,15 ml por cámara)

V - volumen de muestra original (litros)

25

Este procedimiento de análisis de los huevos de helminto se realizó por triplicado, registrándose la media del valor obtenido.

### ***Determinación del tamaño de partícula***

30

En la presente invención, los huevos de helminto fueron añadidos a las matrices acuosas para posteriormente llevar a cabo su separación vía magnética mediante el procedimiento descrito en la memoria. Los huevos de helminto utilizados pertenecen a las especies *Ascaris*, *Trichuris* y *Taenia*. Fueron suministrados por la empresa Hydrolab Microbiológica S.L. en viales sellados de 100 huevos para cada una de las especies de helmintos. Dichos viales fueron

35

directamente utilizados en los experimentos de separación magnética dentro de la fecha de duración especificada por el proveedor.

La medida del tamaño de los huevos de helminto en matrices acuosas reales implica su separación previa de la matriz acuosa siguiendo el método de Bailenger modificado (Ayres, R.M. y Mara, D.D., Analysis of wastewater for use in agriculture. A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques (1992) ISBN: 92-4-154484-8). El tamaño se analiza mediante microscopía óptica. En este caso, se empleó un microscopio óptico vertical Nikonn Eclipse Ci-S/Ci-L equipado con una cámara digital DS-Fi2 y una unidad de control DS-U3, con software para la medida y procesado de imágenes (NIS-Elements L imaging). Se mide la longitud y el ancho de los huevos de helminto y se le asigna el tamaño de la mayor de sus dimensiones (longitud).

La medida del tamaño de las partículas de magnetita se analiza mediante microscopía electrónica de barrido. En este caso, se empleó el microscopio JEOL JSM 6335F. Se utilizó un voltaje de 20 kV y se trabajó con un aumento máximo de 10.000x. Las muestras se dispersaron en un porta-muestras recubierto de carbono y un adhesivo para mantener fijas las partículas de sólido. Para determinar el tamaño medio de partícula y la distribución de tamaños de estas, se midió en las imágenes de microscopía electrónica de barrido obtenidas (utilizando el software ImageJ) el diámetro de al menos 200 partículas. El tamaño de partícula se registra como un diámetro de esfera equivalente al volumen. En concreto, se determinaron los valores estadísticos D10, D50 y D90, que son los que interceptan el 10%, 50% y 90% en volumen de las partículas acumuladas.

## 25 ***Determinación del porcentaje de hierro***

El contenido en hierro del material magnético de hierro se determinó empleando un espectrómetro de fluorescencia de rayos X por reflexión total (TXRF), concretamente el modelo S2 Picofox (Bruker), con una fuente de molibdeno. El procedimiento de preparación de la muestra consistió en su digestión en vaso abierto utilizando una disolución de ácido clorhídrico, ácido nítrico y ácido fluorhídrico en una proporción en volumen de 6:2:0,5, a 105 °C durante 1,5 h. La concentración de material en el vaso fue de 1000 mg/L y se empleó un volumen total de 10 mL. En caso de ser necesario, el material magnético de hierro fue previamente molturado hasta un tamaño inferior a 100 µm. Una vez digerida la muestra de material, se añadió en la disolución un patrón interno de galio para la posterior cuantificación. Una alícuota de 3 µL de la disolución resultante se introdujo en el espectrómetro para su

análisis, que se llevó a cabo a 50 kV y 600  $\mu$ A con un tiempo de adquisición de 500 s. La integración del pico correspondiente al hierro en el espectrograma obtenido permitió determinar el porcentaje de hierro en peso contenido en el material.

## 5 ***Difracción de rayos X***

La difracción de rayos X de polvo (DRXP) se utilizó para llevar a cabo la identificación y caracterización de las fases cristalinas presentes en el material magnético de hierro. Las muestras fueron analizadas en un difractómetro X'Pert PRO theta/theta de Panalytical con tubo de Cu (radiación  $K\alpha$ , 8,04 keV). El difractómetro dispone de un monocromador secundario de grafito y un detector de gas Xe. Se llevó a cabo un barrido theta/2theta con un intervalo en  $2\theta$  de 10 a 80°, un incremento angular de 0,04° y un tiempo de acumulación de 4s. Para la identificación de las fases cristalinas presentes en los difractogramas recogidos, se hizo uso del software High Score Plus y la base de datos cristalográfica PDF-4 Full File de la ICDD (International Centre for Diffraction Data).

### ***Determinación de la saturación magnética***

Las propiedades magnéticas del material magnético de hierro se midieron empleando un magnetómetro Quantum Design MPMS XL-5 con sensor SQUID (*superconducting quantum interference devices*). El momento magnético (M) del material magnético de hierro fue medido en función del campo de magnetización externo aplicado (H) en el intervalo de -10000 a 10000 Oe (lo que equivale de -797700 a 797700 A/m en el SI) a temperatura ambiente. El valor de saturación magnética es aquel valor de M alcanzado cuando cualquier incremento posterior en H no provoca un aumento en la magnetización del material.

### ***Ejemplo 1. Separación de huevos de helminto de la especie Ascaris de diferentes matrices acuosas bajo diferentes condiciones de operación.***

Los experimentos de separación de huevos de la especie *Ascaris* se llevaron a cabo utilizando matrices acuosas de distinta salinidad. Se empleó un mineral magnético de hierro, magnetita molturada (con un diámetro medio de partícula de 0,2  $\mu$ m en seco y distribución de tamaños de partícula según se muestra en la Figura 1), para realizar el procedimiento de separación. El carácter cristalino de la magnetita utilizada se confirmó mediante el análisis de difracción de rayos X, que también mostró que la única fase presente en el sólido es magnetita ( $Fe_3O_4$ ). El porcentaje de hierro del mineral magnético utilizado estuvo dentro del intervalo de 68 – 78%

en peso. Por su parte, el valor de saturación magnética del material se encontró en el intervalo de 70 a 90 emu/g, lo que se corresponde con  $70 \cdot 10^3$  a  $90 \cdot 10^3$  A/m en unidades del sistema internacional.

- 5 Los experimentos se realizaron en viales de vidrio donde se introdujeron la matriz acuosa, los huevos de *Ascaris spp.*, y las partículas de magnetita. Los sólidos (tanto los huevos como las partículas de magnetita) permanecieron en suspensión en las matrices acuosas. Se emplearon un conductivímetro y un pH-metro para medir el valor de salinidad y pH, respectivamente. Previo a los experimentos de separación, se llevó a cabo el
- 10 acondicionamiento de la matriz acuosa en lo que respecta a la salinidad y el valor de pH. La concentración de sal se varió en el intervalo de 0,1 a 2 g/L utilizando cloruro de sodio. El valor de pH se varió en el intervalo de 5 a 9 empleando disoluciones acuosas de hidróxido de sodio (1 M) y ácido nítrico (1 M). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.
- 15 El volumen de matriz acuosa utilizado fue de 50 mL y la cantidad de huevos de *Ascaris spp.* de 100 unidades. A esta suspensión se agregó 20 mg de partículas del mineral magnético. A continuación, se agitó mecánicamente la suspensión durante 30 s utilizando un agitador de paletas. Posteriormente, se aplicó un campo magnético generado con un imán para separar los agregados huevo/mineral magnético de hierro de la matriz acuosa. La Tabla 1 recoge los
- 20 tamaños de mineral magnético y de huevos de helminto estudiados, las cantidades de magnetita y huevos de helminto adicionadas, las condiciones de operación empleadas y el rendimiento alcanzado en la separación.

Tabla 1

25

Huevos de <i>Ascaris spp.</i>		Magnetita		pH	Salinidad (g/L NaCl)	Rendimiento de la separación (%)
Tamaño (µm)	Cantidad (número de huevos)	Tamaño (µm)	Cantidad (mg)			
75	100	0,2	20	5	0,1	≥95,0
					2	≥95,0
				7	0,1	≥95,0
					2	≥95,0

				9	0,1	≥95,0
					2	≥95,0

La Figura 2 muestra la imagen de microscopía óptica de los huevos de la especie *Ascaris* en la matriz de agua desionizada (2.A) y la imagen de microscopía electrónica de barrido de los agregados de huevos de la especie *Ascaris* y la magnetita una vez separados de la matriz de agua desionizada (2.B).

La separación de los huevos de *Ascaris spp.* fue muy eficaz, lográndose rendimientos de recuperación superiores al 95,0%. Es importante destacar que no se observaron diferencias en los rendimientos de separación de los huevos de *Ascaris spp.* cuando se varió el pH o la concentración de sal de la matriz acuosa.

La lixiviación de hierro durante los experimentos de separación fue prácticamente despreciable (<0,1 mg/L) con independencia de la composición de la matriz acuosa (valor de pH o concentración de sal).

15

**Ejemplo 2. Separación de huevos de helminto de la especie *Trichuris* de diferentes matrices acuosas bajo diferentes condiciones de operación.**

Los experimentos de separación de huevos de la especie *Trichuris* se llevaron a cabo utilizando matrices acuosas de distinta salinidad. Se empleó un mineral magnético de hierro, magnetita molturada (con un diámetro medio de partícula de 0,2 µm y distribución de tamaños de partícula según se muestra en la Figura 1), para realizar el procedimiento de separación. El carácter cristalino de la magnetita utilizada se confirmó mediante el análisis de difracción de rayos X, que también mostró que la única fase presente en el sólido es magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). El porcentaje de hierro del mineral magnético utilizado estuvo dentro del intervalo de 68 – 78% en peso. Por su parte, el valor de saturación magnética del material se encontró en el intervalo de 70 a 90 emu/g, lo que se corresponde con 70·10<sup>3</sup> a 90·10<sup>3</sup> A/m en unidades del sistema internacional.

Los experimentos se realizaron en viales de vidrio donde se introdujeron la matriz acuosa, los huevos de *Trichuris spp.*, y las partículas de magnetita. Los sólidos (tanto los huevos como las partículas de magnetita) permanecieron en suspensión en las matrices acuosas. Se emplearon un conductivímetro y un pH-metro para medir el valor de salinidad y pH, respectivamente. Previo a los experimentos de separación, se llevó a cabo el

acondicionamiento de la matriz acuosa en lo que respecta a la salinidad y el valor de pH. La concentración de sal se varió en el intervalo de 0,1 a 2 g/L utilizando cloruro de sodio. El valor de pH se varió en el intervalo de 5 a 9 empleando disoluciones acuosas de hidróxido de sodio (1 M) y ácido nítrico (1 M). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5

El volumen de matriz acuosa utilizado fue de 50 mL y la cantidad de huevos de *Trichuris spp.* de 30 unidades. A esta suspensión se agregó 20 mg de partículas del mineral magnético. A continuación, se agitó mecánicamente la suspensión durante 30 s utilizando un agitador de paletas. Posteriormente, se aplicó un campo magnético generado con un imán para separar los agregados huevo/mineral magnético de hierro de la matriz acuosa. La Tabla 2 recoge los tamaños de mineral magnético y de huevos de helminto estudiados, las cantidades de magnetita y huevos de helminto adicionadas, las condiciones de operación empleadas y el rendimiento alcanzado en la separación.

10 15 Tabla 2

Huevos de <i>Trichuris spp.</i>		Magnetita		pH	Salinidad (g/L NaCl)	Rendimiento de la separación (%)
Tamaño (µm)	Cantidad (número de huevos)	Tamaño (µm)	Cantidad (mg)			
58	30	0,2	20	5	0,1	≥95,0
					2	≥95,0
				7	0,1	≥95,0
					2	≥95,0
				9	0,1	≥95,0
					2	≥95,0

La Figura 3 muestra la imagen de microscopía óptica de los huevos de la especie *Trichuris* en la matriz de agua desionizada (3.A) y la imagen de microscopía electrónica de barrido de los agregados de huevos de la especie *Trichuris* y la magnetita una vez separados de la matriz de agua desionizada (3.B).

La separación de los huevos de *Trichuris spp.* fue muy eficaz, lográndose rendimientos de recuperación superiores al 95,0%. Es importante destacar que no se observaron diferencias

en los rendimientos de separación de los huevos de *Trichuris spp.* cuando se varió el pH o la concentración de sal de la matriz acuosa.

La lixiviación de hierro durante los experimentos de separación fue prácticamente despreciable (<0,1 mg/L) con independencia de la composición de la matriz acuosa (valor de pH o concentración de sal).

**Ejemplo 3. Separación de huevos de helminto de la especie *Taenia* de diferentes matrices acuosas bajo diferentes condiciones de operación.**

10

Los experimentos de separación de huevos de la especie *Taenia* se llevaron a cabo utilizando matrices acuosas de distinta salinidad. Se empleó un mineral magnético de hierro, magnetita molturada (con un diámetro medio de partícula de 0,2  $\mu\text{m}$  y distribución de tamaños de partícula según se muestra en la Figura 1), para realizar el procedimiento de separación. El carácter cristalino de la magnetita utilizada se confirmó mediante el análisis de difracción de rayos X, que también mostró que la única fase presente en el sólido es magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). El porcentaje de hierro del mineral magnético utilizado estuvo dentro del intervalo de 68 – 78% en peso. Por su parte, el valor de saturación magnética del material se encontró en el intervalo de 70 a 90 emu/g, lo que se corresponde con  $70 \cdot 10^3$  a  $90 \cdot 10^3$  A/m en unidades del sistema internacional.

20

Los experimentos se realizaron en viales de vidrio donde se introdujeron la matriz acuosa, los huevos de *Taenia spp.*, y las partículas de magnetita. Los sólidos (tanto los huevos como las partículas de magnetita) permanecieron en suspensión en las matrices acuosas. Se emplearon un conductivímetro y un pH-metro para medir el valor de salinidad y pH, respectivamente. Previo a los experimentos de separación, se llevó a cabo el acondicionamiento de la matriz acuosa en lo que respecta a la salinidad y el valor de pH. La concentración de sal se varió en el intervalo de 0,1 a 2 g/L utilizando cloruro de sodio. El valor de pH se varió en el intervalo de 5 a 9 empleando disoluciones acuosas de hidróxido de sodio (1 M) y ácido nítrico (1 M). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

30

El volumen de matriz acuosa utilizado fue de 50 mL y la cantidad de huevos de *Taenia spp.* de 100 unidades. A esta suspensión se agregó 20 mg de partículas del mineral magnético. A continuación, se agitó mecánicamente la suspensión durante 30 s utilizando un agitador de paletas. Posteriormente, se aplicó un campo magnético generado con un imán para separar los agregados huevo/mineral magnético de hierro de la matriz acuosa. La Tabla 3 recoge los

35

tamaños de mineral magnético y de huevos de helminto estudiados, las cantidades de magnetita y huevos de helminto adicionadas, las condiciones de operación empleadas y el rendimiento alcanzado en la separación.

5 Tabla 3

Huevos de <i>Taenia</i> spp.		Magnetita		pH	Salinidad (g/L NaCl)	Rendimiento de la separación (%)
Tamaño (µm)	Cantidad (número de huevos)	Tamaño (µm)	Cantidad (mg)			
40	100	0,2	20	5	0,1	≥95,0
					2	≥95,0
				7	0,1	≥95,0
					2	≥95,0
				9	0,1	≥95,0
					2	≥95,0

La Figura 4 muestra la imagen de microscopía óptica de los huevos de la especie *Taenia* en la matriz de agua desionizada (4.A) y la imagen de microscopía electrónica de barrido de los agregados de huevos de la especie *Taenia* y la magnetita una vez separados de la matriz de agua desionizada (4.B).

La separación de los huevos de *Taenia* spp. fue muy eficaz, lográndose rendimientos de recuperación superiores al 95,0%. Es importante destacar que no se observaron diferencias en los rendimientos de separación de los huevos de *Taenia* spp. cuando se varió el pH o la concentración de sal de la matriz acuosa.

La lixiviación de hierro durante los experimentos de separación fue prácticamente despreciable (<0,1 mg/L) con independencia de la composición de la matriz acuosa (valor de pH o concentración de sal).

**Ejemplo 4. Separación de una mezcla de huevos de helminto conteniendo *Ascaris* spp., *Trichuris* spp. y *Taenia* spp. de diferentes matrices acuosas.**

Los experimentos de separación de una mezcla de huevos conteniendo *Ascaris spp.*, *Trichuris spp.* y *Taenia spp.* se llevaron a cabo utilizando matrices acuosas de distinta salinidad. Se empleó un mineral magnético de hierro, magnetita molturada (con un diámetro medio de partícula de 0,2  $\mu\text{m}$  y distribución de tamaños de partícula según se muestra en la Figura 1), para realizar el procedimiento de separación. El carácter cristalino de la magnetita utilizada se confirmó mediante el análisis de difracción de rayos X, que también mostró que la única fase presente en el sólido es magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). El porcentaje de hierro del mineral magnético utilizado estuvo dentro del intervalo de 68 – 78% en peso. Por su parte, el valor de saturación magnética del material se encontró en el intervalo de 70 a 90 emu/g, lo que se corresponde con  $70 \cdot 10^3$  a  $90 \cdot 10^3$  A/m en unidades del sistema internacional.

Los experimentos se realizaron en viales de vidrio donde se introdujeron la matriz acuosa, los huevos de *Ascaris spp.*, *Trichuris spp.*, *Taenia spp.*, y las partículas de magnetita. Los sólidos (tanto los huevos como las partículas de magnetita) permanecieron en suspensión en las matrices acuosas. Se emplearon un conductivímetro y un pH-metro para medir el valor de salinidad y pH, respectivamente. Previo a los experimentos de separación, se llevó a cabo el acondicionamiento de la matriz acuosa en lo que respecta a la salinidad y el valor de pH. La concentración de sal se varió en el intervalo de 0,1 a 2 g/L utilizando cloruro de sodio. El valor de pH se varió en el intervalo de 5 a 9 empleando disoluciones acuosas de hidróxido de sodio (1 M) y ácido nítrico (1 M). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

El volumen de matriz acuosa utilizado fue de 100 mL y una cantidad de 100 huevos de las especies *Ascaris* y *Taenia* y de 30 huevos de la especie *Trichuris*. A esta suspensión se agregó 40 mg de partículas del mineral magnético. A continuación, se agitó mecánicamente la suspensión durante 30 s utilizando un agitador de paletas. Posteriormente, se aplicó un campo magnético generado con un imán para separar los agregados huevo/mineral magnético de hierro de la matriz acuosa. La Tabla 4 recoge los tamaños de mineral magnético y de huevos de helminto estudiados, las cantidades de magnetita y huevos de helminto adicionadas, las condiciones de operación empleadas y el rendimiento alcanzado en la separación.

Tabla 4

Huevos de <i>Ascaris spp.</i> , <i>Trichuris spp.</i> y <i>Taenia spp.</i>	Magnetita	Salinidad (g/L NaCl)	pH	Rendimiento de la separación (%)
--	-----------	----------------------	----	----------------------------------

Tamaño (µm)	Cantidad (número de huevos)	Tamaño (µm)	Cantidad (mg)			
40-75	230 (100 de <i>Ascaris</i> spp. y <i>Taenia</i> spp., y 30 de <i>Trichuris</i> spp.)	0,2	40	0,1	5	≥95,0
				2		≥95,0
				0,1	7	≥95,0
				2		≥95,0
				0,1	9	≥95,0
				2		≥95,0

La separación de los huevos de helminto de las tres especies estudiadas (*Ascaris*, *Trichuris* y *Taenia*) fue muy eficaz, lográndose rendimientos de recuperación superiores al 95,0%. Es importante destacar que no se observaron diferencias en los rendimientos de separación de los huevos de helminto cuando se varió el pH o la concentración de sal de la matriz acuosa.

La lixiviación de hierro durante los experimentos de separación fue prácticamente despreciable (<0,1 mg/L) con independencia de la composición de la matriz acuosa (valor de pH o concentración de sal).

10

**Ejemplo 5. Separación de huevos de helminto de la especie *Ascaris* de matrices acuosas reales provenientes de una EDAR.**

Los experimentos de separación de huevos de la especie *Ascaris* se llevaron a cabo utilizando matrices acuosas reales (agua regenerada) provenientes de una EDAR (efluente de tratamiento terciario). Se utilizaron dos tipos de aguas regeneradas. Ambas fueron aguas depuradas sometidas a dos tipos de tratamiento para su regeneración: radiación ultravioleta y radiación ultravioleta combinada con ultrafiltración. Se empleó un mineral magnético de hierro, magnetita molturada (con un diámetro medio de partícula de 0,2 µm y distribución de tamaños de partícula según se muestra en la Figura 1), para realizar el procedimiento de separación. El carácter cristalino de la magnetita utilizada se confirmó mediante el análisis de difracción de rayos X, que también mostró que la única fase presente en el sólido es magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). El porcentaje de hierro del mineral magnético utilizado estuvo dentro del intervalo de

20

68 – 78% en peso. Por su parte, el valor de saturación magnética del material se encontró en el intervalo de 70 a 90 emu/g, lo que se corresponde con  $70 \cdot 10^3$  a  $90 \cdot 10^3$  A/m en unidades del sistema internacional.

- 5 Los experimentos se realizaron en viales de vidrio donde se introdujeron la matriz acuosa, los huevos de *Ascaris spp.*, y las partículas de magnetita. Los sólidos (tanto los huevos como las partículas de magnetita) permanecieron en suspensión en las matrices acuosas. Se emplearon un conductivímetro, un pH-metro y un analizador de carbono orgánico total (TOC) para medir el valor de salinidad, pH y TOC, respectivamente. Previo a los experimentos de
- 10 separación, se llevó a cabo el acondicionamiento de la matriz acuosa en lo que respecta al valor de pH. El valor de pH se varió en el intervalo de 5 a 9 empleando disoluciones acuosas de hidróxido de sodio (1 M) y ácido nítrico (1 M). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.
- 15 El volumen de matriz acuosa utilizado fue de 1 L y la cantidad de huevos de *Ascaris spp.* de 100 unidades. A esta suspensión se agregó 2 g de partículas del mineral magnético. A continuación, se agitó mecánicamente la suspensión durante 30 s utilizando un agitador de paletas. Posteriormente, se aplicó un campo magnético generado con un imán para separar los agregados huevo/mineral magnético de hierro de la matriz acuosa. La Tabla 5 recoge los
- 20 tamaños de mineral magnético y de huevos de helminto estudiados, las cantidades de magnetita y huevos de helminto adicionadas, las condiciones de operación empleadas y el rendimiento alcanzado en la separación.

Tabla 5

25

Efluente EDAR (salida terciario)	Huevos de <i>Ascaris spp.</i>		Magnetita		pH	Conductividad ( $\mu$ S)	TOC (mg/L)
	Tamaño ( $\mu$ m)	Cantidad (número de huevos)	Tamaño ( $\mu$ m)	Cantidad (g)			
1 (Radiación ultravioleta)	58	100	0,2	2	5	1250	9,0
					7		
					9		

2 (Radiación ultravioleta y ultrafiltración)					5	1200	7,5
					7		
					9		

La separación de los huevos de *Ascaris spp.* fue muy eficaz, lográndose rendimientos de recuperación superiores al 95,0% en todos los casos. Es importante destacar que no se observaron diferencias en los rendimientos de separación de los huevos de *Ascaris spp.* cuando se varió la composición de la matriz acuosa.

La lixiviación de hierro durante los experimentos de separación fue prácticamente despreciable (<0,1 mg/L) con independencia de la composición de la matriz acuosa (valor de pH, conductividad y concentración de carbono orgánico).

10

**Ejemplo 6. Efecto de la presencia de otros sólidos en suspensión presentes en la matriz acuosa en la separación de huevos de helminto de la especie *Ascaris*.**

Los experimentos de separación de huevos de la especie *Ascaris* se llevaron a cabo utilizando matrices acuosas en las que se adicionaron sólidos insolubles de similar tamaño a los huevos de helminto pero de distinta naturaleza, inorgánica y orgánica. Se empleó un mineral magnético de hierro, magnetita molturada (con un diámetro medio de partícula de 0,2  $\mu\text{m}$  y distribución de tamaños de partícula según se muestra en la Figura 1), para realizar el procedimiento de separación. El carácter cristalino de la magnetita utilizada se confirmó mediante el análisis de difracción de rayos X, que también mostró que la única fase presente en el sólido es magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). El porcentaje de hierro del mineral magnético utilizado estuvo dentro del intervalo de 68 – 78% en peso. Por su parte, el valor de saturación magnética del material se encontró en el intervalo de 70 a 90 emu/g, lo que se corresponde con  $70 \cdot 10^3$  a  $90 \cdot 10^3$  A/m en unidades del sistema internacional.

25

Los experimentos se realizaron en viales de vidrio donde se introdujeron la matriz acuosa, los huevos de *Ascaris spp.*, los sólidos insolubles de distinta naturaleza, y las partículas de magnetita. Los sólidos (tanto los huevos como los sólidos insolubles de distinta naturaleza y las partículas de magnetita) permanecieron en suspensión en las matrices acuosas. Se emplearon un conductivímetro y un pH-metro para medir el valor de salinidad y pH, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron con una matriz acuosa con una

30

concentración de sal (cloruro de sodio) de 0,1 g/L y un valor de pH 7. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

El volumen de matriz acuosa utilizado fue de 50 mL y la cantidad de huevos de *Ascaris spp.* de 100 unidades. A dicha suspensión se adicionó 10 mg de sólidos insolubles de tamaño similar a los huevos de *Ascaris* (todos los sólidos fueron tamizados en un intervalo de tamaño de 20 a 80  $\mu\text{m}$  utilizando tamices con dichos diámetros de luz de malla) y 20 mg de partículas del mineral magnético. La naturaleza de los sólidos insolubles adicionados se varió utilizando sólidos de naturaleza inorgánica (alúmina, bentonita, polvo de vidrio) y de naturaleza orgánica (azúcar, harina, exoesqueleto de crustáceo, concha de bivalvo). A continuación, se agitó mecánicamente la suspensión durante 30 s utilizando un agitador de paletas. Posteriormente, se aplicó un campo magnético generado con un imán para separar los agregados huevo/mineral magnético de hierro de la matriz acuosa. La Tabla 6 recoge los tamaños de mineral magnético y de huevos de helminto estudiados, las cantidades de magnetita y huevos de helminto adicionadas, la naturaleza y las cantidades de sólidos en suspensión adicionadas y el rendimiento alcanzado en la separación, tanto en lo que respecta a la separación de los huevos de helminto como en lo que respecta a la separación de sólidos en suspensión.

Tabla 6

20

Huevos de <i>Ascaris spp.</i>		Magnetita		Sólidos en suspensión		Rendimiento de la separación (%)	
Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	Cantidad (número de huevos)	Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	Cantidad (mg)	Naturaleza	Cantidad (mg)	Huevos de <i>Ascaris spp.</i>	Sólidos en suspensión
75	100	0,2	20	Alúmina	20	$\geq 95,0$	45
				Bentonita		$\geq 95,0$	40
				Polvo de vidrio		$\geq 95,0$	40
				Azúcar		$\geq 95,0$	19
				Harina		$\geq 95,0$	70
				Exoesqueleto de crustáceo		$\geq 95,0$	$\geq 95,0$

La separación de los huevos de *Ascaris spp.* fue muy eficaz, lográndose rendimientos de recuperación superiores al 95,0%. Es importante destacar que no se observaron diferencias en los rendimientos de separación de los huevos de *Ascaris spp.* debido a la presencia de otros sólidos en suspensión, ya sean de naturaleza inorgánica u orgánica, en la matriz acuosa.

5 Si bien, los rendimientos en la separación de dichos sólidos sí difirieron bastante en función de su naturaleza. Por regla general, los sólidos inorgánicos fueron separados de la matriz acuosa con rendimientos bastante bajos, inferiores siempre al 50%. Por el contrario, en el caso de los sólidos de naturaleza orgánica los resultados fueron más dispares. Así, algunos como el azúcar se separaron con rendimientos muy bajos mientras que el exoesqueleto de  
10 crustáceo se separó con un rendimiento similar al de los huevos de helminto. Estos resultados ponen de nuevo de manifiesto lo inesperado de la separación de los huevos de helminto del agua por su interacción con la magnetita.

La lixiviación de hierro durante los experimentos de separación fue prácticamente  
15 despreciable (<0,1 mg/L) con independencia de los sólidos en suspensión adicionados a la matriz acuosa.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la separación de huevos de helminto de una matriz de agua depurada o regenerada que comprende huevos de helminto, comprendiendo el procedimiento:
  - 5 a) proveer una matriz de agua depurada o regenerada que comprende huevos de helminto,
  - b) añadir partículas de material magnético de hierro a la matriz de agua depurada o regenerada provista en la etapa a) para formar agregados de los huevos de helminto con las partículas del material magnético de hierro, y
  - 10 c) separar los agregados de los huevos de helminto con las partículas del material magnético de hierro de la mezcla obtenida en la etapa b) mediante aplicación de un campo magnético.
  
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde el material magnético de hierro  
15 comprende una especie de hierro seleccionada del grupo que consiste en Fe(II), Fe(III), Fe metálico y mezcla de los mismos.
  
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el material magnético de hierro es magnetita.  
20
  
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el diámetro promedio de las partículas de mineral magnético de hierro está comprendido entre 0,05 y 10  $\mu\text{m}$ .
  
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el peso de partículas de material magnético de hierro que se añade a la matriz de agua depurada o regenerada en la etapa b) es de 10 mg a 100 g de partículas de material magnético de hierro por cada litro de matriz de agua depurada o regenerada.
  
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en donde el peso de partículas de material magnético de hierro que se añade a la matriz de agua depurada o regenerada en la etapa b) es de 10 mg a 10 g de partículas de material magnético por cada litro de matriz de agua depurada o regenerada.
  
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el diámetro promedio de los huevos de helminto se encuentra en el intervalo de 10 a 100  $\mu\text{m}$ .

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde los huevos de helminto se seleccionan del grupo que consiste en *Taenia spp.*, *Ascaris spp.* y *Trichuris spp.* y mezclas de los mismos.

5

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la adición de las partículas de material magnético de hierro a la matriz de agua depurada o regenerada que comprende huevos de helminto de la etapa b) se realiza de manera discontinua o de manera continua.

10

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la mezcla obtenida en la etapa b) se somete a agitación antes de realizar la etapa c), preferiblemente en donde la agitación es de tipo mecánico o magnético, más preferiblemente de tipo mecánico.

15

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde se acondiciona el pH de la matriz de agua depurada o regenerada que comprende huevos de helminto de la etapa a) antes de realizar la etapa b) de modo que el pH se encuentre en el intervalo de 3 a 10, preferiblemente de modo que el pH se encuentre en el intervalo de 5 a 9.

20

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la separación de los agregados de los huevos de helminto con las partículas del material magnético de hierro de la matriz de agua depurada o regenerada de la etapa c) se realiza utilizando imanes o electroimanes.

25

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde las partículas del material magnético de hierro separados en la etapa c) se recuperan para su reutilización, preferiblemente mediante sedimentación.

30

14. Procedimiento de cuantificación de huevos de helminto en una matriz de agua depurada o regenerada que comprende huevos de helminto, comprendiendo el procedimiento:

- d) realizar las etapas a)-c) del procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y
- e) cuantificar los huevos de helminto separados en la etapa d).

35

15. Procedimiento de identificación de huevos de helminto en una matriz de agua depurada o regenerada que comprende huevos de helminto, comprendiendo el procedimiento:

- f) realizar las etapas a)-c) del procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13,
- g) identificar los huevos de helminto obtenidos en la etapa f).

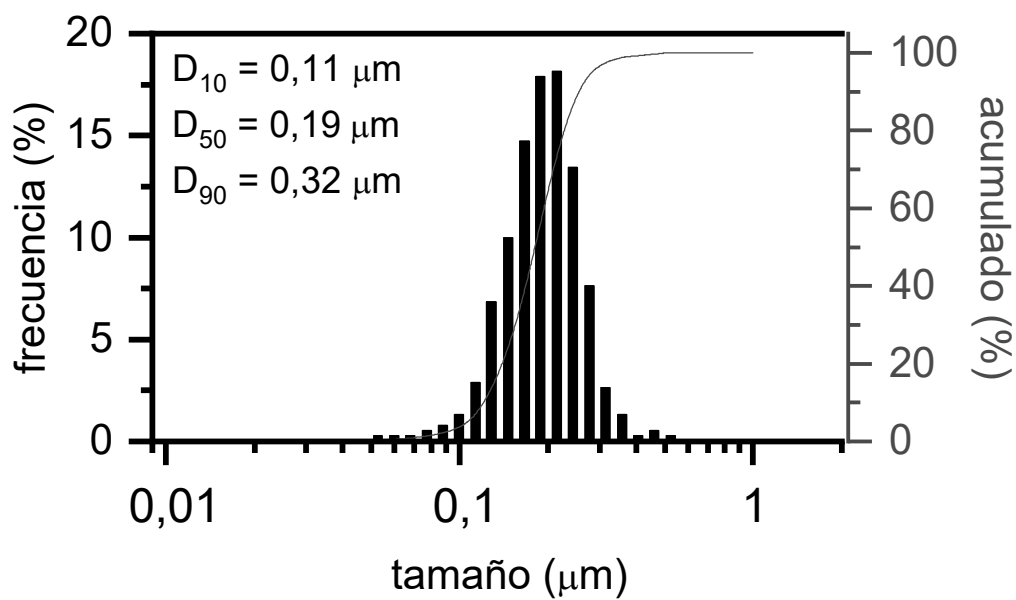


FIG. 1

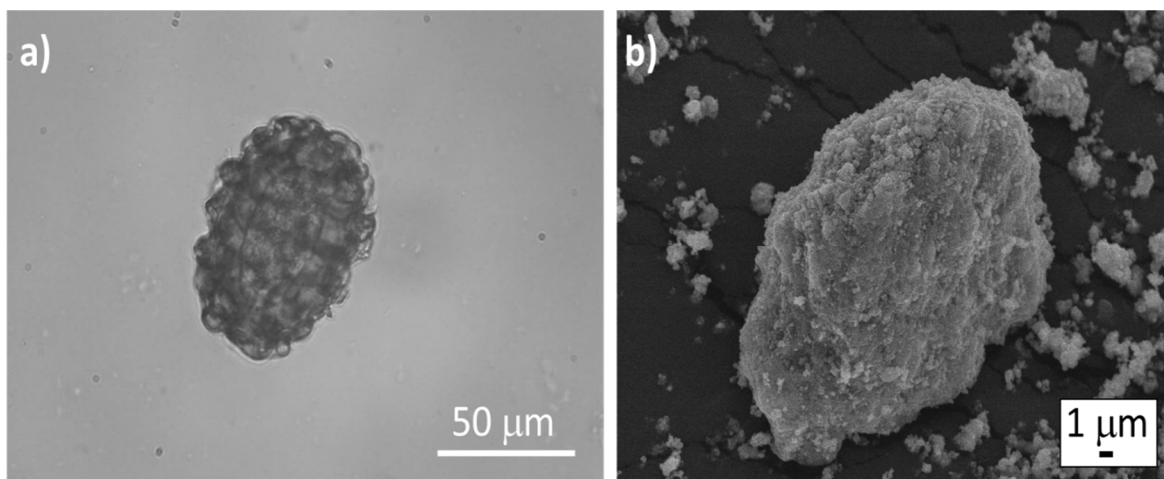


FIG. 2

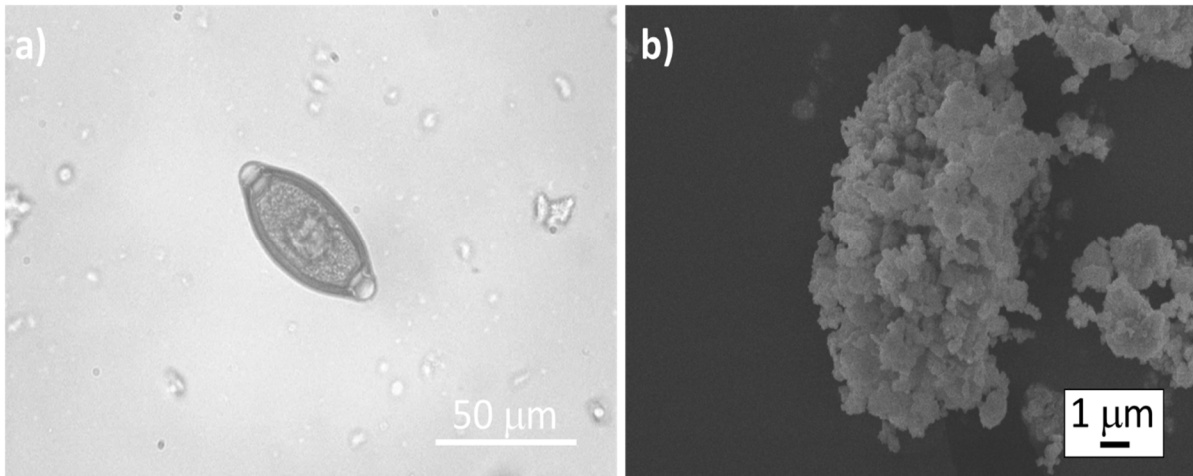


FIG. 3

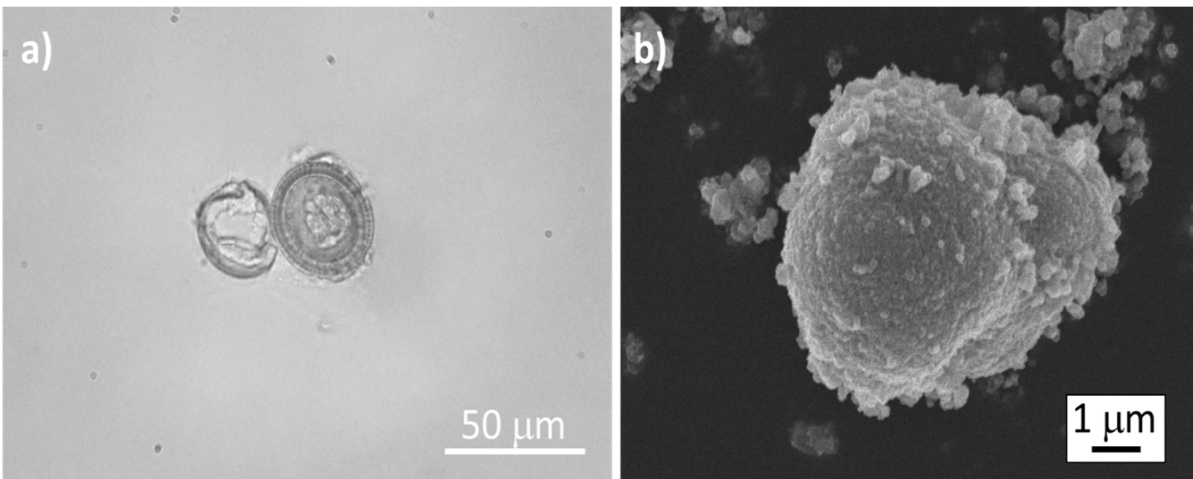


FIG. 4