

REYES & REYES

A B O G A D O S

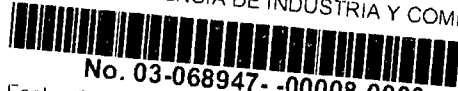
Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E.

S.

1 de 102
88
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-068947-00008-0000

Fecha: 2010-03-23 16:20:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve. 1 REGDEPOSITO
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 102

Ref. Expediente 03-68947

Solicitud de Patente de Invención

Título solicitado: "Composición alcohólica sinérgica a base de Aceite de Pino y Benzoato de Bencilo para eliminar ácaros y sus alérgenos"

Trámite: Recurso de Reposición

JOSÉ LUIS REYES VILLAMIZAR, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado como aparece al pie de la firma, reconocido apoderado de la sociedad solicitante PROCAPS S.A. en el asunto de la referencia, de manera respetuosa, y estando dentro de los términos de ley, presento recurso de reposición contra la Resolución 9140 19/02/2010, notificada por edicto desfijado el 15/03/2010, por medio de la cual se negó el privilegio de patente de invención a la creación indicada en la referencia. Lo anterior, con el propósito de que su Despacho se sirva dar curso a la siguiente

I. PETICIÓN

Ruego al Señor Superintendente reponer y revocar íntegramente la Resolución 9140 de 19/02/2010, y emitir otra que, en su reemplazo, conceda en todas sus reivindicaciones el privilegio de patente de invención solicitado para la creación indicada en la referencia. De conformidad con el artículo 59 del C.C.A., solicito expresamente que la decisión que ponga fin a esta actuación resuelva todas las cuestiones que hayan sido planteadas a lo largo del trámite, y todas aquellas que aparezcan con motivo del presente recurso, así no hubiesen sido consideradas con anterioridad.

II. MOTIVOS DE INCONFORMIDAD Y FUNDAMENTOS DEL RECURSO

Como se demostrará a lo largo del presente memorial, la resolución impugnada, además de haberse limitado a repetir mayormente los argumentos expuestos en el examen de patentabilidad (Requerimiento de artículo 45 de la decisión 486 de 2000), ha dedicado tan solo algunas líneas para *valorar* la respuesta dada a dicha acción oficial, sin referirse al fondo del capítulo reivindicatorio sometido a su

consideración, falló en evaluar apropiadamente la importancia y alcance del objeto reivindicado, el cual, como se verá, cumple con los requisitos de patentabilidad exigidos por la citada norma andina.

1. LA FORMULACIÓN REVELADA EN D1 NO INCLUYE ACEITE DE PINO Y POR ENDE, CARECE DE RELEVANCIA PARA AFECTAR EL NIVEL INVENTIVO DE LA COMPOSICIÓN SINÉRGICA REIVINDICADA

En primer término, afirma el Despacho en la Resolución N° 9140, que el Nivel inventivo de la presente solicitud se encuentra afectado por lo revelado en la anterioridad D1 EP 0017315. En dicha Resolución se indica que *"en el presente caso, el objeto carece de nivel inventivo porque a los ojos de un experto medio en la materia la información obtenida a partir de la anterioridad citada le sugiere la composición reivindicada"*, para luego señalar, adicionalmente, que *"los componentes esenciales de la solicitud, tales como el aceite esencial y el benzoato de bencilo, ya se encontraban divulgados por la anterioridad mencionada. Otros compuestos adicionales tales como propelente y solventes también se encuentran presentes en la composición divulgada en la anterioridad, los cuales son frecuentemente utilizados en soluciones tipo spray. Por tal motivo, tal como se encuentra presentada la solicitud, la composición es posible derivarla del estado de la técnica."*

En lo que se refiere a la valoración de los requisitos de patentabilidad, en particular a la supuesta carencia de Nivel Inventivo de la solicitud por obra de la anterioridad D1 citada por el examinador, de manera respetuosa manifiesto que no comparto la tesis mencionada, pues considero que la materia reivindicada no se deriva de manera evidente de dicho arte anterior, ni resulta obvia para una persona medianamente versada en la materia.

En efecto, como se verá en la tabla comparativa que se incluye enseguida, una comparación *grosso modo* de las composiciones planteadas tanto en la solicitud colombiana 03-068-947 y la EP 0 017315 permite advertir las evidentes diferencias existentes entre una y otra. Veamos:



2. 40

CO 03-068-947	EP 0 017315
COMPONENTES	
2. ACEITE DE PINO (principio activo 1%-5%)	2. ÉSTER DE ÁCIDO GRASO ¹
1. BENZOATO DE BENCILO entre 1 y 15% (principio activo)	1. BENZOATO DE BENCILO entre 5 y 100%; 5 y 50%; 10 y 25% (principio activo)
3. SOLVENTE ALCOHÓLICO (etanol 96° entre 60 y 80%)	3. COSOLVENTE (Tetracloruro de carbono o cloroformo)
4. DEODORIZANTE	4. PRESERVATIVO ANTIFÚNGICO HIDROXIBENZOATO
5. ODORIZANTE	5. ANTIOXIDANTES
6. PROPELENTE	6. PROPELENTE
7.COMPOSICIÓN ALCOHÓLICA	7.COMPOSICIÓN NO ACUOSA

Como se observa, tal vez el único elemento relevante en común entre los dos documentos es la presencia de Benzoato de Bencilo; más específicamente, vemos que la solicitud en curso tiene como principios activos aceite de pino y benzoato de bencilo, los cuales tienen demostrada actividad acaricida, y efecto sinérgico recíproco, debidamente sustentados en el capítulo descriptivo, al paso que D1 tan sólo contiene Benzoato de Bencilo como principio activo, y ésteres de ácido graso que ayudan, simplemente, a “vehiculizar” dicho componente, SIN QUE EN PARTE ALGUNA SE HAGA REFERENCIA O SE PERMITA INFERIR LA PRESENCIA DE ACEITE DE PINO, lo que se constituye una enorme diferencia entre los documentos comparados, y haga que la cita de D1 no resulte relevante para desvirtuar la materia reivindicada en la solicitud 03-68947.

2. EL ACEITE ESENCIAL DE PINO EMPLEADO EN LA SOLICITUD DE PATENTE ES QUÍMICAMENTE DIFERENTE A LOS ACEITES NO VOLÁTILES A QUE HACE REFERENCIA D1

Como ya se ha mencionado en otros documentos adjuntados al expediente, el componente esencial de la invención reivindicada es el aceite esencial de pino, el cual, además, es químicamente diferente a los aceites no volátiles que hace referencia la patente europea D1; en efecto, según la Farmacopea Británica y la Farmacopea de Estados Unidos, el aceite esencial de pino tiene las siguientes características fisicoquímicas que lo diferencian de los ésteres de ácidos grasos utilizados en la formulación de D1, veamos:

¹ EP 0017315, pág 4: (...) “suitable fatty acid esters incluye non-volatile natural fixed oil such as soya oil, corn oil and safflower oil and also other mono, di- and poly-esters of monomeric alcohols and anhydrides thereof including glycerol, sorbitol, sorbitan and isopropyl alcohol with fatty acids including myristic, palmitic, stearic, oleic and linoleic acids, such as isopropyl myristate”.(...)

e Col
12
Jairo Javier
Nieto Nieto
Encargado

- a. Es obtenido de la corteza del árbol de pino por método de hidrodestilación.
- b. Es un **aceite volátil**
- c. No tiene valor calórico o alimenticio.
- d. No forma sustancias saponificables en presencia de sustancias alcalinas
- e. No deja residuos grasos después de la evaporación
- f. No sufre proceso de enranciamiento.

Por su parte los ésteres de ácidos grasos (mirístico, palmítico, esteárico y linoléico), a que se refieren en la patente D1:

- a. Son obtenidos de semillas, donde están almacenados en forma de cristales o gotas.
- b. Los aceites que los contienen, son aceites fijos es decir **no volátiles**, que dejan residuo grasoso después de la evaporación.
- c. Tienen valor calórico y alimenticio
- d. Forma sustancias saponificables en presencia de sustancias alcalinas
- e. Experimentan procesos de enranciamiento.
- f. Estos aceites no tienen una actividad farmacológica apreciable y tienen poco uso farmacológico, con algunas excepciones.

Asimismo, es importante resaltar que, los alcoholes monoterpénicos alfa-pineno y beta-pineno (principales componentes de la solicitud de patente en curso, ver capítulo descriptivo página 5) **no son derivados catabólicos de los aceites fijos (ésteres de ácidos grasos) y son estructuralmente diferentes:**

Figura 1: Aceite de Pino (Componentes principales)

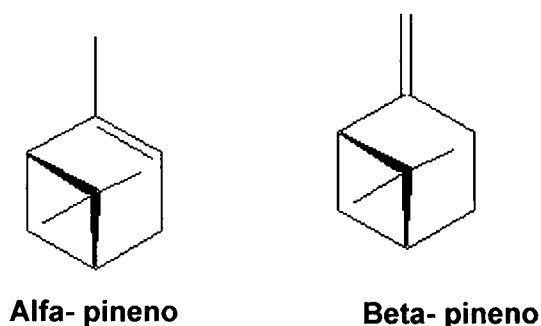
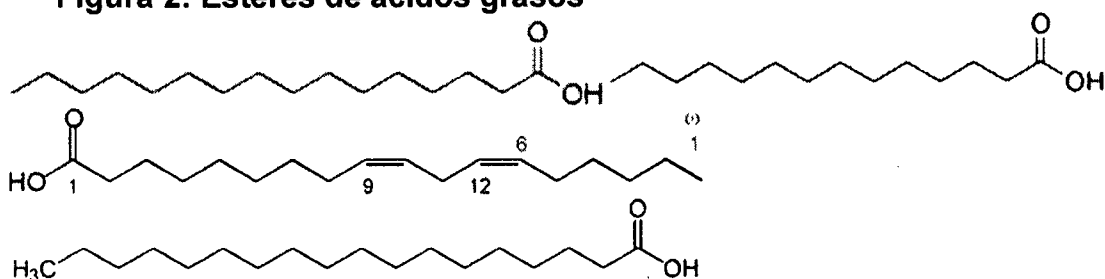


Figura 2: Esteres de ácidos grasos



Los monoterpenos alcohólicos alfa-pineno y beta-pineno, componentes principales del aceite esencial de pino y de la mezcla acaricida, son productos bioactivos con actividad acaricida; por su parte, los aceites vegetales no volátiles o los ésteres de los ácidos mirístico, palmítico, esteárico y linoléico, no se presentan como responsables de la actividad acaricida de D1, sino como adyuvantes de la formulación que facilitan la solubilización del benzoato de bencilo.

Por lo expuesto en este punto, y en tanto se ha demostrado que el aceite esencial de pino empleado en la solicitud en curso es químicamente diferente, y por ello esencialmente distinta, a la de los aceites no volátiles que hace referencia D1, deberá concluirse que la mención general de éstos en dicho documento no afecta el nivel inventivo de la materia reivindicada, pues el conocimiento de la anterioridad citada, aún en combinación con otros documentos de la ciencia disponibles para la fecha de la presentación de la solicitud, no permitiría inferir razonablemente a una persona versada en la materia, la posibilidad de emplear el aceite esencial de pino a la postre elegido en la creación que nos ocupa.

3. A LA FECHA DE PRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD, NO EXISTÍA EVIDENCIA CIENTÍFICA SOBRE EL EFECTO ACARICIDA DEL ACEITE DEL PINO EMPLEADO EN ÉSTA.

De otro lado, y contrario a lo que afirma el examinador, a la fecha de presentación de solicitud de patente en cuestión no existía referencia alguna al efecto acaricida del aceite del pino, evidencia científica reciente demuestra que el pineno alfa y beta (componentes principales del aceite de pino) tienen actividad insecticida, estructuralmente, el pineno es homólogo químico de la Octopamina una amina biogénica con actividad neuromotora lo que significa que funcionalmente, el

pineno puede unirse a receptores octapaminérgicos del insecto causando su sobre- estimulación y por tanto la muerte debido a un efecto neurotóxico.^{2,3}

Ahora bien, y si en gracia de discusión fuera posible que en la literatura se encontraran documentos que describan las propiedades plaguicidas de los aceites esenciales en especial la acción acaricida del aceite de pino, no se documenta una formulación que esté comprendida textualmente por los dos principios activos citados en la solicitud en cuestión ni donde se demuestre la sinergia de dicha combinación; los ejemplos proporcionados en la patente EP 0017315 (D1), por su parte demuestran la ausencia de aceite de pino dentro de las formulaciones, en ellos se encuentra presente el Benzoato de Bencilo y ésteres de ácidos grasos o aceites vegetales (sin acción acaricida) como vehículos apropiados para incorporar el principio activo.

En cuanto al segundo componente activo de la solicitud en cuestión, es decir, el Benzoato de Bencilo, es de conocimiento en el arte anterior y esta ampliamente divulgado en la literatura científica que dicho compuesto posee actividad para eliminar ácaros, tal es el caso de varias referencias bibliográficas incluyendo el documento D1 el cual incorporamos como referencia en nuestra solicitud (-Ver capítulo descriptivo, página 2 primera referencia bibliográfica); sin embargo y como reiteradamente lo hemos dicho, en dicha patente D1 no se demuestra que la actividad acaricida del Benzoato de Bencilo sea potenciada o se vea mejorada por la presencia de un aceite volátil como el aceite de pino y tampoco supone el empleo de alcoholes para permitir y mejorar la solubilización de los principios activos empleados.

4. D1 NO REVELA UNA FORMULACIÓN ALCOHÓLICA

Una diferencia esencial adicionalmente existente entre la solicitud en curso y D1 consiste en que aquélla revela una composición alcohólica, en la cual el aceite de pino juega un papel importante para eliminar ácaros y sus alérgenos, además, de ejercer un poder sinérgico junto con el benzoato de bencilo y generar menor irritación en mucosas.

² Price DN, Berry MS. Comparison of effects of octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut, and dorsal unpaired median neurons of cockroaches. J Insect Physiol. 2006; 52: 309-319.

³ Farooqui T. Octopamine Mediated Neuromodulation of Insect Senses. Neurochem Res. 2007; 32:1511- 1529.

En efecto, "la composición sinérgica para eliminar ácaros y sus alergenitos", a diferencia de D1, se trata de una composición alcohólica acaricida y sinérgica que permite incorporar o vehiculizar no solo el benzoato de bencilo sino el aceite de pino; dicha composición y como consta en la Reivindicación 3 posee un solvente como el etanol a 96% en una proporción entre el 60 y el 80% sobre el peso total de la formulación, lo que claramente significa que contiene un 4% restante de agua que aunque no sea declarado, hace que el vehículo de la composición reivindicada posea propiedades fisicoquímicas muy distintas al proporcionado por el vehículo del documento D1 el cual se declara como una composición NO ACUOSA.

5. D1 NO DEMUESTRA NI PERMITE INFERIR, AÚN EN COMBINACIÓN CON OTROS DOCUMENTOS, LA PRESENCIA DE UN EFECTO SINÉRGICO ENTRE EL ACEITE DE PINO Y EL BENZOATO DE BENCILO.

Cabe anotar que la conclusión en cuanto a dicho efecto sinérgico, se obtuvo luego de años de Investigación y desarrollo por parte de inventores reconocidos mundialmente, expertos en la materia en conjunto con grupos científicos de entes reconocidos por su avance en innovación, tales como la Universidad del Norte de Barranquilla, el Departamento de Investigación y Desarrollo de la sociedad solicitante, y Colciencias. Para una mejor –y necesaria- referencia del Despacho en cuanto a dicho efecto, me permito adjuntar y rogar que se tengan como prueba estudios clínicos que comprueban la eficacia de la mezcla sinérgica en cuestión, los cuales demuestran sin lugar a dudas la eficacia del aceite de pino para la desnaturalización de proteínas del ácaro, estudios cromatográficos, y estudios de toxicología del producto⁴ que no habían sido revelados en la literatura especializada, y que por supuesto, no se derivan ni pueden inferirse de la lectura de D1.

A la luz de dichos documentos, los cuales comprenden la validación de numerosos ensayos experimentales, deberá concluirse que la invención solicitada tiene como propósito específico proporcionar un producto de innovación y desarrollo tecnológico, útil como agente degradante y desnaturalizante de los epítopes alérgicos de las principales especies de ácaros *Dermatophagoides Farinae*,

⁴ Nos permitimos resaltar que cuando se inició el proyecto de elaboración de esta formulación, dicho producto recibía el nombre ALTASAC, por lo tanto todos los documentos probatorios señalan este nombre, para distinguir el proyecto.



Dermatophagoides pteronyssinus y *Blomia tropicalis*, involucrados en la fisiopatogénia del asma alérgica, y otras enfermedades de origen alérgico, que no había sido revelado anteriormente en la literatura especializada, ni podría derivarse, menos en forma evidente, de la lectura de D1.

Es del caso reiterar que dicha mezcla química (Aceite de Pino/Benzoato de Bencilo) demostró ampliamente un efecto sinérgico acaricida jamás revelado con anterioridad, y que los resultados que comprobaron este efecto biológico, anexos ahora como prueba, fueron presentados -sin publicarse- ante la Subdirección Nacional de Desarrollo e Innovación Tecnológica en el año 2001; en consecuencia, tales estudios son prueba inequívoca respecto del Nivel Inventivo presente en la solicitud de patente que motiva estas diligencias.

Del mismo modo, es importante llamar la atención del Despacho que a la fecha de culminación del proyecto y de presentación de esta solicitud, no existía en la literatura científica un modelo de evaluación molecular para demostrar el efecto desnaturalizante de los acaricidas presentes en el mercado tal como se hace en esta solicitud en trámite; también es claro que para el problema a resolver, el diseño o formulación de una solución química no solamente debe tener capacidad de matar los ácaros, sino que debe desnaturalizar las proteínas alérgicas, en razón a que estas continúan siendo capaces de producir eventos inflamatorios involucrados en fisiopatología de las enfermedades alérgicas.

Por tanto, es significativo resaltar que los resultados que se obtuvieron del desarrollo experimental de este proyecto y por ende de la composición reivindicada demuestran no solo que la misma tiene un efecto biológico acaricida sobre las tres especies mas importantes involucradas como agentes desencadenantes de las enfermedades alérgicas respiratorias y dermatológicas en el humano, sino que también las proteínas responsables de generar el daño en los tejidos y estimular la respuesta alérgica, se desnaturalizan cuando se ponen en contacto con la mezcla reivindicada; en consecuencia esta solicitud constituye el primer producto resultado de un trabajo de investigación científica desarrollado en Latinoamérica.

Lo anterior permite sencillamente concluir que la composición revelada tiene, además del impacto científico y tecnológico, un impacto social ya que garantiza y soporta su uso en el ecosistema del paciente como una medida de control de la

de o
12
no Javier
ara Neir
de o

acarofauna y un sistema de eliminación de los agentes desencadenantes de las enfermedades alérgica producidas por estos ácaros; así mismo, la composición reivindicada puede mejorar la calidad de vida al disminuir el número de crisis asmáticas, y por tanto el número de visitas a la sala de urgencia, disminuyendo probablemente los costos en el tratamiento de la enfermedad y los días de incapacidad laboral y escolar.

Por si fueran pocos los argumentos hasta el momento proporcionados e independientemente que las dos formulaciones, pese a sus diferencias esenciales, sean aptas para productos tipo spray, es importante resaltar que si bien es cierto las dos contienen propelentes, dicho componente es completamente distinto tanto en la solicitud colombiana (A-70 que es una mezcla de: etano, propano, propeno, Iso-butano, N-butano, Propadieno, Trans-2-Butano, 1-Buteno, Iso-Butileno, Neo-Pentano, Cis-2-Buteno, Iso-Pentano, N-Pentano, 1,3-Butadieno) como en la patente europea (Nitrógeno, Dióxido de Carbono, fluorocarbono).

Así las cosas, si bien algunas características del objeto reivindicado pueden haberse revelado en el arte anterior, lo cierto es que el documento citado por el señor examinador -individualmente considerado y aún en combinación con enseñanzas generales del área técnica respectiva no motivarían efectivamente a derivar en forma evidente el objeto reivindicado.

Es bien sabido que partiendo de materias conocidas pueden proponerse solicitudes novedosas e inventivas, merecedoras de protección por la vía de patente de invención, como ocurre en este caso respecto de la ingeniosa formulación reivindicada.

Teniendo en cuenta todos los argumentos expuestos en el presente recurso, muy respetuosamente consideramos que el Despacho no ha valorado en debida forma la materia reivindicada, ni cuenta con argumentos suficientes como para sostener la supuesta falta de Nivel Inventivo que supuestamente afecta la solicitud.

Por ello estimamos que en tanto se ha demostrado aquí que una persona del arte, medianamente versada en la materia técnica respectiva, no podría derivar la obtención de la misma a partir del simple conocimiento de D1, y que tampoco lo lograría combinando tal anterioridad con enseñanzas generales del arte, deberá



concluirse que no hay fundamentos para negar la patentabilidad del objeto de la presente invención, en tanto, se reitera, una persona experta en la materia, al enfrentar el problema de proporcionar una composición acaricida adecuada y eficaz con acción potenciada, no sabría cómo llegar a obtener la misma composición aquí planteada, y tampoco podría derivar que el aceite de pino, en conjunto con el Benzoato de Bencilo y un vehículo adecuado como es un solvente alcohólico, podrían tener las propiedades sinérgicas demostradas en la solicitud de patente que nos ocupa.

Por considerar respetuosamente que las características de la formulación farmacéutica reivindicada y del proceso de obtención no están reveladas ni pueden derivarse de manera obvia del documento que el señor examinador menciona en su documento, bien sean en forma individual o combinada, y habida cuenta que el reclamado efecto sinérgico de la composición ha sido debidamente documentado tanto en la descripción original como en los documentos que la reemplazan, ruego tener en cuenta los argumentos aquí expuestos y proceder a conceder el privilegio de patente solicitado, en todas sus reivindicaciones.

III. PRUEBAS

De conformidad con lo dispuesto por el artículo 59 del C.C.A. y demás normas concordantes, y en tanto los documentos adjuntos se refieren a asuntos que han surgido con motivo del presente recurso, ruego que se tengan como pruebas las siguientes:

1) FICHA 082001 (Anexos 1, 2 y 3) Informes experimentales sobre la sinergia de la mezcla acaricida

2) INFORME TECNICO:

Anexo 1: Ficha técnica de los principios activos

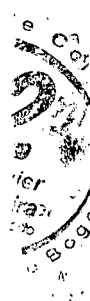
Anexo 6: Estudios de cromatografías

Anexo 7: solución patrón

Anexo 9: evaluación efecto acaricida de la mezcla

Anexo 10 y Anexo 11: estudios clínicos

3) ATLASAC (antiguo nombre proyecto mezcla acaricida): Informes



REYES & REYES

A B O G A D O S

experimentales sobre la sinergia de la mezcla acaricida

4) ATLASAC EXPERIMENTAL: Informes experimentales sobre la sinergia de la mezcla acaricida.

5) Impresión del documento titulado " Informe Técnico Final – Proyecto Análisis Inmunoquímico, Evaluación del Efecto Desnaturalizante Protéico de una Mezcla Química Acaricida", de autoría de los Dres. Eduardo Egea Bermejo y Alfredo Lagares.

Señor Superintendente,


JOSÉ LUIS REYES VILLAMIZAR

C.C. 79'152.473 de Usaquén

T.P.A 44.655 del C.S.J.

**PRESENTACIÓN PERSONAL Y RECONOCIMIENTO
EL NOTARIO CUARENTA Y DOS - ENCARGADO
DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ - COLOMBIA
CERTIFICA:**

Que este documento, dirigido a Superintendencia de Industria y Comercio
fue presentado personalmente por José Luis Reyes Villamizar
quien se identificó con la cédula de ciudadanía # 79.152.473 de Usaquén
y con la tarjeta profesional # 44.655 C.S.J.
y manifestó que reconoce expresamente su contenido y que la firma que
en él aparece es la suya.

En constancia, firma nuevamente en Bogotá, el día 23 MAR. 2010



Anexo 1

Denominación: Aceite de pino

Descripción:

Es un aceite de pino compuesto de una mezcla de alcoholes terpénicos e hidrocarbonatos terpénicos, producido a partir de terebintina vegetal a través de un proceso propio en instalaciones modernas, lo que asegura, alta calidad y características uniformes para los fines a que se destina.

Especificaciones:

Apariencia líquido claro transparente

Olor característico

Alcoholes (Terpebucis –titaus) (% por CG) 75 min

Paso Específico (20/4°C) 0,915 – 0,918

Indice de Acidez (mg KOH/g) 1,5 mas.

Indice de Refracción (20°C) 1,4778-1,4783

Unidades (%) 0,4 max.

Ponto de Fusión = vaso abierto (°C) 77-80

Fase de destilación 10% hasta 95°C

50% hasta 205°C

90% hasta 220°C

Cromatografía:

Equipos: CG 500 MASTER – DIC

Columna Carbowax 20M Chromosorb W 80:100 mesh 3m x 1'8"

Temperaturas Columna: ISO 165°C – Tf – 190°C

DIC: 240°C

25 / 13
100

Vaporizador: 220°C

Amostragem

0.1 microlitro

Gas arraste (fricciones)

Nitrógeno – 30ml/min

Almacenamiento:

- Tambores con 180 kgs. líquidos
- Granel

Principales aplicaciones:

- Desinfectantes domésticos e industriales
- Detergentes industriales
- Desinfectantes agropecuarios, veterinarios
- Tintas
- Insecticidas y fungicidas
- Perfumería

Normas de seguridad:

- Mantener los tambores fechados en lugar fresco, seco y ventilado, evitando la exposición directa a la luz solar.
- Yaserol 75°C es un producto inflamable, debiendo ser mantenido lejos del calor y de las llamas.
- Yaserol 75°C es insoluble en agua. En caso de incendio, se debe utilizar extinguidores de gas carbónico (CO₂) o químico seco, no es aconsejable el uso de agua ya que se forma de neblina.

- En caso de ingestión no provoque o vomito. Procure inmediatamente asistencia médica de Emergencia.

Anexo 2

27/15
102

Denominación:	Alcohol etílico
Sinónimos:	Etanol, Alcohol anhidro, Metil carbinol, Alcohol desnaturalizado.
Fórmula:	CH3CH2OH
Composición:	Etanol: 95.00° alcohólico
Número Interno:	
Número CAS:	64-17-5
Número UN:	1170
Clases UN:	3.2
Usos:	Disolvente para resinas, grasa, aceites, ácidos grasos, hidrocarburos, hidróxidos alcalinos. Como medio de extracción por solventes, fabricación de intermedios, derivados orgánicos, colorantes, drogas sintéticas, elastómeros, detergentes, soluciones para limpieza, revestimientos, cosméticos, anticongelante, antisépticos, medicina.

Efectos para la salud

Límites de exposición ocupacional:

TWA:	1000 ppm
STEL:	N.R.
TECHO (C)	N.R.
IPVS:	N.R.

Inhalación: Altas concentraciones del vapor pueden causar somnolencia, tos, irritación de ojos y el tracto respiratorio, dolor de cabeza y síntomas similares a la ingestión.

Ingestión: Sensación de quemadura. Actúa al principio como estimulante seguido de depresión, dolor de cabeza, visión borrosa, somnolencia e inconciencia. Grandes cantidades afectan el aparato gastrointestinal. Si es desnaturalizado con metanol, puede causar ceguera.

Piel: Resequedad.

Ojos: Irritación, enrojecimiento, dolor, sensación de quemadura.

Efectos Crónicos: A largo plazo produce efectos narcotizantes. Afecta el sistema nervioso central, irrita la piel (dermatitis) y el tracto respiratorio superior. La ingestión crónica causa cirrosis en el hígado.

Almacenamiento y manipulación.

Almacenamiento: Lugares ventilados, frescos y secos. Lejos de fuentes de calor e ignición. Separado de materiales incompatibles. Rotular los recipientes adecuadamente. Depositar en contenedores herméticamente cerrados. Los equipos eléctricos y de iluminación deben ser a prueba de explosión.

Manipulación: Usar siempre protección personal así sea corta la exposición o la actividad que realice con el producto. Mantener estrictas normas de higiene, no fumar, ni comer en el sitio de trabajo. Usar las menores cantidades posibles. Conocer en donde está el equipo para la atención de emergencias. Leer las instrucciones de la etiqueta antes de usar el producto. Rotular los recipientes adecuadamente.

Propiedades físicas y químicas

Apariencia: Líquido incoloro volátil de olor característico y agradable.

Gravedad específica (Agua = 1): 0.7893/20 °C.

Punto de Ebullición (°C): 78-79

Punto de fusión (°C): -114

Densidad relativa del Vapor (Aire = 1): 1.60

Presión de vapor (mm Hg): 44.0/20 °C

Viscosidad (cp): N.R.

pH: N.A.

Solubilidad: Soluble en agua, alcohol metílico, éter, cloroformo, acetona y benceno.

Estabilidad y reactividad

Estabilidad: Estable bajo condiciones normales.

Incompatibilidades o materiales a evitar:

Agua: NO AIRE: NO OTRAS: Reacciona violentamente con agentes oxidantes fuertes, ácido nítrico, ácido sulfúrico, nitrato de plata, nitrato mercúrico, perclorato de magnesio, cromátos, peróxidos. Reacciona ligeramente con hipoclorito de calcio, óxido de plata y amoníaco.

Información toxicológica

DL50 (oral, ratas) =7.06 g/kg.

Información ecológica

Es biodegradable. Nocivo para peces y placton a concentraciones mayores de 9000 mg/l en 24 h.

30-48
105

Toxicidad para peces:

LC50 mayor de 10 g/l.

Consideraciones de eliminación y/o disposición

Se puede realizar una incineración controlada del material una vez ha sido absorbido o se puede dejar evaporar. Considere la posibilidad de utilizar el líquido como agente de limpieza.

Información de transporte

Etiqueta roja de líquido inflamable. No transporte con sustancias explosivas, gases venenosos, sustancias que pueden experimentar combustión espontánea, sustancias comburentes, peróxidos orgánicos, radiactivas, ni sustancias con riesgo de incendio.

Información de regulación

Código Nacional de Tránsito Terrestre. Decreto 1344/70, modificado por la ley 33/86.

Artículo 48: Transportar carga sin las medidas de protección, higiene y seguridad. Artículo

49: Transportar materiales inflamables, explosivos o tóxicos al mismo tiempo que pasajeros o alimentos. Artículo 50: Transportar combustible o explosivos en forma insegura.

Suspensión de la Licencia de conducción.

Los residuos de esta sustancia están considerados en: Ministerio de Salud. Resolución 2309 de 1986, por la cual se hace necesario dictar normas especiales complementarias para la cumplida ejecución de las leyes que regulan los residuos sólidos y concretamente lo referente a residuos especiales.

31 19
106

Anexo 3

Denominación: Bencilo benzoato DAB, Ph Eur, BP, USP

Identificación de la sustancia o del preparado

Composición / información sobre los componentes

CAS-No. 120-51-4 No. Del índice CEE: 607-085-009

Peso molecular 212.25 g/mol Número CE: 204-402-9

Fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_2$ (Hill)

Fórmula molecular $C_6H_5COOCH_2C_6H_5$ (estructurada)

Identificación de peligros

Nocivo por ingestión

Manipulación y almacenamiento

Manipulación:

Almacenar protegido de disolventes

Almacenamiento:

Bien cerrado. En lugar bien ventilado. Alejado de fuentes de ignición y calor. Temperatura de almacenamiento: sin limitaciones.

Controles de exposición / protección personal

Protección personal:

Los tipos de auxiliares para protección del cuerpo deben elegirse específicamente según el puesto de trabajo en función de la concentración y cantidad de la sustancia peligrosa.

Debería aclararse con el suministrador la estabilidad de los medios protectores frente a los productos químicos.

Protección respiratoria: necesaria en presencia de vapores / aerosoles.

32/ 20
107

Protección de los ojos: precisa

Protección de las manos: precisa

Medidas de higiene particulares:

Sustituir la ropa contaminada. Lavar manos al término del trabajo.

Propiedades físicas y químicas

Estado físico: líquido

Color: Incoloro

Olor: Débilmente aromático

Valor pH: no disponible

Viscosidad dinámica (25° C) 10.9 mPa*s

Punto de fusión 21 °C

Punto de ebullición 324 °C

Punto de ignición 480 °C

Punto de destello 158 °C

Límites de explosión Bajo no disponible

 Alto no disponible

Presión de vapor (20° C) <0.1 hPa

Densidad (20° C) 1.12 g/cm³

Solubilidad en

 Agua (20° C) insoluble

 Etanol (20° C) fácilmente soluble

 Metanol (20° C) fácilmente soluble

Log P(oct): 4.00

Consideraciones relativas a la eliminación

Producto: En la unión Europea no están regulados, por el momento, los criterios homogéneos para la eliminación de residuos químicos. Aquellos productos químicos, que resultan como residuos del uso cotidiano de los mismos, tienen en general, el carácter de residuos especiales. Su eliminación en los países comunitarios se encuentra regulada por leyes y disposiciones locales. Le rogamos contacte con aquella entidad adecuada en cada caso (Administración Pública, o bien empresa especializada en la eliminación de residuos), para informarse sobre su caso particular.

Envases: Su eliminación debe realizarse de acuerdo con las disposiciones oficiales. Para los embalajes contaminados deben adoptarse las mismas medidas que para el producto contaminante. Los embalajes no contaminados se tratarán como residuos domésticos o como material reciclable.

24 22
109

Anexo 1

Denominación: Aceite de pino

Descripción:

Es un aceite de pino compuesto de una mezcla de alcoholes terpénicos e hidrocarbonatos terpénicos, producido a partir de terebintina vegetal a través de un proceso propio en instalaciones modernas, lo que asegura, alta calidad y características uniformes para los fines a que se destina.

Especificaciones:

Apariencia líquido claro transparente

Olor característico

Alcoholes (Terpebucis –titaus) (% por CG) 75 min

Paso Específico (20/4°C) 0,915 – 0,918

Indice de Acidez (mg KOH/g) 1,5 mas.

Indice de Refracción (20°C) 1,4778-1,4783

Unidades (%) 0,4 max.

Ponto de Fusión = vaso abierto (°C) 77-80

Fase de destilación 10% hasta 95°C

50% hasta 205°C

90% hasta 220°C

Cromatografía:

Equipos: CG 500 MASTER – DIC

Columna Carbowax 20M Chromosorb W 80:100 mesh 3m x 1'8"

Temperaturas Columna: ISO 165°C – Tf – 190°C

DIC: 240°C

Vaporizador: 220°C

25 / 23
110

Amostragem 0.1 microlitro

Gas arraste (fricciones) Nitrógeno – 30ml/min

Almacenamiento:

- Tambores con 180 kgs. líquidos
- Granel

Principales aplicaciones:

- Desinfectantes domésticos e industriales
- Detergentes industriales
- Desinfectantes agropecuarios, veterinarios
- Tintas
- Insecticidas y fungicidas
- Perfumería

Normas de seguridad:

- Mantener los tambores fechados en lugar fresco, seco y ventilado, evitando la exposición directa a la luz solar.
- Yaserol 75°C es un producto inflamable, debiendo ser mantenido lejos del calor y de las llamas.
- Yaserol 75°C es insoluble en agua. En caso de incendio, se debe utilizar extinguidores de gas carbónico (CO₂) o químico seco, no es aconsejable el uso de agua ya que se forma de neblina.

- En caso de ingestión no provoque o vomito. Procure inmediatamente asistencia médica de Emergencia.

41 ~~25~~
112

Anexo 6 RESULTADOS ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO LOTE PRUEBA

ATLASAC

Determinación de Benzoato de Bencilo y Análisis de Aceite de Pino en la muestra suministrada por la Universidad del Norte a Procaps.

1. Se procede a analizar Benzoato de Bencilo, aplicando el método descrito en USP XXIV pág.215, del cual se obtienen los siguientes resultados:

Muestra No.1:

Peso: 6,5903 g

Vol KOH Etanólico 0,538 N : 25 mL

Vol HCl 0,5165 N gastados en valoración: 18,4 MI

% Benzoato de Bencilo Hallado : 6,35%

Muestra No.2:

Peso: 6,2769 g

Vol KOH Etanólico 0,538 N : 25 mL

Vol HCl 0,5165 N gastados en valoración: 19,0 mL

% Benzoato de Bencilo Hallado : 6,15%

Promedio % Benzoato de Bencilo Hallado = 6,25% (1mL de KOH Etanólico 0,5N equivale a 106,1 mg de Benzoato de Bencilo).

2. Determinación de Terpenos (á y â-Pinenos) en Aceite de Pino por Cromatografía de Gas (Adjunto soportes analíticos incluyendo condiciones del método de análisis). Se procede a realizar 5 inyecciones de materia prima (tomada como Standard), y 2 inyecciones de muestra, obteniéndose los siguientes resultados:

a) Materia Prima (Standard): W = 60,7 mg è 10 cc Eter

Vol. Inyección = 1 µL

Promedio Area á-Pineno: 919466,2 (RSD: 2,65%) ; 52,7% (RSD: 2,44%)

Promedio Area â-Pineno: 304688,6 (RSD: 1,96%) ; 17,5% (RSD: 1,93%)

b) Muestra-1: W = 115,7 mg è 10 cc Eter

Vol. Inyección = 1 µL

Promedio Area á-Pineno: 1233570 (RSD: 0,91%)

Promedio Area â-Pineno: 12953,95 (RSD: 2,27%)

c) Muestra-2: W = 111,2 mg è 10 cc Eter

Vol. Inyección = 1 µL

Promedio Área á-Pineno: 1164930 (RSD: 0,35%)

Promedio Área â-Pineno: 13006,85 (RSD: 1,11%)

d) Muestra-3: W = 107,3 mg è 10 cc Éter

Vol. Inyección = 1 µL

Promedio Área á-Pineno: 1137660 (RSD: 2,45%)

Promedio Área â-Pineno: 12013,3 (RSD: 4,8%)

Cuantificación:

$\% \text{ á-Pineno} = \frac{\text{Área Muestra(á-Pineno)} \times W(\text{std}) \times \text{Concentración(á-Pineno)}}{\text{Area Standard (á-Pineno)} \times W(\text{muestra})} \times 100$

$\% \text{ â-Pineno} = \frac{\text{Área Muestra(â-Pineno)} \times W(\text{std}) \times \text{Concentración(â-Pineno)}}{\text{Area Standard (â-Pineno)} \times W(\text{muestra})} \times 100$

$\% \text{ á-Pineno} = \frac{\text{Área Muestra(á-Pineno)} \times W(\text{std}) \times \text{Concentración(á-Pineno)}}{\text{Area Standard (á-Pineno)} \times W(\text{muestra})} \times 100$

$\% \text{ â-Pineno} = \frac{\text{Área Muestra(â-Pineno)} \times W(\text{std}) \times \text{Concentración(â-Pineno)}}{\text{Area Standard (â-Pineno)} \times W(\text{muestra})} \times 100$

~~43~~ 77
014

Reemplazando datos, se tiene que:

MUESTRA-1 : % á-Pineno = 37,09% % â-Pineno = 0,39%.

MUESTRA-2 : % á-Pineno = 36,45% % â-Pineno = 0,41%.

MUESTRA-3 : % á-Pineno = 36,89% % â-Pineno = 0,39 %.

PROM. = 36,8% PROM. = 0,40%

RSD = 0,89% RSD = 2,9%

44 28 115

Solución # 4

	SOLUTO		SOLVENTE
# MUESTRA	ACEITE DE PINO 100%	BENZOATO DE BENCILO 30%	ALCOHOL ETILICO 96%
1	*	3.0 ml	4.0 ml
%	*	30%	40%

* Información confidencial.

47
29
116

**Anexo 9º EVALUACIÓN DEL EFECTO ACARICIDA DE LA MEZCLA
QUÍMICA ATLASAC**

En mi condición de Químico Farmacéutico magíster en Inmunología y con experiencia investigativa en el área de alergología experimental y a petición del Doctor Eduardo Egea, INVESTIGADOR PRINCIPAL DEL PPROYECTO REFERENCIADO EN Colciencias, código 4262-08-002-99, contrato N°. CF 097-99 , me presenté a las instalaciones del Laboratorio de Inmunología de la Universidad del Norte el día 21 de octubre a las 10 a.m. con el objetivo de evaluar, en mi condición de par externo, el efecto acaricida de la mezcla química ATLASAC.

Material Suministrado Por El Laboratorio De Inmunología

1. Muestra con mezcla química ATLASAC
2. Cultivos de ácaros con diferentes especies de ácaros
3. Un esteromicroscopio
4. Una micro pipeta con una caja de puntas desechables
5. Un cronómetro
6. Muestra con solución salina que sirvió de control negativo
7. Cajas de petri

PROCEDIMIENTO

Con la punta de una espátula fue tomada una parte de un cultivo de ácaros y separado del medio de cultivo. Fueron tomadas dos cantidades de estos ácaros y colocados en dos cajas de petri, se observaron en el esteromicroscopio. A la caja número uno se le

adicionaron 100 µl de la mezcla química ATLASAC, a la caja número dos 100 µl de solución salina utilizado como control negativo. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

RESULTADOS

Tiempo	1 minuto	2 minutos	5 minutos	7 minutos	10 minutos	13 minutos	15 minutos	20 minutos	25 minutos
ATLASAC	100% vivos	100% vivos	50% muertos	80% muertos	95% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
Solución salina	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos

Estos resultados fueron reproducidos en el laboratorio por mi persona.

El efecto acaricida de la mezcla química ATLASAC fue observado sólo con los ácaros que tuvieron contacto directo con esta solución. Se recomienda evaluar el efecto residual de ATLASAC utilizando un mayor tiempo de observación.

ALFREDO LAGARES Q.F. MSc

Anexo 10 BRONCOPROVOCACIÓN CON LA SOLUCION DE TRABAJO
ATLASAC

49/ 31
HCB

Cod. Paciente	VEF1 basal	% variabilidad	FVC basal	% variabilidad	VEF 1 post	% variabilidad	FVC post	% variabilidad	Fecha
A001	73% (1.84)	3.3%	68% (1.92)	1.6%	62% (1.55)	15.8%	60% (1.69)	12.0%	31/10/01
A002	80% (2.96)	N/A	75% (3.33)	N/A	78% (2.90)	N/A	77% (3.41)	N/A	14/11/01
A003	80% (1.63)	3.6%	81% (1.87)	2.6%	77% (1.56)	10.9%	78% (1.80)	10.9%	23/10/01
A004	73% (3.04)	5.3%	80% (3.84)	7.7%	74% (3.09)	4.9%	78% (3.77)	4.5%	13/11/01
A005	97% (2.07)	1.9%	88% (2.16)	0.5%	95% (2.03)	N/A	87% (2.12)	N/A	23/10/01
A006	90% (2.85)	0.7%	94% (3.46)	1.5	87% (2.76)	N/A	91% (3.36)	N/A	23/10/01
A007	105% (2.95)	N/A	93% (2.99)	N/A	101% (2.83)	0.4%	92% (2.94)	2.4%	22/10/01
A008	88% (2.32)	N/A	86% (2.62)	N/A	86% (2.25)	N/A	83% (2.52)	N/A	22/11/01
A009	96% (2.88)	N/A	90% (3.18)	N/A	93% (2.81)	N/A	87% (3.06)	N/A	22/11/01
A010	100% (2.79)	N/A	97% (3.14)	N/A	100% (2.80)	N/A	98% (3.17)	N/A	22/11/01
A011	91% (2.06)	N/A	91% (2.36)	N/A	82% (1.87)	4.1%	84% (2.18)	5.6%	30/10/01
A012	108% (4.34)	N/A	113% (5.28)	N/A	109% (4.38)	2.5%	114% (5.32)	3.4%	30/10/01
A013	76% (2.66)	N/A	83% (3.49)	N/A	62% (2.19)	18.3%	80% (3.38)	9.9%	14/11/01
A014	100% (2.09)	N/A	104% (2.46)	N/A	98% (2.05)	N/A	102% (2.41)	N/A	14/11/01
A015	97% (1.72)	N/A	101% (2.04)	N/A	100% (1.78)	2.2%	109%	2.22	30/10/01
A016	86% (1.92)	2.5%	96% (2.52)	2.9%	67% (1.49)	20.7%	80% (2.09)	21.1%	23/10/01
A017	75% (2.71)	1.8%	88% (3.81)	4.3%	78% (2.83)	0.7%	94%	8.1%	23/10/01
A018	98% (1.37)	0.7%	114% (1.80)	9.1%	105% (1.47)	0.7%	107% (1.69)	1.2%	23/10/01
A019	75% (1.84)	N/A	78% (2.27)	N/A	78% (1.92)	N/A	78% (2.28)	N/A	22/10/01
A021	106% (3.57)	7.3%	99% (3.88)	3.6%	104% (3.49)	3.2%	103% (4.01)	5.5%	04/12/01
A022	106% (2.65)	N/A	94% (2.89)	N/A	95% (2.37%)	11%	82% (2.52)	8.7%	30/10/01
A023	63% (2.99)	11.8%	75% (4.10)	14.4%	71% (3.36)	2.6%	88% (4.80)	3.8%	13/11/01
A024	103% (1.66)	N/A	94% (1.74)	N/A	101 (1.64)	7.9%	93% (1.72)	8.1%	05/12/01
A025	79% (2.48)	N/A	83% (2.97)	N/A	80% (2.51)	4.2%	79% (2.82)	0.7%	20/12/01
A026	84% (2.39)	N/A	77% (2.62)	N/A	84% (2.38)	N/A	89% (3.04)	N/A	21/12/01

Anexo 11

Laboratorios Clínicos proyecto ATLASAC post-aspersión (30 días)

Paciente	Hemg	Hemot	Erit	Leuc	Neutr	Eosin	Linf	Plaqt	GPT	GOT	Bil Dir	Bil Ind	Bil Tot	Creat	Fecha
A001	12.8	39.8	4.400.000	6.200	46%	4%	50%	293.000	12	19	0.21	0.08	0.29	0.6	07-02-02
A003	14.3	43.0	5.200.000	6.700	42%	10%	48%	524.000	18	26	0.07	0.03	0.10	0.6	07-02-02
A005	13.7	43.3	5.020.000	5.500	42%	10%	48%	302.000	18	28	0.08	0.47	0.55	0.7	07-02-02
A007	13.8	43.8	4.740.000	8.900	52%	14%	34%	264.000	16	16	0.35	0.10	0.45	0.7	07-02-02
A011	13.8	42.0	5.090.000	8.100	43%	15%	42%	372.000	20	28	0.29	0.36	0.65	0.6	07-02-02
A015	13.2	39.0	5.170.000	7.400	54%	2%	44%	228.000	20	30	0.05	0.45	0.50	0.6	07-02-02
A018	12	38.1	4.670.000	7.200	38%	6%	56%	406.000	21	32	0.04	0.59	0.63	0.6	07-02-02
A019	12.3	36.0	4.060.000	5.000	40%	1%	59%	207.000	23	23	0.17	0.94	1.11	0.6	05-04-02
A020	13.1	42.1	5.230.000	7.600	54%	10%	36%	414.000	22	22	0.14	0.55	0.69	0.7	07-02-02
A021	14.4	44.0	4.700.000	11.000	72%	0%	28%	190.000	19	17	0.55	0.03	0.58	0.8	04-04-02
A022	14.7	43.0	5.080.000	4.300	46%	4%	50%	227.000	26	24	0.01	0.61	0.62	1.0	07-02-02
A023	16.6	47.0	5.430.000	8.100	44%	6%	50%	303.000	22	20	0.32	0.33	0.65	0.9	07-02-02
A025	13.4	42.9	5.279.000	6.400	66%		34%	342.000	7	21	0.38	0.25	0.63	0.8	07-02-02
A026	13.8	41.0	4.400.000	6.000	60%	0%	40%	150.000	18	20	0.41	0.10	0.51	0.8	05-04-02

Convenciones:

Hemoglobina	Hemg	Linfocitos	Linf
Hematocrito	Hemt	Plaquetas	Plaqt
Eritrocitos	Erit	Bilirrubina Directa	Bil Dir
Leucocitos	Leuc	Bilirrubina Indirecta	Bil Ind
Neutrofilos	Neutr	Bilirrubina Total	Bil Tot
Eosinofilos	Eosin	Creatinina en Suero	Creat

32
114

ANEXO #2

INFORME DE ACTIVIDAD EXPERIMENTALES
PROYECTO ATLASAC

RESULTADOS DE LA EVALUACION CON LAS SOLUCIONES DE LAS MEZCLA QUIMICA EN ESTUDIO

FECHA : FEBRERO 5-FEBRERO 14

ESPECIE 1

To -H.R.	sol.	1 minuto	2 minutos	3 minutos	4 minutos	5 minutos	6 minutos	7 minutos	8 minutos	15 minutos	30 minutos	60 minutos	2 horas	3 horas
T :20 C	3	100% VIVOS	100% VIVOS	100% VIVOS	60% VIVOS	70% MUERTOS	95% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS
H.R.:69%														
T :20 C	4	100% VIVOS	100% VIVOS	20% MUERTOS	50% MUERTOS	89% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS
H.R.:69%														
T :20C	5	100% VIVOS	100% VIVOS	25% MUERTOS	70% MUERTOS	95% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS
H.R.:69%														

OBSERVACIONES:

Se colocó la misma cantidad de especie en las cajas de petri utilizando 70ul de las soluciones a diferentes concentraciones, a igual temperatura y humedad relativa.

Al adicionarle las soluciones a los acaros, se observa la reacción de una mayor movilidad de sus patas y a medida que pasa el tiempo de exposición se agrupan y pierden su movilidad total en sus patas hasta morir.

Con la especie 1 se llevaron a cabo 80 ensayos con cada una de las soluciones, por un total de 240 ensayos

El número mayor de porcentajes de acaros muertos se observó con la solución 5

Se colocó la misma cantidad de acaros en las cajas de petri utilizando 70ul de las soluciones a diferentes concentraciones

Se dejó una muestra de los ensayos observandola por 48 horas y no se produjo ningun cambio.

38
120

ANEXO #3

INFORME DE ACTIVIDAD EXPERIMENTALES
PROYECTO ATLASAC

RESULTADOS DE LA EVALUACION CON LAS SOLUCIONES DE LAS MEZCLA QUIMICA EN ESTUDIO
Evaluacion del efecto acaricida de las soluciones 1,2 y 3

FECHA : FEBRERO 5-FEBRERO 14

ESPECIE 2

To -H.R.	sol.	1 minuto	2 minutos	3 minutos	4 minutos	5 minutos	6 minutos	7 minutos	8 minutos	15 minutos	30 minutos	60 minutos	2 horas	3 horas
		100%	100%	30%	80%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
T :20 C	3	VIVOS	VIVOS	VIVOS	VIVOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS
H.R.:69%														
T :20 C	4	100%	100%	38%	80%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
H.R.:69%		VIVOS	VIVOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS
T :20C	5	100%	100%	48%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
H.R.:69%		VIVOS	VIVOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS

OBSERVACIONES:

Se colocó la misma cantidad de especie en las cajas de petri utilizando 70ul de las soluciones a diferentes concentraciones, a igual temperatura y humedad relativa.

Al adicionarle las soluciones a los acaros, se observa la reacción de una mayor movilidad de sus patas y a medida que pasa el tiempo de exposición se agrupan y pierden su movilidad total en sus patas hasta morir.

Con la especie 2 se llevaron a cabo 80 ensayos con cada una de las soluciones, por un total de 240 ensayos

El número mayor de porcentajes de acaros muertos se observó con la solución 5

Se colocó la misma cantidad de acaros en las cajas de petri utilizando 70ul de las soluciones a diferentes concentraciones

Se dejó una muestra de los ensayos observandola por 48 horas y no se produjo ningun cambio.

94
127

INFORME DE ACTIVIDAD EXPERIMENTALES
PROYECTO ATLASAC

Efecto del efecto acaricida de mezcla a diferentes concentraciones de cada reactante reactante.
FECHA: Marzo 22 del 2001

Solutos				Efecto acaricida/Tiempo de Exposición														
No. Muestra	Aceite Pino(ml)	Benz. Benzilo 30%(ml)	Alcohol Etilico(ml)	Vol. Total Sin(ml)	% Benz. Benzilo	1 minuto	2 minutos	3 minutos	4 minutos	5 minutos	6 minutos	7 minutos	8 minutos	9 minutos	10 minutos	11 minutos	12 minutos	13 minutos
1	0,5	0,5	9	10	1,50%	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	50% muertos	70% muertos	90% muertos	100% muertos
2	1	1	8	10	3%	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	70% muertos	80% muertos	95% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
3	2	2	6	10	6%	vivos	vivos	vivos	40% muertos	60% muertos	85% muertos	95% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
4	3	3	4	10	9%	vivos	70% muertos	98% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos

OBSERVACIONES:

- 1-El número mayor de acaros muertos fué en la solución No.4
- 2-Se colocó el mismo # de acaros en la caja de petri adicionando 50ul de las Sin de diferentes conc.
- 3-No se reporta la conc. de aceite de pino ya que esta se determina en el lab. por cromatografia
- 4-Determinación por calculos matematicos: $V1 \times C1 = V2 \times C2$ para hallar la [] Benzoato Bencilo
- 5-Solucion de benzoato bencilo mas etanol se forma un sobrenadante.
- 6-Solucion de aceite pino mas etanol la dilucion es completa.

ANEXO #5

INFORME DE ACTIVIDAD EXPERIMENTALES
PROYECTO ATLASAC

Efecto del cambio de solvente sobre la capacidad acaricida de la mezcla en estudio.

FECHA:Marzo 28 del 2001

No.	Solutos		Solvente		Vol. Total Sln(ml)	% Benz. Benzilo	Efecto acaricida/Tiempo de Exposición												
	Acete Pino(ml)	Benz. Benzilo 30%(ml)	Alcohol Isopropilico	Benz. Benzilo 30%(ml)			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0,5	0,5	9		10	1,50%	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	minutos vivos	50% muertos	70% muertos	90% muertos	100% muertos
2	1	1	8		10	3%	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	70% muertos	80% muertos	95% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
3	2	2	6		10	6%	vivos	vivos	vivos	40% muertos	60% muertos	85% muertos	95% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
4	3	3	4		10	9%	vivos	70% muertos	98% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos

OBSERVACIONES:

- 1-El número mayor de acaros muertos fué en la solución No.4
- 2-Se colocó el mismo # de acaros en la caja de petri adicionando 50ul de las Slm de diferentes conc.
- 3-No se reporta la conc. de aceite de pino ya que esta se determina en el lab. por cromatografía
- 4-Determinación por calculos matematicos: V1xC1=V2xC2 para hallar la []Benzoato Bencilo
- 5-Solucion de benzoato bencilo mas alcohol isopropilico se produce un sobrenadante
- 6-Solucion de aceite pino mas alcohol isopropilico la dilucion es completa.

36
123

INFORME DE ACTIVIDAD EXPERIMENTALES

PROYECTO ATLASAC

Evaluacion de la capacidad acaricida de cada uno de los diferentes componentes de la mezcla

Marzo 26 del 2001

Producto	1 minuto	2 minuto	3 minuto	4 minuto	5 minuto	6 minuto	7 minuto	8 minutos	15 minutos	30 minutos	45 minutos	1 hora
Ultra Cresol Puro	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	40% muertos	70% muertos	100% muertos
Aceite de Pino Puro	70% muertos	90% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
Benzoato de Bencilo Puro	100% vivos	100% vivos	40% muertos	70% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
Aceite de Pino al 3% Solvente (Alcohol Etílico)	100% vivos	70% muertos	90% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
Aceite de Pino al 7% Solvente (Alcohol Etílico)	100% vivos	80% muertos	95% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
Benzoato de Bencilo al 2% Solvente (Alcohol Etílico)	100% vivos	100% vivos	20% muertos	35% muertos	50% muertos	70% muertos	85% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos

OBSERVACION: El Aceite de Pino Puro y Diluido tiene la propiedad de ser un producto acaricida

ANEXO # 7

INFORME DE ACTIVIDADES EXPERIMENTALES

PROYECTO ATLASAC

Evaluacion del cambio de solvente.
Relacion entre menor concentracion y el efecto acaricida.
Selección de una mezcla con las concentraciones adecuadas y la capacidad acaricida ideal.
Analisis de cada dilucion. Efectos de las concentraciones de los reactantes
ABRIL 3-2001.

No. muestra	Solutos		Solvente	Vol. Total	Efecto acaricida/Tiempo de Exposición									
	Aceite de Pino (ml)	Benzoato Benc.30%(ml)			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,5	0,5	Alcohol Etílico96%(ml)	10	minuto vivos	minutos vivos	minutos vivos	minutos vivos	minutos vivos	minutos muertos	minutos muertos	minutos muertos	minutos muertos	minutos muertos
2	1	1	8	10	vivos	vivos	vivos	30% muertos	55% muertos	80% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
3	2	2	6	10	vivos	40% muertos	80% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
4	3	3	4	10	vivos	75% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos

Observación:
1- El # mayor de acaros muertos fué la solución # 4
2-La cantidad de muestra utilizada a diferentes [] fué de 50ul
3-El Alcohol Etílico al 96% cumple la misma función que el Alcohol Etílico puro como solvente.
4-El Aceite de Pino es soluble en Alcohol Etílico al 96%
5-El Benzoato de bencilo en Alcohol Etílico al 96% se produce un sobrenadante

38
125

ANEXO # 8

INFORME DE ACTIVIDADES EXPERIMENTALES

PROYECTO ATLASAC

Evaluacion de diferentes concentraciones del solvente

ABRIL 16-2001

No.	Solutos		Solvente		Efecto acaricida/Tiempo de Exposición									
	Aceite de	Benzoato	Alcohol	Vol.Total	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
muestra	Pino (ml)	Benc.30%(ml)	Etilico96%(ml)	Sln (ml)	minuto	minutos	minutos	minutos	minutos	minutos	minutos	minutos	minutos	minutos
1	3	3	Sln 80%	10	vivos	50%	85%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			4ml			mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos
2	3	3	Sln 70%	10	vivos	50%	85%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			4 ml			mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos
3	3	3	Sln 50%	10	vivos	50%	80%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			4ml			mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos
4	3	3	Sln 25%	10	vivos	40%	75%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
			4ml			mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos
5	3	3	Sln 10%	10	vivos	30%	70%	85%	93%	100%	100%	100%	100%	100%
			4ml			mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos
6	3	3	Sln 3%	10	vivos	30%	40%	50%	80%	95%	100%	100%	100%	100%
			4ml			mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos	mueritos

Observación:

- 1-Las soluciones con diferente concentraciones de alcohol etilico se pueden utilizar como acaricida.
- 2-la cantidad de muestra utilizada a diferentes [] fue de 50ul enlas tres primeras muestras y70ul en las tres restantes.
- 3-La concentracion de benzoato de bencilo es del 9%

29
126

ANEXO # 1

INFORME DE ACTIVIDADES EXPERIMENTALES
PROYECTO ATLASAC
INTERPRETACION DE ENSAYOS EXPERIMENTALES PRELIMINARES.

FECHA ABRIL 19 del 2001

De acuerdo a lo analizado en las pruebas se llegó a las siguientes conclusiones:

- 1- El ácido Tánico con el Benzoato de Bencilo al 30% con diferentes Ph no son compatibles químicamente.
- 2- El ácido Tánico con solución de (Aceite de Pino + Alcohol Etilico Puro) a diferentes concentraciones no tiene el efecto acaricida, ya que solamente elimina entre el 15 al 40% en las especies jóvenes utilizadas.
- 3- El Aceite de Pino + Benzoato de Bencilo al 30% + Alcohol Etilico puro, esta solución a diferente concentraciones tiene efecto acaricida.
 - Esta solución a mayor concentración tiene un el efecto acaricida mas rápido.
 - Estos ensayos se realizaron a una misma hora en diferentes días a una temperatura y a una humedad relativa igual.El tiempo establecido para observar la eliminación total de los ácaros de las diferentes especies fue entre 2 a 4 minutos, utilizando 100ul de la solución con mayor concentración.

INFORME DE ACTIVIDADES EXPERIMENTALES
PROYECTO ATLASAC

Efecto del envejecimiento de la mezcla sobre su capacidad acaricida.

No. muestra	Solutos		Solvente		Vol. Total
	Aceite de Pino (ml)	Benzoato Benc. 30%(ml)	Alcohol Etílico 96%(ml)	Sln (ml)	
1	3	3	3	4.0	10

1. realizada la solución se dejó por 24 días a temperatura ambiente y destapada para eliminar olor, y ver su actividad acaricida se observó lo siguiente:
Su efecto acaricida no varió y su olor disminuyó en un 50%
2. Se dejó el Alcohol Etílico al 96% a temperatura ambiente por 8 días y destapado para observar si su olor disminuía En base a esto se elaboró la solución acaricida .Se comprobó lo siguiente:
Disminuyó su olor y se mantuvo la acción acaricida

INFORME DE ACTIVIDAD EXPERIMENTALES
PROYECTO ATLASAC

PARA: DR. GUSTAVO CUADRO
DR. EDUARDO EGEA

DE: B.C.R. 2000

ASUNTO: RESULTADOS DE LA EVALUACION CON LAS SOLUCIONES DE LAS MEZCLA QUIMICA EN ESTUDIO

FECHA : FEBRERO 5-FEBRERO 14

ESPECIE 1

To -H.R.	sol.	1 minuto	2 minutos	3 minutos	4 minutos	5 minutos	6 minutos	7 minutos	8 minutos	15 minutos	30 minutos	60 minutos	2 horas	3 horas
		100%	100%	100%	60%	70%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
T :20 C	3	VIVOS	VIVOS	VIVOS	VIVOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS
H.R. :69%														
T :20 C	4	100%	100%	20%	50%	89%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
H.R. :69%		VIVOS	VIVOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS
T :20C	5	100%	100%	25%	70%	95%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
H.R. :69%		VIVOS	VIVOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS	MUERTOS

OBSERVACIONES:

Se colocó la misma cantidad de especie en las cajas de petri utilizando 70ul de las soluciones a diferentes concentraciones, a igual temperatura y humedad relativa.

Al adicionarle las soluciones a los acaros, se observa la reacción de una mayor movilidad de sus patas y a medida que pasa el tiempo de exposición se agrupan y pierden su movilidad total en sus patas hasta morir.

Con la especie 1 se llevaron a cabo 80 ensayos con cada una de las soluciones, por un total de 240 ensayos

El número mayor de porcentajes de acaros muertos se observó con la solución 5

Se colocó la misma cantidad de acaros en las cajas de petri utilizando 70ul de las soluciones a diferentes concentraciones

Se dejó una muestra de los ensayos observandola por 48 horas y no se produjo ningun cambio.

FEBRERO 16 DEL 2001

43
130

INFORME DE ACTIVIDAD EXPERIMENTALES

Evaluacion del efecto acaricida de las soluciones 1,2 y 3

PROYECTO ATLASAC

PARA: DR. GUSTAVO CUADRO
DR. EDUARDO EGEA

DE: B.C.R. 2000

ASUNTO: RESULTADOS DE LA EVALUACION CON LAS SOLUCIONES DE LAS MEZCLA QUIMICA EN ESTUDIO

FECHA : FEBRERO 5-FEBRERO 14

ESPECIE 2

To -H.R.	sol.	1 minuto	2 minutos	3 minutos	4 minutos	5 minutos	6 minutos	7 minutos	8 minutos	15 minutos	30 minutos	60 minutos	2 horas	3 horas
T :20 C	3	100% VIVOS	100% VIVOS	30% VIVOS	80% VIVOS	98% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS
H.R.:69%														
T :20 C	4	100% VIVOS	100% VIVOS	38% MUERTOS	80% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS
H.R.:69%														
T :20C	5	100% VIVOS	100% VIVOS	48% MUERTOS	98% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS	100% MUERTOS
H.R.:69%														

OBSERVACIONES:

Se colocó la misma cantidad de especie en las cajas de petri utilizando 70ul de las soluciones a diferentes concentraciones, a igual temperatura y humedad relativa.

Al adicionarle las soluciones a los acaros, se observa la reacción de una mayor movilidad de sus patas y a medida que pasa el tiempo de exposición se agrupan y pierden su movilidad total en sus patas hasta morir.

Con la especie 2 se llevaron a cabo 80 ensayos con cada una de las soluciones, por un total de 240 ensayos

El número mayor de porcentajes de acaros muertos se observó con la solución 5

Se colocó la misma cantidad de acaros en las cajas de petri utilizando 70ul de las soluciones a diferentes concentraciones

Se dejó una muestra de los ensayos observandola por 48 horas y no se produjo ningun cambio.

FEBRERO 16 DEL 2001

44
131

I
NFORME DE ACTIVIDAD EXPERIMENTALES
PROYECTO ATLASAC

Efecto del efecto acaricida de mezcla a diferentes concentraciones de cada reactante reactante.
FECHA: Marzo 22 del 2001

No.	Solutos			Solvente		Efecto acaricida/Tiempo de Exposición													
	Acete	Benz. Benzilo		Alcohol	Vol. Total	% Benz.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Muestra	Pino(ml)	30%(ml)		Etilico(ml)	Slr(ml)	Benzilo	minuto	minutos	minutos	minutos	minutos	minutos	minutos	minutos	minutos	minutos	minutos	minutos	minutos
1	0,5	0,5		9	10	1,50%	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos		50% muertos	70% muertos	90% muertos	100% muertos
2	1	1		8	10	3%	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	70% muertos	80% muertos	95% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
3	2	2		6	10	6%	vivos	vivos	vivos	40% muertos	60% muertos	85% muertos	95% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
4	3	3		4	10	9%	vivos	70% muertos	98% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos

OBSERVACIONES:

- 1-El número mayor de acaros muertos fué en la solución No.4
- 2-Se colocó el mismo # de acaros en la caja de petri adicionando 50ul de las Slr de diferentes conc.
- 3-No se reporta la conc. de aceite de pino ya que esta se determina en el lab. por cromatografia
- 4-Determinación por calculos matematicos: $V1 \times C1 = V2 \times C2$ para hallar la [] Benzoato Bencilo
- 5-Solucion de benzoato bencilo mas etanol se forma un sobrenadante.
- 6-Solucion de aceite pino mas etanol la dilucion es completa.

132

ANEXO #5

INFORME DE ACTIVIDAD EXPERIMENTALES
PROYECTO ATLASAC

Efecto del cambio de solvente sobre la capacidad acaricida de la mezcla en estudio.

FECHA: Marzo 28 del 2001

No. Muestra	Solutos		Solvente		Vol. Total Sln(ml)	% Benz. Benzilo	Efecto acaricida/Tiempo de Exposición												
	Aceite Pino(ml)	Benz.Benzilo 30%(ml)	Alcohol Isopropilico(l)				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0,5	0,5	9		10	1,50%	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	50% muertos	70% muertos	90% muertos	100% muertos
2	1	1	8		10	3%	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	70% muertos	80% muertos	95% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
3	2	2	6		10	6%	vivos	vivos	vivos	40% muertos	60% muertos	85% muertos	95% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
4	3	3	4		10	9%	vivos	70% muertos	98% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos

OBSERVACIONES:

- 1-El número mayor de acaros muertos fué en la solución No.4
- 2-Se colocó el mismo # de acaros en la caja de petri adicionando 50ul de las Sln de diferentes conc.
- 3-No se reporta la conc. de aceite de pino ya que esta se determina en el lab. por cromatografia
- 4-Determinación por calculos matematicos: V1xC1=V2xC2 para hallar la []Benzoato Bencilo
- 5-Solucion de benzoato bencilo mas alcohol isopropilico se produce un sobrenadante
- 6-Solucion de aceite pino mas alcohol isopropilico la dilucion es completa.

46
133

ANEXO # 6

INFORME DE ACTIVIDAD EXPERIMENTALES
PROYECTO ATLASAC

Evaluacin de la capacidad acaricida de cada uno de los diferentes componentes de la mezcla
Marzo 30 del 2001

Producto	1 minuto	2 minuto	3 minuto	4 minuto	5 minuto	6 minuto	7 minuto	8 minutos	15 minutos	30 minutos	45 minutos	1 hora
Ultra Cresol Puro	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	100% vivos	40% muertos	70% muertos	100% muertos
Aceite de Pino Puro	70% muertos	90% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
Benzoato de Bencilo Puro	100% vivos	100% vivos	40% muertos	70% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
Aceite de Pino al 3% Solvente (Alcohol Etílico)	100% vivos	70% muertos	90% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
Aceite de Pino al 7% Solvente (Alcohol Etílico)	100% vivos	80% muertos	95% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
Benzoato de Bencilo al 2% Solvente (Alcohol Etílico)	100% vivos	100% vivos	20% muertos	35% muertos	50% muertos	70% muertos	85% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos

OBSERVACION: El Aceite de Pino Puro y Diluido tiene la propiedad de ser un producto acaricida

47
134

ANEXO # 7

INFORME DE ACTIVIDADES EXPERIMENTALES

PROYECTO ATLASAC

Evaluacion del cambio de solvente.
Relacion entre menor concentracion y el efecto acaricida.
Selección de una mezcla con las concentraciones adecuadas y la capacidad acaricida ideal.
Analisis de cada dilucion. Efectos de las concentraciones de los reactivos
ABRIL 3-2001.

No. muestra	Solutos		Solvente		Vol. Total Sln (ml)	Efecto acaricida/Tiempo de Exposición									
	Aceite de Pino (ml)	Benzoato Benc.30%(ml)	Alcohol Etilico96%(ml)			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,5	0,5	9		10	vivos	vivos	vivos	vivos	vivos	35% muertos	50% muertos	70% muertos	95% muertos	100% muertos
2	1	1	8		10	vivos	vivos	vivos	30% muertos	55% muertos	80% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
3	2	2	6		10	vivos	40% muertos	80% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos
4	3	3	4		10	vivos	75% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos	100% muertos

Observación:
1- El # mayor de acaros muertos fué la solución # 4
2-La cantidad de muestra utilizada a diferentes [] fué de 50ul
3-El Alcohol Etilico al 96% cumple la misma función que el Alcohol Etilico puro como solvente.
4-El Aceite de Pino es soluble en Alcohol Etilico al 96%
5-El Benzoato de bencilo en Alcohol Etilico al 96% se produce un sobrenadante

135

ANEXO # 8

INFORME DE ACTIVIDADES EXPERIMENTALES

PROYECTO ATLASAC

Evaluacion de diferentes concentraciones del solvente

ABRIL 16-2001

No. muestra	Solutos		Solvente		Efecto acaricida/Tiempo de Exposición									
	Aceite de Pino (ml)	Benzoato Benc.30%(ml)	Alcohol Etílico96%(ml)	Vol.Total Sln (ml)	1 minuto vivos	2 minutos 50%	3 minutos 85%	4 minutos 100%	5 minutos 100%	6 minutos 100%	7 minutos 100%	8 minutos 100%	9 minutos 100%	10 minutos 100%
1	3	3	Sln 80% 4ml	10		mueros	mueros	mueros	mueros	mueros	mueros	mueros	mueros	mueros
2	3	3	Sln 70% 4 ml	10	vivos	50% mueros	85% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros
3	3	3	Sln 50% 4ml	10	vivos	50% mueros	80% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros
4	3	3	Sln 25% 4ml	10	vivos	40% mueros	75% mueros	95% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros
5	3	3	Sln 10% 4ml	10	vivos	30% mueros	70% mueros	85% mueros	93% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros
6	3	3	Sln 3% 4ml	10	vivos	30% mueros	40% mueros	50% mueros	80% mueros	95% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros	100% mueros

Observación:

1-Las soluciones con diferente concentraciones de alcohol etílico se pueden utilizar como acaricida.

2-la cantidad de muestra utilizada a diferentes [] fue de 50ul enlas tres primeras muestras y70ul en las tres restantes.

3-La concentracion de benzoato de bencilo es del 9%

INTERPRETACION DE LOS ENSAYOS EXPERIMENTALES REALIZADOS.

INTERPRETACION DE LOS ENSAYOS PRELIMINARES REALIZADOS
POR EL DR. GUSTAVO CUADRO

FECHA

ABRIL 19 del 2001

De acuerdo a lo analizado en las pruebas se llegó a la siguiente conclusión:

- 1- El ácido Tánico con el Benzoato de Bencilo al 30% con diferentes Ph no son compatibles químicamente.
 - 2- El ácido Tánico con solución de (Aceite de Pino + Alcohol Etilico Puro) a diferentes concentraciones no tiene el efecto acaricida, ya que solamente elimina entre el 15 al 40% en las especies jóvenes utilizadas.
 - 3- El Aceite de Pino + Benzoato de Bencilo al 30% + Alcohol Etilico puro, esta solución a diferente concentraciones tiene efecto acaricida.
 - Esta solución a mayor concentración tiene un el efecto acaricida mas rápido.
 - Estos ensayos se realizaron a una misma hora en diferentes días a una temperatura y a una humedad relativa igual.
- El tiempo establecido para observar la eliminación total de los ácaros de las diferentes especies fue entre 2 a 4 minutos; utilizando 100ul de la solución con mayor concentración.

INTERPRETACION DE LOS ENSAYOS EXPERIMENTALES REALIZADOS

INFORME DE ACTIVIDADES EXPERIMENTALES
PROYECTO ATLASAC

Efecto del envejecimiento de la mezcla sobre su capacidad acaricida.

No. muestra	Solutos		Solvente		Vol. Total
	Aceite de Pino (ml)	Benzoato Benc.30%(ml)	Alcohol Etilico96%(ml)	Sln (ml)	
1	3	3	4.0	ml	10

1. realizada la solución se dejó por 24 días a temperatura ambiente y destapada para eliminar olor, y ver su actividad acaricida se observó lo siguiente:
Su efecto acaricida no varió y su olor disminuyó en un 50%
2. Se dejó el Alcohol Etilico al 96% a temperatura ambiente por 8 días y destapado para observar si su olor disminuia En base a esto se elaboró la solución acaricida .Se comprobó lo siguiente:
Disminuyó su olor y se mantubo la acción acaricida

139

83
140

INFORME TECNICO FINAL

PROYECTO:

ANÁLISIS INMUNOQUÍMICO, EVALUACIÓN DEL EFECTO DENATURALIZANTE PROTEICO DE UNA MEZCLA QUÍMICA ACARICIDA.

Presentado por:
**EL GRUPO DE INVESTIGACIONES EN INMUNOLOGÍA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR
Y LA DIRECCION DE INVESTIGACIONES Y PROYECTOS
A:**
PROCAPS S.A.

Documento elaborado por:
EDUARDO EGEA BERMEJO. MD. MSc.
Y
ALFREDO LAGARES Quím. MSc.
INVESTIGADORES PRINCIPALES

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DEL NORTE
BARRANQUILLA, NOVIEMBRE 2005**

54
141

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	3
2.	RESUMEN	7
3.	DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	8
3.1	PLANTEAMIENTO EL PROBLEMA	8
3.2	MARCO TEORICO	10
3.3	OBJETIVOS	14
3.4	MATERIALES Y METODOS	15
3.5	CRONOGRAMA	22
4.	CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS	30
5.	APEGO A LA METODOLOGIA	30
6.	RESULTADOS	30
7.	CONCLUSIONES	41
8.	CUMPLIMIENTO DEL CRONOGRAMA	42
9.	LOGRO DE LOS IMPACTOS ESPERADOS	42
10.	DIVULGACIÓN DE LOS DESARROLLOS REALIZADOS	43
	BIBLIOGRAFÍA	47

1. INTRODUCCIÓN

La prevalencia de las enfermedades alérgicas tales como el asma, eczema y rinitis alérgica se ha incrementado dramáticamente en los últimos años. El gran incremento ha ocurrido principalmente en países occidentales con estilos de vida altamente sanitarios. En estos países, los desordenes alérgicos son enfermedades crónicas comunes que afectan a los niños, siendo la mas frecuente causa de ausentismo escolar y la razón más común de hospitalización de niños. La prevalencia de las enfermedades alérgicas continúa aumentando, aunque la prevalencia del asma se ha estabilizado en las últimas décadas. Las enfermedades alérgicas tienen un impacto significativo sobre la calidad de vida. Por ejemplo, el impacto social y emocional de eczema en niños es más alto que el de la diabetes; lo que traduce altos gastos económicos en estas familias. Las enfermedades alérgicas son usualmente incurables, la prevalencia de una actitud de resignación es un problema de salud publico mayor. Debido a esto, las investigaciones orientadas en hallar estrategias efectivas para prevenir las enfermedades alérgicas han registrado un incremento importante.

La organización mundial para la salud (WHO) define la salud no solo como la ausencia de enfermedad e inestabilidad, sino también la presencia de bienestar físico, mental y social.¹ En las últimas décadas se ha dado un incremento en los esfuerzos por conocer los efectos sobre la calidad de vida y costos del cuidado de la salud, que traen consigo las enfermedades atópicas.² Es claro que estos pacientes pueden presentar comorbilidad como desordenes del sueño, trastornos emocionales, deterioro en sus actividades físicas y mentales, disminución en la vitalidad y percepción de perdida de la salud en general.³ Las enfermedades alérgicas se comportan y se expresan como un conjunto de síndromes clínicos dentro de los cuales están rinitis alérgica, asma bronquial y el síndrome eczema / dermatitis atópica.⁴

Se ha comprobado que la exposición a los alergenos de ácaros de polvo domestico es el factor ambiental mas importante para desarrollo de asma.⁵ *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* y *Blomia tropicalis* son las especies de ácaros de polvo domestico más comunes en climas tropicales y subtropicales. La sensibilización a estos ácaros es alta y está representado por alergias a péptidos alergénicos específicos de estas especies, por ello estos alergenos deben incluirse en el diagnostico y tratamiento de las enfermedades alérgicas respiratorias.⁶⁻⁷

El asma representa la más frecuente causa de hospitalización en grupos pediátricos en los países del primer mundo y ha incrementado su importancia como causa de morbilidad en adultos. Los efectos económicos de estas enfermedades son muy altos y se están incrementado. Estos descubrimientos representan un reto considerable para las investigaciones en salud, al tiempo que indica que los factores ambientales relacionados en el moderno estilo de vida y que conducen a cambios en la prevalencia de las enfermedades.⁸

En Colombia existe una alta prevalencia de pacientes asmáticos en las principales ciudades del país. En Barranquilla tenemos una prevalencia de asma del 8.1%, Bogotá de 9.4%, Cali de 10.7%, Bucaramanga de 11.5%, San Andrés 11.7% y Medellín de 13%. La prevalencia de Rinitis alérgica es aun más preocupante. Para Barranquilla la prevalencia de Rinitis alérgica es del 17.9%, en Bogotá 21.6%, Cali 22.6%, Bucaramanga 31.6%, San Andrés 17.2%, y Medellín 28.2%.⁹ La alta prevalencia de las enfermedades alérgicas y el desarrollo de pruebas para diagnóstico y tratamiento de las alergias ha tenido un gran impacto en la provisión de cuidados médicos a los pacientes alérgicos.⁴

El estudio de las enfermedades alérgicas se ha encaminado a la investigación de los mecanismos inmunológicos que inducen la expresión clínica de los fenotipos atópicos. Los avances en Inmunoalergología han servido para la introducción de extractos alérgicos que puedan ser utilizados en el diagnóstico de las alergias, contribuyendo a conocer mejor su etiopatogénesis.¹⁰ Los extractos alérgicos estandarizados han sido utilizado in Vitro e in vivo en estudios controlados y han mostrado una buena correlación con la enfermedad clínica. En contraste, la falta de extractos estandarizados disponibles en el mercado ha dificultado el diagnóstico detallado de las reacciones de hipersensibilidad.¹¹

Nuestro grupo de investigaciones desde hace 8 años, se encuentran trabajando con el apoyo de Colciencias, la industria farmacéutica privada y otras instituciones, en una cadena de productos aplicados a la prevención específicamente en el control ambiental, diagnóstico, y tratamiento de las enfermedades alérgicas. Como resultado de esto se ha producido y se espera patentar ACAR KLEAN(TM) una potente mezcla acaricida, el cual es el primero en su genero en Latinoamérica (código Colciencias N°: 4262-08-002-98).¹² Este producto fue evaluado en una segunda fase (código Colciencias N°: 1215-12-11561)¹³⁻¹⁴, el cual demostró el poder para desnaturalizar las proteínas alérgicas de los ácaros de este producto.

Durante mucho tiempo se ha venido atribuyendo al polvo de casa un carácter alérgico importante y responsable de un gran número de alergias respiratorias tales como el asma y la rinitis crónica. La importancia epidemiológica de estas noxas alérgicas, hizo que el polvo de habitación fuese minuciosamente estudiado. Kern se refiere por primera vez a la importancia del polvo casero en las manifestaciones alérgicas.¹⁵ En 1924 Storm Van Leeuwen asocia el fenómeno alérgico del polvo en determinadas circunstancias climáticas al observar mejorías clínicas espectaculares cuando los enfermos se trasladaban a climas de alta montaña con humedades relativas bajas.¹⁶ La presencia en el polvo de casa de ácaros del género *Dermatophagoides* fue indicada por primera vez por Oshima en 1964.¹⁷

Se ha comprobado que la exposición a los alérgenos de ácaros de polvo domestico es la causa ambiental dominante para desarrollo de procesos asmáticos.⁵ Los alérgenos de los ácaros se encuentran en el cuerpo de estos artrópodos y las excretas son una fuente muy importante de alérgenos.²⁰ Los

ácaros pertenecen al phylum Arthropoda, clase Arachnida, orden Estigmata, familia Pyroglyphidae. La especie de mayor interés para este estudio es *Dermatophagoides pteronyssinus*, debido a que es el ácaro con mayor prevalencia en la ciudad de Barranquilla.²¹⁻²³

En las especies *Dermatophagoides*, Debido a la micro heterogeneidad dentro y entre especies, las proteínas o péptidos alérgicos han sido referenciados en 12 grupos de alérgenos Der 1-11 y Der 14.²⁵ Los grupos de alérgenos 12 y 13 han sido descritos para otros grupos de ácaros (dentro de los cuales está *Blomia tropicalis*). Los alérgenos descritos para *Dermatophagoides pteronyssinus* son 14 (ver tabla N°1).²⁶ Se ha propuesto una reactividad cruzada entre alérgenos de otros invertebrados con diferentes especies de ácaros, insectos, moluscos, y crustáceos. Der p 10 es una molécula de gran significado en esta reactividad cruzada, debido a que es un alérgeno reactivo entre ácaros, cucaracha y nematodos.²⁶⁻²⁹

Las especies que se encuentran filogénicamente relacionadas usualmente producen alérgenos que comparten homología en su secuencia de aminoácidos, esto se hace evidente por ejemplo en el grupo 1 de alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p 1) y de *D. farinae* (Der f 1) en donde se muestra un 80% de homología en su secuencia de aminoácidos.²⁸ La similitud de secuencias encontradas ha permitido establecer familias de proteínas de acuerdo a su función biológica. Varios alérgenos de ácaros son enzimas proteolíticas (cisterna - proteasas y serina - proteasas, tripsina y quimiotripsina) y otras proteínas del músculo tales como la tropomiosina han sido identificados como alérgenos de ácaros y otros insectos.³⁰

El factor de riesgo más importante en el desarrollo del asma en la infancia lo constituye la sensibilización a alérgenos intra domiciliarios. En el tercer taller Internacional sobre alérgenos domésticos y asma se concluyó que la exposición a más de 2 µg de Der p 1 y/o Der f 1 / g de polvo puede ser considerado como un factor de riesgo para la sensibilización a ácaros y la hiperreactividad bronquial. La exposición a más de 10 µg de alérgeno del grupo 1/ g de polvo representa el nivel más alto de riesgo para sensibilización y desarrollo de enfermedades alérgicas en individuos genéticamente predispuestos.³¹

La fuente de alérgenos de ácaros en el polvo intra domiciliario fue establecido hace 30 años pertenecientes al género *Dermatophagoides* principalmente,³² y desde entonces, varios estudios epidemiológicos han mostrado relaciones causales de significancia estadística entre la sensibilización a estos alérgenos y el desarrollo del asma.

A la fecha, se han descrito 20 grupos distintos de alérgenos de ácaros domésticos, de los cuales 17 son del género *Dermatophagoides*, mientras que los tres grupos restantes (grupos 12, 13 y 19) han sido encontrados únicamente en ácaros de depósito y *B. tropicalis*.³³

Existen grupos específicos de alergenos de ácaros con base en su composición bioquímica, la secuencia y el peso molecular. Una proteína puede ser incluida en la Nomenclatura alérgica si la prevalencia de la reactividad de IgE es >5% y si desencadena una respuesta IgE al menos en 5 pacientes. Hasta la fecha más de 2000 secuencia de nucleótidos y proteínas de alergenos han sido depositadas en el GenBank. Las proteínas pueden ser identificadas utilizando sueros que contienen elevados niveles de IgE en combinación con ensayos inmunoquímicos que separan proteínas sobre la base de su carga neta (isoelectroenfoque) y por su tamaño (westerblott) y la habilidad para unir anticuerpos del isotipo IgE (inmunoensayos de inhibición competitiva).

La importancia de los alergenos de ácaros como factores de riesgo para asma ha sido ampliamente documentada en investigaciones epidemiológicas, así como en condiciones experimentales empleando modelos animales y humanos. Existen evidencias de que algunos alergenos pudiera ser inmunodominantes respecto a otros, por ejemplo, en el trópico se ha advertido que la frecuencia de sensibilización contra pólenes y mohos nativos es menor y menos intensa que contra ácaros.³⁴⁻³⁵

Si la inhalación de alergenos en el interior de las viviendas contribuye a la sensibilización y a la gravedad de los síntomas, es razonable pensar que reduciendo la exposición a los alergenos se podría conseguir un retraso en el proceso de sensibilización y una mejora en los síntomas alérgicos. Sin embargo, las limitaciones en el diseño de muchos estudios clínicos han producido resultados conflictivos y no se ha podido establecer con total certeza que medidas son la más efectivas para controlar la exposición a alergenos en las viviendas y obtener un resultado clínico positivo. Sin embargo, existen resultados clínicos positivos.³⁶ Cuando se toman medidas drásticas dirigidas a la reducción de alergenos se encuentran beneficios clínicos importantes.³⁷

En los países tropicales los individuos atópicos se exponen desde su nacimiento a cargas altas de alergenos de ácaros desde la infancia hasta la edad adulta, debido a que los ácaros encuentran condiciones ambientales óptimas para su crecimiento, lo que podría explicar una mayor sensibilización en el trópico a alergenos de ácaros. De hecho, en Zambia se encontró que la proporción de muestras de polvo de habitación que contenían ácaros era del 90%, mientras que en Inglaterra la proporción era del 67%.³⁸

2. RESUMEN

Se desarrollo una investigación aplicada cuyo propósito específico fue validar a través de ensayos experimentales, ACARKLEAN (Atlasac) producto de innovación y desarrollo tecnológico, como agente degradante y desnaturalizante de los epítopes alergénicos de las principales especies de ácaros *Dermatophagoides Farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Blomia tropicalis*, involucrados en la fisiopatogénia del asma alérgica, y otras enfermedades de origen alérgico. Previamente ATLASAC, una mezcla química resultante, de la aplicación del conocimiento en el campo de la biotecnología aplicada a la Salud y mas especialmente al control biológico y a la densidad poblacional de la flora acarológica había sido desarrollado por nuestro grupo con el apoyo del Programa Nacional de Innovación y desarrollo tecnológico a través del Grant No.4262-08002-99.

A esta mezcla química se le demostró ampliamente un efecto biológico acaricida. Los resultados que comprobaron este efecto biológico han sido presentados a la Subdirección Nacional de desarrollo e Innovación Tecnológica en Julio del 2001.

A la fecha de culminación del proyecto no existía en la literatura científica un modelo de evaluación molecular para demostrar el efecto desnaturalizante de los acaricidas presentes en el mercado. También es claro que una solución química, no solamente debe tener capacidad de matar los ácaros, sino que debe desnaturalizar las proteínas alergénicas, en razón a que estas continúan siendo capaces de producir eventos inflamatorios involucrados en fisiopatología de las enfermedades alérgicas

Los resultados que se obtuvieron del desarrollo experimental de este proyecto demuestran que ACARKLEAN (Atlasac), no solo tiene un efecto biológico acaricida sobre las tres especies mas importantes, involucradas como agentes desencadenantes de las enfermedades alérgicas respiratorias y dermatológicas en el humano, sino que también las proteínas responsables de generar el daño en los tejidos y estimular la respuesta alérgica, se desnaturalizan cuando se ponen en contacto con la mezcla clínica ACARKLEAN.

Es este el primer trabajo de investigación científica desarrollado en Latinoamérica y publicado en la literatura científica, que soporta con evidencia este efecto desnaturalizante.

160
147

3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe una fuerte asociación entre la sensibilidad a los alérgenos intradomiciliarios y la incidencia de rinitis, dermatitis atópica y asma, las cuales son patologías que oscilan con una prevalencia entre el 10 y 20% en diferentes lugares del mundo, siendo los niños y los adultos jóvenes los más prevalentes, aunque puede afectar personas de cualquier edad. Estos alérgenos comunes intradomiciliarios incluyen antígenos provenientes de ácaros de polvo, cucarachas, pelos de mascotas, hongos entre otros. Muchos pacientes son descuidados con respecto a los efectos de los alérgenos intradomiciliarios. Las condiciones alérgicas y su impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes no deberían ser subestimado (18), puesto que los pacientes con pobre calidad de vida disminuyen su rendimiento laboral, tanto como aumenta las cifras de ausentismo laboral y escolar, creando un fuerte impacto en la economía del país.

La relación entre contaminantes intradomiciliarios y patologías respiratorias ha sido documentada ya en 1920, cuando el Dr. van Leeuwen construyó en la Universidad de Leiden, unas habitaciones libres de alérgenos, las cuales no tenían tapetes, ni alfombras, las camas y las sillas eran metálicas y el aire era dehumidificado pasando por un ducto de sistema refrigerado; reportando mejoría en los síntomas de los pacientes que las habitaron.(19) Teniendo en cuenta que tanto las plantas como los animales producen enzimas y otras proteínas es inevitable que los humanos sean expuesto a un amplio rango de proteínas extrañas, las cuales pueden ser potencialmente alérgicas. Para la mayoría de esta fuentes de alérgenos, la exposición consiste en la inhalación de pequeñas cantidades de alérgenos repetitivamente por un largo periodo de meses o años, la respuesta inmune para esta forma de exposición es la hipersensibilidad inmediata (anticuerpos IgE y células T subtipo Th2).

El conteo de ácaros, cucarachas o esporas ha sido usado para identificar los alérgenos domiciliarios desde hace cierto tiempo. El conteo de los ácaros ha sido de gran valor en identificar la importancia alérgica de las diferentes especies de ácaros a lo largo del mundo, no solamente en el polvo casero sino también en los alimentos almacenados y otros productos. Esto ha sido usado por los especialistas como un arma esencial para evaluar la eficacia de acaricidas y otras sustancias químicas usadas en el control de la infestación por ácaros, sin embargo el conteo de los ácaros no necesariamente se correlaciona con la exposición alérgica -especialmente cuando hay variaciones en la población de ácaros por la estación climática- (20) por esta razón se han desarrollado métodos inmunoquímicos que reemplacen los métodos biológicos, siendo la referencia estándar el método ELISA para alérgenos específicos, sin olvidar la existencia del inmunoblot para IgE (anticuerpos específicos), o la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en la detección proteica. (21)

Desde su introducción en los años 80's, el ELISA ha sido desarrollado para los principales alérgenos introdomiciliarios, incluyendo grupo 1 y 2 de alérgenos para ácaros, Fel d 1, Can f1, Bla g 1, y Bla g 2. Esta prueba es cuantitativa y determina la exposición en términos de ng o µg de alérgeno en el polvo o en el aire. (22) Existen cinco formas para controlar los ácaros del polvo: Eliminar los reservorios de ácaros del polvo, control de la humedad, uso de sustancias químicas que maten o desnaturalicen los ácaros, exponer la ropa de cama, los muebles y los colchones a calor o frío y limpiar las alfombras regularmente usando una aspiradora de alta eficiencia (HEPA) con filtro o doble bolsa recolectora. Después de analizar todas estas formas de control físico y químico salta a la vista que la menos dispendiosa para los pacientes pudiera ser el uso de una sustancia química con propiedades acaricidas. (18) Hay que tener en cuenta que algunos estudios controlados han mostrado reducción en los niveles de alérgenos. (23,24) Otros han mostrado reducción insuficiente - estos contienen benzoato de bencilo - (25, 26, 27,28) como para justificar su uso. Los acaricidas no destruyen todos los ácaros particularmente los que se localizan en las alfombras y muebles, solo disminuyendo pobremente. Por otro lado el ácido Tánico ha mostrado reducciones sustanciales en los niveles de alérgenos, pero estos beneficios son temporales. (29,30) Para la aplicación de ambos acaricidas, es requerido que su aplicación sea repetitiva para mantener los efectos. Casos de sensibilización en piel han sido descritos en el personal de investigación que aplica las sustancias acaricidas pero ninguna alteración en la salud ha sido relacionada con estos productos en los ocupantes de las casas tratadas.

IMPACTO ESPERADO

Impacto Científico y Tecnológico

Aporta al control ambiental un nuevo desarrollo tecnológico de la industria nacional para la eliminación de los ácaros, implicados en el desarrollo y desencadenamiento de las afecciones alérgicas.

Impacto Académico

El desarrollo de este proyecto estará consolidando una línea de Investigación del grupo. Permitirá el desarrollo y formación de un joven investigador de nuestro programa

62
149

Institucional Semillero de Investigadores. Permitirá desarrollar una tesis de pregrado a dos estudiantes de química y farmacia de la universidad del Atlántico.

Impacto Social

La utilización por parte de los usuarios directos de este producto (pacientes asmáticos) mejorará la calidad de vida al disminuir el número de crisis asmáticas, y por ende el número de visitas a la sala de urgencia.

Impacto Económico

La data científica generada por este proyecto servirá de base para comercialización del mismo, generando así nuevos ingresos y posibles fuentes de empleo. La utilización del producto dentro del ecosistema intradomiciliario de los pacientes asmáticos disminuyendo los costos de tratamientos.

USUARIOS DIRECTOS E INDIRECTOS POTENCIALES DE LOS RESULTADOS DE LA INVESTIGACION:

Como claramente queda establecido, los usuarios directamente beneficiados de este proyecto serían nuestros pacientes alérgicos, pues contarían con una gran herramienta de control ambiental intradomiciliario, logrando con esto un adecuado control clínico de su patología alérgica. Todo esto redundando en un mejoramiento en la calidad de vida y rendimiento tanto laboral como escolar del paciente.

Usuarios indirectos: sería la industria farmacéutica, la cual pudiera valerse de otras instituciones tanto académicas como hospitalarias, implementando programas de fomento y prevención en control ambiental dirigido a pacientes alérgicos y sus familiares.

3.2 MARCO TEÓRICO

Actualmente se considerará el asma como una enfermedad crónica inflamatoria de las vías aéreas en las cuales los mastocitos , Eosinófilos , linfocitos T, macrófagos , Neutrófilos y células epiteliales juegan un papel fundamental en el proceso inflamatorio ocasionado por episodios de sibilancias, disnea, pecho apretado, producción de esputo y accesos de tos, los cuales pueden ceder solos o con tratamiento . Esta inflamación crónica mantiene a las vías aéreas en un estado de hiperreactividad permanente que ocasiona obstrucción y limitación de flujo de las vías aéreas mediante, alteraciones en la integridad del epitelio, anormalidades en el control del sistema nervioso autónomo sobre el tono muscular de la vía aérea , hipersecreción de moco, cambios en la función muco ciliar e incremento en la respuesta del músculo liso de la vía aérea (17,31) ; y todo esto ocurre al ponerse en contacto el individuo con agentes etiológicos desencadenantes, los cuales pueden ser alérgenos inhalados (alérgenos de animales, ácaros de polvo, alérgenos de cucaracha, hongos y alérgenos extradomiciliarios), exposición ocupacional irritantes, otros . (17). Sin dejar de tener en cuenta la genética del paciente como factor etiológico. La mayoría de estos agentes desencadenantes los podemos encontrar inmersos entre el medio ambiente

intradomiciliario, la mayor parte de estos agentes biológicos incluye ácaros, insectos, pólenes, virus, bacterias y hongos. En la actualidad el lugar de trabajo de las personas se ha trasladado de las oficinas a las casas con el uso de tecnologías como el Internet, por lo tanto estas personas estarían expuestas a estos agentes por mayor tiempo.

Las sustancias alergénicas pueden ser encontradas en la mayoría de los ambientes intradomiciliarios y métodos inmunoquímicos han sido desarrollados para identificar y estimar tanto sus concentraciones en el aire, como en el polvo. (32, 33, 34, 35, 36, 36, 37,38). Estas técnicas nos ayudan a comprender la distribución intradomiciliaria de los alérgenos tanto a determinar sus concentraciones. Un 60% de hogares en nuestra ciudad son poseedores de mascotas como gatos, perros, aves entre otras, (39). Existen también los tapetes, alfombras, muebles con cobertores; estos factores sumados a la temperatura de nuestro medio y la humedad relativa proveen un hábitat ideal para el crecimiento de ácaros del polvo, cucarachas, hongos entre otros, los cuales contaminan lugares claves en el ecosistema intradomiciliario (colchones, clóset, almohadas, ductos de aire acondicionado etc.)

De los anteriormente enumerados tal vez los mas estudiados durante mas tiempo son los ácaros del polvo casero, los cuales han sido reconocidos como agentes desencadenantes del asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica desde mucho tiempo atrás. En 1921 fue demostrado que el extracto del polvo de casa era capaz de producir una prueba cutánea positiva por intradermo reacción (41). Esta asociación entre el polvo de casa y el asma posteriormente se ha confirmado científica y clínicamente (42). En la literatura se encuentra informado la asociación entre dermatitis atópica, tanto en niños como en adultos y la sensibilización a los antígenos de ácaros evidenciada a través de la prueba cutánea positiva a los ácaros (43). Sin embargo solo hasta 1964 se consideró que la fuente de alérgeno mas importante del polvo de casa estaba representado por los ácaros - ***Dermatophagoides***- (44). Estos animales microscópicos, tienen una longitud aproximada de un 0.3 mm; se alimentan de la queratina proveniente de la descamación de la piel del humano, son miembros del orden ***Acaridae***, animales estrechamente relacionados con los arácnidos. Voorhorst en 1967 sugirió que el alérgenos más importante eran los secretados y excretados por los ácaros (45). Posteriormente Chapman y col. demostraron que las heces de los ácaros son la fuente más importante de alérgenos y que el 95% de los alérgenos acumulados en los cultivos de ácaros son derivados de sus partículas fecales. (40) Sin olvidar también que hay proteínas alergénicas en el cuerpo de los ácaros (exoesqueleto). Las condiciones óptimas para el crecimiento de estos son temperatura entre los 22 y 26° C y 75% de humedad relativa. Su ciclo de vida puede ser alargado o acortado solamente con aumentar o disminuir la temperatura y la humedad, ellos necesitan una humedad relativa para sobrevivir entre el 70 y el 80%, no pudiendo vivir con un porcentaje menor del 50%. *D. farinae* parece sobrevivir mejor en ambientes secos que el *D. pteronyssinus*. La altitud también afecta su supervivencia pero esto es debido a los efectos de esta sobre la temperatura y la humedad más que de la altitud por sí misma. En países como Suiza y Francia a unos 1.200 mts. De altitud, las especies y la cantidad de ácaros comienzan a disminuir, debido a la disminución de la temperatura y de la humedad absoluta, traduciéndose esto en una mejoría clínica de los pacientes asmáticos sensibles a ácaros al ser transferidos a ciudades de mayor altitud. Sin embargo esto no ocurre en las regiones montañosas de los Andes como Perú o Colombia donde la alta humedad promueve el crecimiento de los ácaros y la sensibilización a estos.

Hoy en día está plenamente comprobado que *Dermatophagoides ssp* es la fuente mas importante de alergenos como factores desencadenantes del asma y otras enfermedades alérgicas (40). Muchos métodos se han utilizado y ensayado para controlar la densidad de la población de ácaros en las casas. Los métodos incluyen el lavado de la ropa con temperaturas por encima de 100 °C, la aspiración de las alfombras, los colchones y las almohadas, el forro de estos últimos con materiales de polivinilo, la regulación de la humedad y la temperatura al interior de la recámara, y otros espacios del ecosistema hogareño del paciente. Finalmente en los últimos años, el uso de métodos físicos y químicos para producir la muerte de estos especímenes. Varios estudios han demostrado resultados ineficaces y algunas veces contradictorios en el uso de procedimientos primarios, caseros como son la aspiración de las áreas y superficies para la eliminación de los ácaros vivos. (46, 47, 48,49). Actualmente existen varios químicos con capacidad acaricida, los cuales reducen significativamente el número de estos animales. (50, 51).

La confirmación de la mejoría que presentan los pacientes en ambientes libres de ácaros ha sido confirmada por varios investigadores, hasta el punto de demostrar la remisión y la normalización de la función pulmonar a través de las pruebas funcionales pulmonares. (50, 51,52). Actualmente existen problemas con estos acaricidas. En primera instancia el acaricida ideal no se tiene .Los actualmente existentes tienen potencialmente capacidades de lesionar los tejidos orgánicos. Estos estudios han sido realizados en el modelo murino. De todos, los más estudiados y los que se aceptan sin polémicas para su uso en humanos son: metil pirimofostos; una mezcla química conteniendo ácido benzoico y polímeros acrílicos (53, 54,55) Paralelo a estos últimos, un fungicida, la natamicina, se ha utilizado por sus potentes efectos acaricidas. (56).

Investigaciones clínicas acerca del efecto de un producto acaricida que contiene entre sus componentes Benzoato de Benzilo llevado a cabo en una gran cantidad de pacientes, arrojaron resultados positivos. Los pacientes de este estudio se les hizo monitoreo médico durante 1 a 2 años después de haberse expuesto a las aplicaciones con Benzoato de Benzilo en su entorno y ambiente hogareño. Sin ninguna excepción los valores de una prueba cuantitativa (Acaréx TM) que determinan los valores de alergenos de ácaros presentaron una disminución significativa después de 3 meses, indicando la eliminación efectiva de los ácaros presentes en el polvo doméstico por medio del tratamiento con Benzoato de Benzilo y consecuentemente la reducción de las excretas conteniendo el alergen. Los mejores resultados se obtuvieron al aplicar este producto farmacéutico en alfombras, resultados menos favorables fueron obtenidos al aplicarlo en sofás y en muebles no tapizados. Después de la aplicación todos los pacientes que habían sido previamente reportados como sensibles a los ácaros monovalentes presentes en el polvo doméstico, reportaron mejorías en los síntomas que habían estado sufriendo (ojos, nariz, bronquios). Efectos secundarios provocados por las aplicaciones de benzoato de benzilo o sensibilización a este químico no han sido observadas. (57).

Otro ensayo encontrado en la Literatura muestra que examinando el polvo doméstico con el propósito de identificar antígeno del ácaro (Der p1) utilizando prueba semicuantitativa que contiene guanina (prueba acarex), después de 9 meses de tratamiento, la media de los niveles Der p 1 disminuyó un 70% comparando el grupo en tratamiento. En el grupo control el resultado final de la prueba de acarex no mostró correlación con respecto a los

niveles Der p1, pero este resultado no puede reemplazar las pruebas antigénicas cuando se necesitan datos exactos. (58).

En general se puede decir que existen actualmente muchos ensayos, los cuales demuestran indiscutiblemente que el uso de químicos, con capacidad acaricida, reducen la población de estos animales en el ecosistema de los pacientes con alergia a ellos, y que de esta forma se coadyuva a través del manejo ambiental, el tratamiento integral de los pacientes con enfermedades alérgicas, ya que las medidas de control efectivas deben probablemente incluir la movilización de los residuos fecales de los ácaros muertos, además de la reducción de las poblaciones de ácaros vivos. La disminución de la exposición al alérgeno puede ser efectiva tanto en el paso inicial de la sensibilización como en las subsecuentes exposiciones con el acaricida. (59).

En el momento actual, está claro que el manejo del medio ambiente en la búsqueda del control de los ácaros del polvo, constituyen la medida más importante en términos de impacto sobre la morbilidad de las enfermedades alérgicas respiratorias y por consiguiente representa una vía de mejoramiento integral a la salud del paciente, en la búsqueda de una calidad de vida superior a su estado mórbido (60).

En la actualidad esta clase de productos farmacéuticos no están disponibles en el entorno de los países latinoamericanos. Solo se encuentran en el mercado de países del primer mundo (EE.UU., Inglaterra y otros). En general 1 gr. de productos que contienen benzoato de benzilo como integrante principal de mezclas químicas (acaricidas) tienen un costo muy elevado lo que impide su utilización en los diferentes estratos sociales. Esta situación se ve reflejada en la imposibilidad de utilizar este producto de la Biotecnología de la salud en países como Colombia.

Nuestra propuesta, permite corroborar de manera objetiva y científica la desnaturalización de fracciones proteicas de tres tipos de ácaros: *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronissinus* y *Dermatophagoides farinae* mediante una prueba relativamente económica como es el Inmunoblotting usando suero de pacientes previamente sensibilizados a dichos antígenos de esta manera quedará demostrada una vez mas la efectividad de la nueva mezcla acaricida Atlasac, además permitirá obviar los posibles sesgos que pueden presentar la recolección de datos clínicos de los pacientes como pudiera ser la mejoría clínica lo cual pudiera deberse a un nuevo esquema de tratamiento. Todo lo anterior expuesto permitirá iniciar la producción del nuevo agente farmacéutico que redundará en un mejor manejo y control de las enfermedades alérgicas.

3.3 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto denaturalizante de un mezcla química acaricida (ATLASAC) sobre las fracciones proteicas alergénicas, de las especies de ácaros *Blomia Tropicalis*, *Dermatophagoides Pteronissinus* y *Dermatophagoides Farinae*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Demostrar mediante la electroforesis SDS/PAGE el defecto de la alteración de la estructura proteica *Blomia Tropicalis*, *Dermatophagoides Pteronissinus* y *Dermatophagoides Farinae* tanto de la mezcla química como de cada uno de sus componentes.

Evaluar el efecto denaturalizante y degradante de la mezcla mediante inmunoblotting, utilizando sueros de pacientes alérgicos y controles para evidenciar la ausencia de epítopes alergénicos en cada una de las especies.

3.4 MATERIALES Y METODOS

Población estudiada, muestras de Suero

Se tomarán 15 sueros de individuos alérgicos voluntarios quienes hayan tenido prick test positivo a *B. tropicalis*, *D. pteronissinus* y *D. farinae*. Como control se utilizarán 15 sueros de individuos no alérgicos con prick test negativo a estos extractos. Estas muestras de suero serán guardadas a -80°C hasta su uso.

Basándonos en este marco de referencias y en los aspectos epidemiológicos y clínicos, se realizó la síntesis de una mezcla química con efecto acaricida (Atlasac) de lo cual nace la necesidad de evaluar el verdadero efecto desnaturalizante de la mezcla, por lo tanto consideramos prudente el desarrollo de un trabajo de investigación que demuestre el efecto desnaturalizante de Atlasac sobre los antígenos proteicos de tres especies de ácaros: *Blomia Tropicalis*, *Dermatophagoides pteronissinus* y *Dermatophagoides farinae* mediante un método objetivo relativamente económico como es el inmunoblotting para lo cual se llevarían a cabo los siguientes pasos.

Fuente de ácaros

Las tres especies de ácaros que se utilizarán en este estudio se obtendrán a partir de muestras de polvo tomadas de los colchones de las habitaciones de diferentes pacientes alérgicos a los ácaros. El cual serán recolectadas con una aspiradora manual (Nilfisk. TM) en un área de 1 a 2 m² guardando una proporción de 0.5 m²/min. Para la recolección de las muestras de polvo se utilizará una bolsa de recolección (en la aspiradora) por casa, con el fin de evitar la contaminación de las muestras. En cada habitación, durante la toma de muestras, se registrará la temperatura y la humedad. Se determinará el número de ácaros por cm² de superficie aspirada. Estas muestras serán observadas en un estéreo microscopio para identificar y separar las diferentes especies de ácaros.

Cultivo de los ácaros

Los ácaros se aíslan de las muestra de polvo tomadas de los colchones de los pacientes, se toman de dos a tres parejas por cada especie de ácaro y se cultivan por separado en cajas de petri, tomando la precaución que no se contaminen con otras especies de ácaros.

Como medio de cultivo se utiliza alimento para peces (Tetramin[®]). Con el objetivo de eliminar posibles contaminantes del medio de cultivo, este se calienta 60 °C por una hora. Se utilizará un medio fino separado por un tamiz de 125 µ el cual servirá de alimento para los ácaros, también se le adicionará el Tetramin en hojuelas con el objetivo que les sirva de medio de soporte o refugio. Una vez la población de ácaros a crecido se pasan a Erlenmeyer con el objetivo de cultivarlos a gran escala. Los Erlenmeyer se cubren con dos capas de papel para permitir la ventilación. Se mantendrán a 30 °C y una humedad relativa promedio del 80%.

Recolección de los ácaros

La recolección de los cultivos de ácaros se realizará cuando el cultivo haya alcanzado las cuatro semanas de edad, se observan en el estéreo microscopio para mirar su crecimiento y su pureza. Los ácaros se separan utilizando un juego de tamices de 500 μm y 125 μm con un agitador mecánico, se realizará una agitación por 20 minutos. Los ácaros retenidos en el tamiz de 125 μm serán purificados utilizando el aparato de Tullgren modificado. El cual consiste en cinco capas de gasa colocadas sobre un embudo colocado en la parte superior de un tubo Falcón de 15 ml, se coloca una bombilla de 60W a una distancia de 50 cm. de la parte superior del cultivo por dos horas. Debido a que los ácaros son fotofóbicos se desplazan hacia el interior del tubo. Los ácaros purificados serán guardados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Los ácaros y las partículas de polvo menores de 120 μ se utilizarán para cultivos subsiguientes.

Preparación de extractos alergénicos

Los extractos alergénicos se prepararán siguiendo un método previamente establecido (61). Los ácaros adultos se someten a desengrasado con éter anhídrido en un extractor soxlet y se secan a temperatura ambiente. Luego de ser desengrasados se someten a extracción con bicarbonato de amonio 0.1M en una relación 1:20 peso/volumen por 24 horas a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. El extracto se clarifica mediante centrifugación a 7.000 revoluciones por minuto (r.p.m.) y se dializa por 16 horas a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agua destilada utilizando una membrana de 3.500 dalton de punto de corte (Spectrum Medical Industries, Inc. los Angeles, California). Los extractos dializados se centrifugan y se filtran utilizando una membrana de 0.22 μm (Millipore Corporation, Beldford, MA) y posteriormente se liofilizan y se almacén a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Cuantificación de las proteínas totales presentes en el extracto alergénico.

Las proteínas en el extracto se determinaran por el método macroensayo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Hercules, CA) para el cual se prepara una solución del colorante diluida 1:5 y se le adicionan 100 μl de la muestra y se lee la densidad óptica (DO) a 595 nm. La concentración de proteínas se determina extrapolando la DO obtenida en una curva de titulación (DO vs concentración) construida utilizando un patrón de BSA. La DO obtenida es proporcional a la cantidad de proteína presente.

Electroforesis SDS-PAGE e immunoblotting

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% y el immunoblotting se realizarán de acuerdo a un método previamente establecido en un Mini-Protean II cell (Bio Rad, Hercules, CA) (48). El gel de corrida presenta la siguiente composición:

Para un volumen total de 15 ml.

Agua.....	3.4 ml
Acrilamida -bisacrilamida al 30 % ...	7.5 ml
Tris 1.5 M, pH 8.8	3.8 ml
SDS al 10%.....	150 µl
Persulfato de amonio.....	150 µl
Temed.....	6.0 µl

El “stacking gel” al 4.2 %, presenta la siguiente composición:
 Para un volumen total de 10 ml

Agua.....	6.0 ml
Acrilamida - bisacrilamida al 30%	1.4 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	2.5 ml
SDS al 10%.....	100 µl
Persulfato de amonio	50.0µl
Temed.....	10.0µl

Las muestras se disuelven en buffer sample 2 X en una relación 1:1 y se somete a calentamiento en un baño a 95 °C por cinco minutos. El buffer sample presenta la siguiente composición:

Agua.....	2.4 ml
Tris-HCl pH 6.8.....	2.0 ml
Glycerol.....	1.6 ml
SDS 10%.....	3.2 ml
2ß-mercaptoetanol... ..	0.8 ml
Azul de bromofenol....	20 mg.

La electroforesis se corre a 200 voltios utilizando un buffer electrodo 1X, hasta que salga el colorante de las muestras, el cual demora en salir un tiempo aproximado de 45 a 50 minutos.

Composición del buffer electrodo 5X pH 8.3

Tris base	9.0 g
Glicina.....	43.2 g
SDS al 10%.....	30 ml
Agua csp.....	600 ml

Para el inmunoblotting las proteínas del extracto alérgico separadas en la electroforesis, se transfieren del gel a una membrana de nitrocelulosa (Trans - blot NC, 0.45µm, BioRad, Hercules CA). El buffer utilizado en la transferencia tiene la siguiente composición :

Tris base.....	3.03 g
Glicina.....	14,4 g
Metanol.....	200 ml
Agua c.s.p..	1.000 ml.

Se realiza la transferencia por dos horas a 200 Amp en un Mini trans-blot (BioRad)
 Las membranas se saturan con PBS-BSA al 3% por dos horas, con el objeto de evitar uniones inespecíficas y se lavan dos veces con PBS-T y una vez con PBS solo. cada lavado se realiza por 10 minutos. Cada membrana se incuba con dos ml de suero de los pacientes

alérgicos y sueros controles diluidos 1:5 en PBS y con BSA como control adicional. La IgE unida se visualiza mediante incubación de las tiras con Anti-IgE humana marcada con fosfatasa alcalina, y los resultados son visualizados utilizando como sustratos cromogenicos NBT / BCIP.

Esto nos permitirá poder evidenciar el fraccionamiento de las partículas proteicas y de esta manera poder establecer con certeza la eficacia denaturalizante de la mezcla química acaricida Atlasac.

RESULTADOS ESPERADOS

1. El resultado esperado será demostrar los efecto degradantes y denaturalizantes de la mezcla química ATLASAC.
2. Producir data científica que consolide este producto como un nuevo desarrollo biotecnológico nacional.
3. Producción de dos artículos científicos, uno nacional y otro internacional. Además de la presentación de este trabajo en dos congresos internacionales.

ESTRATEGIAS A UTILIZAR PARA LA TRANSFERENCIA DE LOS RESULTADOS (CONOCIMIENTO BASICO, APLICADO O TECNOLOGIA) A LOS USUARIOS POTENCIALES.

La realización de este proyecto consolidará un producto de biotecnología en el sector salud lo cual beneficiará la industria farmacéutica nacional y las entidades gubernamentales encargadas de la asistencia y la prevención de estas enfermedades, esto se logra por la generación de un mercado donde tanto la demanda (pacientes alérgicos) como la oferta (industria farmacéutica) se beneficiarán. **Los resultados de este proyecto podrán servir para evaluar posteriormente un desarrollo tecnológico nacional y con posterioridad su impacto en la salud pública.**

ESTRATEGIA DE COMUNICACIÓN:

Al concluir el trabajo, a partir del documento final se publicarán dos artículos científicos, uno nacional y uno internacional, en revistas indexadas de prestigio. Se presentará además en dos congresos internacionales. La copia de todo esto será enviada a Colciencias.

TRAYECTORIA DEL GRUPO INVESTIGADOR Y PRESENTACION DEL EQUIPO DE INVESTIGADORES

El grupo de investigadores inició sus actividades en ciencia y tecnología en esta institución en septiembre de 1.991; La Universidad en sus planes de desarrollo había institucionalizado la creación del mismo. Después de la capacitación de un recurso humano en el exterior y en otras ciudades del país, los funcionarios a su retorno fueron vinculados como profesores investigadores con dedicación de tiempo completo. El Investigador principal de la presente propuesta tiene una experiencia de 25 años en docencia universitaria, después de su

21
158

entrenamiento en Inmunología Clínica en la ciudad de México, inició su producción en Investigación científica. Durante sus tres años de permanencia en la división de Inmunogenética del departamento de patología de la escuela de medicina de la Universidad de Harvard, participó en tres congresos en Los Estados Unidos y logró publicar cinco trabajos científicos en reconocidas revistas de alta calidad científica: Journal of Experimental Medicine, Human Immunology, European Journal of Immunology y Archive of General Psychiatry. Igualmente ha escrito tres capítulos en textos de Reumatología e Inmunología. El mencionado investigador ha dirigido cuatro tesis de postgrado y seis de pregrado en esta universidad y es el gestante y creador del laboratorio de Inmunogenética y biología molecular de la Universidad del Norte, programa que fue elevado a Centro de investigaciones en marzo de 1.995, con resolución rectorial de la Universidad del Norte. Es el responsable en el programa de ciencias y tecnología aprobada por resolución No. 003 del Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología del 24 de Noviembre de 1.995. Durante los últimos seis años, tanto el investigador principal como los otros miembros del grupo han producido los siguientes resultados:

ARTICULOS:

Consenso Colombiano Sobre Rinitis Alérgica. Editores: Eduardo Egea, Elizabeth García, Augusto Peñaranda.

Primera edición, 2000 ISBN 958-33 - 1567-2

Hipersensibilidad a los alérgenos de la cucaracha en una muestra de pacientes asmáticos de la ciudad de Barranquilla.

Eduardo Egea, Gloria Garavito, Homero Sanjuán, Arcelio Blanco.

Rev.Asoc.Colombiana de Alergia asma e inmunología 1999 Vol. 8 No. 2 pp. 9-13

Significado biológico de la reactividad cruzada entre el alérgeno mayor de cucaracha y la tropo miosina de artrópodos y mamíferos.

Eduardo Egea, Gloria Garavito.

Rev.Asoc.Colombiana de Alergia asma e inmunología 1999 Vol.8 No.2 pp 27-30

Inmunopatología de la urticaria Crónica.

Eduardo Egea.

IATREIA (Revista Médica Universidad de Antioquia) Vol.12 Suplemento 1- Junio 1999

Prevalencia de la mutación del factor V de la coagulación (factor V Leiden) en donantes de banco de sangre en cuatro ciudades colombianas.

Andrés Varela, Amaia Bilbao, Carlos Fernando García, Mónica Duarte, Ricardo Zerda, Marcela Salazar. Santafé de Bogotá. Eduardo Egea. Barranquilla.

Acta Médica Colombiana Vol.25 No. 1 Enero/Febrero 2000.

Association of HLA-DRB1*1602 and DRB1*1001 with Takayasu arthritis in Colombian mestizos as markers of Amerindian ancestry.

M. Salazar, A. Varela, L.A: Ramirez, O. Uribe, G.Vasquez, E. Egea, E.J. Yunis, A. Iglesias-Gamarra.

International Journal of Cardiology 75(2000) S113-S116.

A new HLA-Cw allele (Cw*0808) found in a Colombian mestizo individual possibly generated by an intralocus/interloci gene conversion.

Carlos Silvera Redondo, Eduardo Gómez Casado, Jorge Martínez Laso, Eduardo Egea, Gloria Garavito, Pilar Varela, Arantza Pacho, Juan Moscoso, Isabel Rubio, Antonio Arnaiz. Immunogenetics (2000) 51: 1053-1057.

Restricción étnica y geográfica de la infección causada por el virus HTLV-II y su asociación con el polimorfismo del complejo mayor de histocompatibilidad en tres subpoblaciones del Caribe colombiano.

Eduardo Egea, Gloria Garavito, Leonor Angel, Dinorah Callejas. Barranquilla. Abnan Blank, Cali. Antonio Iglesias, Santa fe de Bogotá. Luis Caraballo, Silvia Jiménez, Cartagena de Indias, Colombia. Acta Médica Colombiana Vol. 24 No.4-julio-Agosto-1999.

Estudio de prevalencia de enfermedades infecciosas VHA- VHB- VIH- HTLV en una comunidad afrocolombiana del Litoral Caribe- Isla.Barú.

Eduardo Egea, M. Martinez, A. Durango, G.Garavito, L.Angel, C. Valverde. Salud Uninorte. Barranquilla (Col.), 14 (1): 3-8. 1999

Evaluación de la inmunogenicidad de una vacuna recombinante antiviral hepatitis B en mujeres adultas sanas.

MaríaT. Herrera Mendoza, Jaime Escobar López, Clara Saavedra Abril, Claudia Robles Roa, Fritz Gempeler, Eduardo Egea Bermejo, Antonio Iglesias Gamarra. Biomédica 1999; 19(2): 136-143.

ABSTRACT

Sensitization to cockroach antigens is a risk factor associated to the severity of asthma: results from an admixed Hispanic population study.

E. Egea, G.Garavito, S. Rosero, F. Tirado, E.E. Egea. European Journal of Allergy and Clinical Immunology Allergy, supplement 68 and Volume 56. Mayo 9-13, 2001

Efecto Acaricida de una mezcla química.

G. Cuadros, D. Maestre, J. Guevara, G. Garavito, E. Egea. IATRIA(Revista Médica Universidad de Antioquia) Vol.13-No.2 Junio 2000

Cockroach Hypersensitivity in the Pediatric Emergency Room Asthma in a City of the Caribbean Colombian Area.

Eduardo Egea, Margarita Olivares, Gloria Garavito, Fernando Tirado. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. Vol.105 No. 1 Pt-2 - 2000

Estudio de casos y controles sobre factores asociados al diagnóstico de Asma en Bogotá, Cali y Barranquilla.

Dennis R., Caballero L., Córdoba H., Aristizábal G., Rodríguez MN., Rojas MN., Egea E. Revista Colombiana de Neumología Vol. 12 Agosto-2000

Prevalencia de Asma y su Severidad en cinco ciudades de Colombia.
Dennis Rodolfo, Caraballo L., García E., Caballero A. I., Aristizabal G., Córdoba H.,
Rodríguez MN., Rojas MX., Blanco A., Egea E., Orduz C., Verbel C.
Acta Médica Colombiana Vol.25 Sep.-Oct.2000

HLA Class I Alleles in Latin-American Population.
26th Annual Meeting American Society for Histocompatibility and Immunogenetic 150-15
Oct. -2000

A new HLA-CW allele (CW*0808) found in a Colombian Mestizo individual possibly
generated by an intralocus/interloci gene conversion.
Carlos Silvera, Eduardo Gómez, Jorge Martínez, Eduardo Egea, Gloria Garavito, Pilar
Varela, Arantza Pacho, Juan Moscoso, Isabel Rubio and Antonio Arnaiz.
Springer-Verlag 2000

Genetics Patterns of MHC-DRB1* and HLA DQ B1* Alleles in Colombian mestizo
Children with juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA)
Gloria Garavito, Eduardo Egea, Clara Malagon, Oscar de la Cruz, Oscar Uribe, Luis
Ramirez, Edgar Navarro, Antonio Iglesias.
ACR 63rd Annual Scientific meeting 1999 Submission Form.

Patrones genéticos del MCH: alelos del HLA DRB1* y HLA DQB1* en niños mestizos
colombianos con artritis reumatoidea juvenil.
G. Garavito, E. Egea, C. Malagon, O.F. de la Cruz, O. Uribe, L.A.Ramirez, A. Iglesias.
Revista Colombiana de Reumatología Vol. 6 No.2, Junio 1999

Desde 1.998, el grupo inicia la línea de investigación inmunobiológica de las enfermedades
alérgicas, en el marco de esta línea se tienen actualmente establecido relaciones con la
Universidad del Sur de la Florida USF. La capacidad de Gestión en Ciencia y Tecnología se
materializa en el logro de la financiación de cuatro proyectos de investigación científica
destacándose Investigación y Desarrollo de una mezcla química para la generación de un
producto farmacéutico con efecto acaricida (ATLASAC), que permite la formulación de
esta nueva propuesta.

3.5 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 11	Mes 12
Cultivo de Ácaros	X	X										
Recolección de Ácaros			X									
Producción del Extracto				X								
Estandarización de método y técnica.					X	X						
Desarrollo Experimental							X	X				
Análisis y Tabulación de los datos									X	X		
Presentación de Resultados											X	
Publicación												X

BIBLIOGRAFIA

1. WHO. Dust mite allergens and asthma. A World wide problem. International workshop, WHO Int Ass Allergol Clin Immunol; 1987: 6.
2. Woolcock AJ, Peat JK, Trevillion L.M. Changing prevalence of allergies worldwide. In Johansson SGO et al. (Eds.) Progress in Allergy and Clinical Immunology. Vol 3. Seattle: Hogrefe & Huber, 1995, pp. 167-171.
3. Schäfer T, Przybilla B, Ueberle K et al. Frequency of atopic diseases in children and parental predisposition: Results of an epidemiological survey. ACI New 1994; Suppl 2: 170.
4. Dust mite allergens and asthma- a world wide problem. Bull WHO. 66(6), 1988.
5. Caraballo Luis, Cadavid A., Mendoza J. Prevalence of Asthma in a Tropical City of Colombia. Annals Allergy, 68 (6): 525-529, 1992.
6. Vergara C, Caraballo L. Asthma mortality in Colombia. Ann Allergy asthma Immunol. 1998;80:55-60.
7. Egea E., Lázaro M.M., Insignares A., Fernández V. Polimorfismo Molecular de los alelos del DRB1 en pacientes con Asma Bronquial. Congreso Colombiano de Neumología Pediátrica. Cartagena, 1994.
8. Denis R., Caraballo L., García E., Córdoba H. Estudio de casos y controles sobre factores asociados al diagnóstico de asma en Bogotá, Cali y Barranquilla. Revista colombiana de Neumología. Vol. 12 sup. Agosto, 2000.
9. García L., Caballero A., Aristizabal G. Comparación de la prevalencia de síntomas de asma y su severidad en Santa Fe de Bogotá, Cali y Barranquilla. Revista colombiana de Neumología. Vol. 12 sup. Agosto, 2000.
10. Comunicación institucional. Estadísticas de los servicios médicos prestados en el Instituto de los Seguros Sociales. Seccional Atlántico. Vigencia 1996.
11. Egea E., et al. HLA Class II. I Antigens in Patients with Allergic Asthma. Annual Meeting ACAI. Atlanta, USA, 1993.
12. Egea E., Iglesias. A., Acaros en Colombia y su relación en las Alergias Respiratorias. Colciencias ISSN- 958-608-104-4, 1994.
13. Fernández-Caldas E., Baena C., Cuatasneus Sensitivity to six mite species in asthmatic patients from five latin american countries. J. Invest Allergol Clin Immunol. 1993;3:245-249.
14. Fernández-Caldas E., Puerta L. Mite fauna, Der p I, Der f I and Blomia tropicalis allergen levels in a tropical environment. Clin Exp Allergy. 1993;23:292-297.
15. Cuadros G., Maestre D. Efecto acaricida de una muestra química. IATREIA. Vol. 13 No.2, 2000.
16. Caraballo L., Puerta L. Identification of Allergens from mite Blomia tropicalis. Clin Exp Allergy. 1993;24:1056-1060.
17. Expert Panel Report 2, Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. NIH Publication No. 97-4051 July 1997.
18. Chapman M. Eliminating Allergy triggers. Patient Care - April 15, 2000, vol 34 No. 7.
19. Chapman M. Environmental allergen monitoring and control. Allergy, 1998;53:48-53.
20. Mollet JA, Vailes LD, Evaluation of German cockroach (Orthoptera: Blattellidae) allergen and seasonal variation in low income housing. J Med Entomol 1997; 34:307-11.
21. F.C. Yi. Culture of Blomia Tropicalis and IgE Immunoblot Characterization of its Allergenicity. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology (1999) 17; 189-194.

22. Chapman MD. Immunochemical And Molecular Methods for defining and measuring indoor allergens: in dust and air. *Pediatr Allergy Immunol* 1995;6:8-12.
23. Dietemann A. A double-blind, placebo controlled trial of solidified benzyl benzoate applied in dwellings of asthmatic patients sensitive to mite: clinical efficacy and effect on mite allergens. *J. Allergy Clin Immunol* 1993;91:738-46.
24. Lau_Schadendorf S. Short-term effect of solidified benzyl benzoate on mite-allergen concentrations in house dust. *J. Allergy Clin Immunol* 1991;91:738-46.
25. Huss R. Mite control with acaricide fails. *J. Allergy Clin Immunol* 1992;94:27-32.
26. Manja A. The effects of a single treatment of an acaricide. Acarosan, and a detergent, Metsan, on Der p I, Allergen levels in the carpets and mattresses of asthmatic children. *S. Afr Med j* 1994;84:278-80.
27. Crank P. Concentration of the domestic house dust mite allergen Der p 1 after treatment with solidified benzyl benzoate (Acarosan) or liquid nitrogen. *Thorax* 1993;48:10-3.
28. Woodfolk J. Chemical treatments of carpets to reduce allergy: a detailed study of the effects of tannic acid on indoor allergens. *J. Allergy Clin Immunol* 1994;94:19-26.
29. Tovey E. Changes in mite allergen Der p I in house dust following spraying with a tannic acid/acaricide solution. *Clin Exp Allergy* 1992; 22:67-74.
30. Warner JA. Allergen avoidance in the homes of atopic asthmatic children: the effect of Allersearch DMS. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:279-86.
31. Canadian Asthma consensus report. 1999. Supplement to CMAJ (Canadian Medical Association Journal) 1999; 161(11 Suppl). Canadian Medical Association.
32. Chapman MD. Monoclonal immunoassays for mayor dust mite (*Dermatophagoides*) allergens Der P I and Der f I, and quantitative analysis of the allergen content of mite and house dust extracts. *J Allergy Clin immunol* 80; 184, 1987.
33. Fernández-Caldas. Distribution of indoor allergens. In Lockey RF, Bukantz SC (Eds): *Allergen Immunotherapy*. New York, Marcel Dekker, Inc., 1991, p 69.
34. Chapman MD. Airbone concentrations and particle size distribution of allergen derived from domestic cats (*Felis domesticus*). *Am Rev Respir Dis* 141;361,1990.
35. Platts_Mills TAE. Measurements of airborne allergen using immunoassays. *Immunol Allergy Clin North Am* 9:269, 1989.
36. Pollart SM. Environmental exposure to cockroach allergens: Analysis with monoclonal antibody-based enzyme immunoassays. *J Allergy Clin Immunol* 87: 505, 1991.
37. Schou C, Fernandez_Caldas E. Environmental assay for cockroach allergens. *J. Allergy Clin Immunol* 87:828, 1991.
38. Swanson MC. An Immunochemical approach to indoor aeroallergen quantitation with a new volumetric air sampler: Studies with mite, roach, cat, mouse, and guinea pig antigens. *J Allergy Clin Immunol* 76; 724, 1985.
39. Rosero S. E. Egea, G. Garavito, F. Tirado , E.E. Egea Sensitization to cockroach antigens is a risk factor associated to the severity of asthma : results from an admixed Hispanic population study, , *Allergy, Supplement* 68 vol 56, 2001.
40. Tovey ER. Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature* 289:592, 1981.
41. Kern R.A. Dust Sensitization in bronchial asthma. *Med Clin North Am* 1921; 5:751-8.
42. Spivacke CA, Grove EF. Studies in hypersensitiveness: a study of house dust atopen in asthma. *j Immunol* 1925; 10: 465-70.
43. Vannier WE, Campbell DH. A starch block electrophoresis study of aqueous house dust extracts. *J. Allergy* 1961; 32: 36-54.

44. Voorhost R, Spieksma FThM, Varekamp H, Leupen MJ, Lyklema AW. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergens it produces: identity with the house dust allergen. *J. Allergy* 1967; 39: 325.
45. Voorhost R, Spieksma FThM, Varekamp N. House dust atopy and the house dust mite *pteronyssinus* (Thoussart, 1877). Leiden: Stafleu-s Scientific Pub Co, 1969.
46. Koorsgaard J. Preventative measures in house dust allergy. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125: 80-4.
47. Burr M., Dean BV, Merrett TG, Neale E, St Leger AS, Verrier-Jones ER. The effects of anti-mite measures on children with mite sensitive asthma: a controlled trial. *Thorax* 1980; 35: 506-12.
48. Murray AB, Fergusson APC, Dust free bedrooms in the treatment of asthmatic children with house dust or house dust mite allergy: a controlled trial. *Pediatrics* 1983; 71: 418-22.
49. Walshaw MJ, Evans CC. Allergen avoidance in house dust mite sensitive adult asthma. *Quart J Med* 1986; 58: 199-215.
50. Platts Mills TAE, Chapman MD. Dust mites. Immunology allergic disease and environmental control. *J. Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 755-75.
51. Platts Mills TAE, Tovey ER, Mitchel EB, Moszoro H, Nock P, Wilkins SR. Reduction of bronchial hyperreactivity during prolonged allergen avoidance. *Lancet* 1982, ii: 675-8.
52. Vervloet D, Penaud A, Razzouk H, Senft M, Arnaud A, Boutin C, Charpin J. Altitude and house dust mites. *J. Allergy Clin Immunol* 1982; 69: 290-6.
53. Penaud J, ourrit p, Antran P, Timon-David P, Jacquet-Francillon M, Charpin J. Methods of destroying house dust pyroglyphid mites. *Clin Allergy* 1975; 5: P109-14.
54. Mitchell EB, Wilkins SR, Deighton JM, Platts-Mills TAE. Reduction of house dust allergen levels in the home: use of acaricide pirimphos-methyl. *Clin Allergy* 1985; 15: 235-40.
55. Heller-Haupt A, Busvine JR. Tests of acaricides against house dust mites. *J Med Entomol* 1974; 2: 551-8.
56. Penaud A, Nourrit J, Timon-David P, Charpin J. Results of a controlled trial of paragerm on *Dermatophagoides* spp. in dwelling houses. *Clin Allergy* 1977; 7: 49.
57. Kersten-W; Stollewerk-D; Von- Wahl-PG. Acarex test and acarosan effect in house dust mite allergy in 2 year follow-up. *Pneumologie*. 1992 Jan; 46 (1): 26-31. ISSN 0934-8387.
58. Ridout-S; Twiselton-R; Matthews-S; Stevens-M; Matthews-L; Arshad-SH; Hide-DW. *Br-J-Clin-Pract*. 1993 May-Jun; 47 (3): 141-144. ISSN 0007-0947.
59. Fernandez-Caldas. Autor capitulo de libro: Allergen Immunotherapy. Edited by Lockey R; Bukantz S. Capitulo 4. University of South Florida College of Medicine and James A. Haley Veterans Hospital. Tampa Florida. ISBN 0-8247-8534-7.1991.
60. Platts-Mills TAE, Chapman M.D. Dust Mites: Immunology, allergic disease, and enviromental control. *J Allergy clin Immunol* 1987; 80 (6): 755.
61. Johanson E. Demonstration of allergen components in the storage mite *Lepidoglyphus destructor* by immunoblotting technique. *Int Archs Allergy appl immunol* 1988;85-8-13.

HOJA DE VIDA (RESUMEN)

INVESTIGADOR PRINCIPAL

1. Apellidos : Egea Bermejo Fecha de Nacimiento: Junio 2 de 1951
 Nombre : Eduardo Alberto Nacionalidad: Colombiano
 Correo Electrónico: eegea@uninorte.edu.co C:C: 7.461.593

2. Títulos Obtenidos

Doctor en Medicina y Cirugía M.D., Universidad de Cartagena. 1976
 Especialización en Inmunología , Clínica Instituto Mexicano de los Seguros Sociales, México, 1983.

Post- Doctoral Research Fellow, Division de Inmunogenetica Departamento de Patologia Harvard Medical School of Harvard University, USA, 1990

Maestría en proyectos de desarrollo social, Universidad del Norte ,1997

3. Cargos Desempeñados

Investigador principal grupo de Inmunología y Biología Molecular , 1990-Presente

Profesor de Inmunología , Programa de Medicina , División Ciencias de la Salud , Universidad del Norte, 1990-Presente.

Dirección Ejecutiva FCMN 1993-1995.

Interventor desarrollo del programa de formación y prevención ISLA BARU - FMSD. 1994 - 1995.

Presidente ACAAI 2000 - 2002.

Consejero programa Nacional de Ciencia y Tecnología de ala Salud. Colciencias. 2004-Presente

4. Publicaciones Recientes

- Sensitization to cockroach antigens is a risk factor associated to the severity of asthma: results from an admixed Hispanic population study, E. Egea, G. Garavito, S. Rosero, F. Tirado, E.E. Egea, Allergy, Supplement 68 vol 56, 2001.
- Cockroach Hypersensibility in the pediatric Emergency Room Asthma in a City of the Caribbean Colombian Area. Eduardo Egea , Margarita Olivares, Gloria Garavito , Fernando Tirado.The Journal of Allergy and Clinical Immunology, Vol 105 No 1 , January 200.
- Efecto acaricida de una mezcla química, G. Cuadros, D. Maestre, J. Guevara, G. Garavito, E. Egea., Iatreia Revista Medica Universidad de Antioquia, Vol 13 No 2, Junio 2000.
- Estudio de casos y controles sobre factores asociados al diagnostico de Asma en Bogotá, Cali y Barranquilla . Dennis R., Caraballo L., García . E. Córdoba H. , Caballero A., Aristizabal G. , Rodríguez MN. , Rojas MN, Blanco A. , Egea E. .Revista Colombiana de Neumología, Vol 12 Suplemento Agosto 2000.
- Association of HLA-DRB1* 1602 and DRB1*1001 with Takayasu arthritis in Colombian mestizos as markers of Amerindian ancestry . M. Salazar, A. Varela, L.A. Ramírez, Uribe, G. Vásquez , E. Egea , E.J. Yunis, A. Iglesias-Gamarra. Internacional Journal of Cardiology 75, 2000.

HOJA DE VIDA (RESUMEN)

COOINVESTIGADOR

1. Apellidos : Garavito Lancheros Fecha de Nacimiento: Febrero 11 de 1955
 Nombre : Gloria Tulia Nacionalidad: Colombiano
 Correo Electrónico: ggaravito@uninorte.edu.co C:C: 32.616.516.

2. Titulos Obtenidos

Doctor en Medicina y Cirugía M.D., Universidad Libre de Colombia, 1982
 Post- Doctoral Research Fellow, División de Immunogenetica Departamento de Patologia
 Harvard Medical School of Harvard University, USA. 1990
 Especialización en Diseño y Evaluación de Proyectos en Salud, Universidad del Norte,
 1991.
 Doctorado (PhD), Instituto de Biología Fundamental, Universidad Autónoma de Barcelona,
 España.

3. Cargos Desempeñados

Investigador grupo de Immunologia y Biología Molecular , 1990-Presente
 Profesor de Immunologia , Programa de Medicina , División Ciencias de la Salud ,
 Universidad del Norte, 1990-Presente.

4. Publicaciones Recientes

- Sensitization to cockroach antigens is a risk factor associated to the severity of asthma : results from an admixed Hispanic population study, E. Egea, G. Garavito, S. Rosero , F. Tirado , E.E. Egea , Allergy, Supplement 68 vol 56, 2001.
- Cockroach Hypersensitivity in the pediatric Emergency Room Asthma in a City of the Caribbean Colombian Area. Eduardo Egea , Margarita Olivares, Gloria Garavito , Fernando Tirado.The Journal of Allergy and Clinical Immunology, Vol 105 No 1 , January 200.
- Efecto acaricida de una mezcla química, G. Cuadros, D. Maestre, J. Gevara, G. Garavito, E. Egea., Iatreia Revista Medica Universidad de Antioquia, Vol 13 No 2, Junio 2000.
- A new HLA-Cw allele (Cw*0808) found in a Colombian Mestizo individual possibly generated by an intralocus/interloci gene conversion, C. Silvera, E.Gomez, E. Egea, G. Garavito et al , Immunogenetics (2000) 51.
- Restricción étnica y geográfica de la infección causada por el virus HTLV-II y6 su asociación con el polimorfismo del complejo mayor de histocompatibilidad en tres subpoblaciones del Caribe colombiano , E.Egea , G. Garavito, L.Angel et al , Acta Medica Colombiana, vol 24no 4, Julio/Agosto 1999.

HOJA DE VIDA (RESUMEN)

COOINVESTIGADOR

1. Apellidos : Rosero García

Fecha de Nacimiento: Marzo 26 de 1976

Nombre : Samuel Jesús

Nacionalidad: Colombiano

Correo Electrónico: srosero@uninorte.edu.co C:C: 72.225.717

2. Titulos Obtenidos

Doctor en Medicina y Cirugía M.D., Universidad del Norte 2000

3. Cargos Desempeñados

Asistente de Investigación en Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular,
Universidad del Norte, Septiembre-Diciembre2000.

Medico del Servicio Social Obligatorio, Hospital Universidad del Norte, Febrero2001-Presente.

4. Publicaciones Recientes

Sensitization to cockroach antigens is a risk factor associated to the severity of asthma : results from an admixed Hispanic population study, E. Egea, G. Garavito, S. Rosero , F. Tirado , E.E. Egea , Allergy, Supplement 68 vol 56, 2001.

81
168

HOJA DE VIDA (RESUMEN)

INVESTIGADOR PRINCIPAL

1. Apellidos : Lagares Guzmán Fecha de Nacimiento: Septiembre 5 de 1.966
Nombre : Alfredo Nacionalidad: Colombiano
Correo Electrónico: alfrelagares@yahoo.es C:C: No. 72.149.520 de Barranquilla

2. Titulos Obtenidos

Químico Farmacéutico, Universidad el Atlántico, 1.995
Magíster en Inmunología, Universidad de Cartagena, 2.000

3. Cargos Desempeñados

Profesor Asistente adscrito al Departamento de Farmacia de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad del Atlántico.

4. Publicaciones Recientes

Sensitization to the Mite *Suidasia medanensis* in Asthmatic Patients. Caraballo L, Lagares A, Mercado D, Puerta L, Fernandez -Caldas E. J Allergy clin Immunol. 1999; 103;:S189 (Abstracts).

High-Level Expresion of th *Blomia tropicalis* Allergen, Blo t 13, in *Pichia pastoris*. Puerta L, Jimenez S, Lagares A, Caraballo L. J Allergy Clin Immunol. 1999;103:S185 (Abstracts).

Análisis inmunoquímico de los alergenosen del ácaro *Suidasia medanensis*. Lagares A. Rev. Asoc. Colomb. Alerg. Asma e Inmunol. 1999; 8:49-50.

4. CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS

Todos los objetivos, el general y los específicos se cumplieron Todos y cada uno de los experimentos que se llevaron a cabo durante el desarrollo del proyecto y que demuestran los resultados y logro de estos objetivos, así como las técnicas, los procedimientos y los resultados, están consignados en una bitácora de trabajo, que reposa en el laboratorio de Inmunológica y Biología Molecular de la Universidad del Norte.

5. APEGO A LA METODOLOGÍA

El diseño y el desarrollo de todas las técnicas y procedimientos de laboratorio que se requirieron en el proyecto, cumplieron con los descritos en la propuesta Para la estandarización de los experimentos hubo que validar resultados después de cambiar condiciones químicas y físicas y de ajustar variables dependientes, todas ellas relacionadas con las concentraciones de reactantes químicos

6. REULTADOS:

61 resultados preliminares

Se anexa pdf. Con resultados preliminares presentados en Marzo del 2004. 
 Anexo N° 1



II EtapaAtlasac_procapsuninortecolciencias.pdf

El proyecto se inicio el día 15 de Septiembre del 2002 con la estandarización de acuerdo a una metodología previamente establecida, para ello se prepararon los siguientes reactivos:

- Acrilamida – Bisacrilamida al 30% y se distribuyo en alícuotas de 10 ml en tubos falcón de 15 ml, cubiertos en papel aluminio para protegerlos de la luz, luego se guardo a -20°C .
- Tris HCl 1.5 M, se ajusto a pH 8.8, almacenado a 4°C .
- Tris HCl 0.5 M, se ajusto a pH 6.8, almacenado 4°C .
- Dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS).
- Búfer Simple 2X, el cual contiene Tris 0.5 M pH 6.8, Glicerol al 85%, SDS al 10%, β mercaptoetanol , azul de bromofenol, y se guardo a -20°C .
- Búfer Electrodo 5X pH 8.3, que contiene Tris base, Glicina, SDS al 10% y se almaceno a 4°C .
- Solución colorante la cual esta compuesta de ácido acético al 10%, metanol al 14%, azul de Coomassie al 0.1%, se filtra y se almacenaron a temperatura ambiente (TA).

- Solución decolorante que esta compuesto ácido acético al 10% y metanol al 40%.
- Persulfato de amonio al 10%.

Los experimentos no se iniciaron de forma inmediata debido a que se estaban adelantando los requerimientos de reactivos y equipos necesarios. Las actividades se reanudaron en Febrero 03 del 2003, realizando control de calidad de los reactivos previamente preparados. Los reactivos por calidad y normatividad se prepararon de nuevo. Se realizaron los tramites administrativos para el préstamo de una cámara Mini Protein III del laboratorio de Bioquímica a cargo del Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas.

En Marzo 05/ 2003 se inicio la estandarización de la técnica electroforetica en geles de poliacrilamida al 15% en un volumen total de 15 ml, de la siguiente forma:

Agua.....	3.4 ml
Acrilamida-bisacrilamida al 30 % ...	7.5 ml
Tris 1.5 M, pH 8.8	3.8 ml
SDS al 10%.....	150 µl
Persulfato de amonio.....	150 µl
Temed.....	6.0 µl

Las técnicas y los procedimientos realizados se describen a continuación:

Se colocó en la ¾ parte de los vidrios ensamblados tipo sándwich , usando una pipeta pasteur, y se adiciono una capa de agua de 1 cm de espesor. Se espero a que polimerizara por 5 min. y se procedió a preparar el “stacking gel” al 4.2 %, presenta la siguiente composición para un volumen total de 10 ml :

Agua.....	6.0 ml
Acrilamida-bisacrilamida al 30%	1.4 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	2.5 ml
SDS al 10%.....	100 µl
Persulfato de amonio	50.0µl
Temed.....	10.0µl

Se colocaron peines y se espero a que polimerizara durante 20 a 30 min. Después de 40 min. Se introdujo dentro de la cámara, y se llenó con búfer electrodo 1X. Las muestras se disolvieron en búfer sample 2 X en una relación 1:1 y se sometió a calentamiento en un baño a 95 °C por cinco minutos. El buffer sample presenta la siguiente composición:

Agua.....	2.4 ml
Tris-HCl pH 6.8.....	2.0 ml
Glicerol.....	1.6 ml
SDS 10%.....	3.2 ml
2ß-mercaptoetanol... ..	0.8 ml

Azul de bromofenol.... 20 mg.

La electroforesis se corre a 200 voltios utilizando un buffer electrodo 1X, hasta que salga el colorante de las muestras, el cual demora en salir un tiempo aproximado de 45 a 50 minutos.

Composición del buffer electrodo 5X pH 8.3

Tris base 9.0 g

Glicina..... 43.2 g

SDS al 10%..... 30 ml

Agua csp..... 600 ml

Luego del corrido se desmontó el gel y se colocó en la solución colorante por 10 min en agitación, luego se pasó a la solución decolorante toda la noche. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, así que planteó cambiar los tiempos de corrido, coloración y decoloración como primera medida.

Estos experimentos se repitieron 15 veces en razón a dificultades en el montaje de los geles y a necesidad de definir las características de las variables dependientes se realizaron modificaciones a la técnica y se ajustaron nuevamente los pH de los reactivos. Se observó también que la alícuota del patrón de peso molecular con la que se estaba trabajando, tenía una baja intensidad, por lo que se realizaron nuevos cambios. Finalmente se estandarizó la electroforesis unidimensional de proteínas en geles de poliacrilamida bajo condiciones de desnaturalización con SDS, para separar la proteínas de acuerdo al peso molecular. Todas las anteriores actividades se realizaron entre Marzo 05 y Abril 10 del 2003.

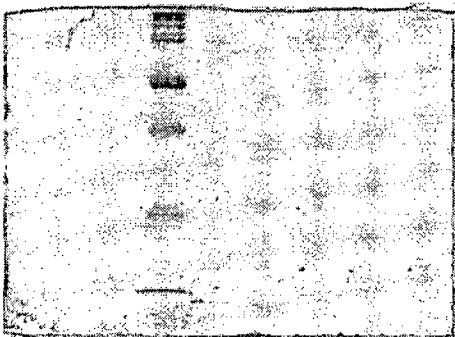


Fig. 1. Estandarización de SDS-PAGE
Marcador de peso molecular



Fig. 2. Membranas con resultados no satisfactorios durante el proceso de Estandarización de las Pruebas.

En Abril 25 / 2003 se inició un nuevo proceso de compras y suministro de los reactivos para el proyecto y se presentó su solicitud con sus respectivas cotizaciones.

En Abril 26 / 2003 se desarrollaron nuevos experimentos de acuerdo con las condiciones previamente estandarizadas. Se utilizaron concentraciones del alérgeno Der p 1 de 2.6 µg / µl, Der f 1 3.0 µg / µl, se diluyen en 100 µl a una concentración de 0.25 µg / µl. No se obtienen resultados satisfactorios en el gel de poliacrilamida, con las condiciones y concentraciones anteriores, se propone montar el experimento con la proteína purificada sin dilución para confirmar su presencia.

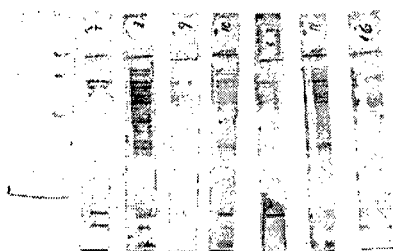


Fig.3. Immunoblotting con el extracto de Bt incubado en diferentes sueros de pacientes atópicos

En Abril 30 / 2003 se hizo entrega al Departamento Ciencias Básicas Médicas de la cámara de electroforesis (mini protein III). Se suspende el trabajo.

En Mayo 6 / 2003 se inició el proceso de compra y suministro de un equipo Immunoblotting y pasados dos meses, proveedor BIOMOL, no hizo la importación del equipo. La orden de compra fue cancelada y se envió una nueva solicitud a otra empresa.

El grupo presento el diseño experimental por parte del Dr. Alfredo Lagares, y el Dr. Eduardo Egea, esta reunión se llevo a cabo para evaluar los avances y buscar aportes en los procedimientos experimentales y asistieron Drs. Ismael Lizarazu, Guillermo Cervantes, Jorge Florez, Luz Alba Silvera, Alma Polo, Gloria Garavito, y Mayra Escaf.

En Mayo 16 / 2003 se recibe la cámara electroforética en horas de la tarde.

A Mayo 30 / 2003 se hicieron corridos electroforeticos variando las condiciones de los geles y concentraciones de proteínas, sin éxito. Se concluyè que los geles están bien, se definió que existían inconvenientes con los extractos alergénicos.

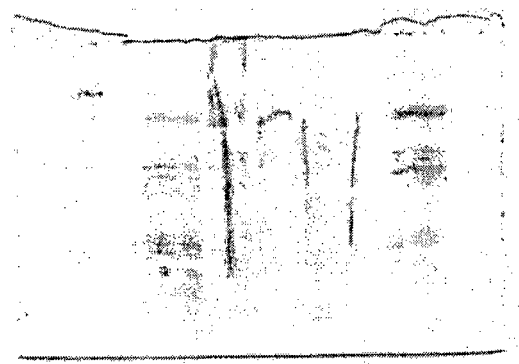


Fig. 4. SDS PAGE. Pruebas preliminares. MW, Bt sin tto, Bt 3 horas, Bt 7 horas, Bt 16 horas, Bt acido tánico 3 horas.

En Junio 5 / 2003 se decidió obtener extractos alergénicos en razón a los inconvenientes con los extractos utilizados previamente se enviá una carta explicando el inconveniente al laboratorio de referencia de la Universidad de Virginia en EEUU, bajo la dirección del Dr. Martin Chapman.

En Junio 24 / 2003 se hizo entrega del equipo mini trans Bot. de BioRad.

En Julio 14 / 2003 se envió una carta al Dr. Luis Caraballo del Instituto de Inmunología de la Universidad de Cartagena para solicitarle extractos Blo t 4.

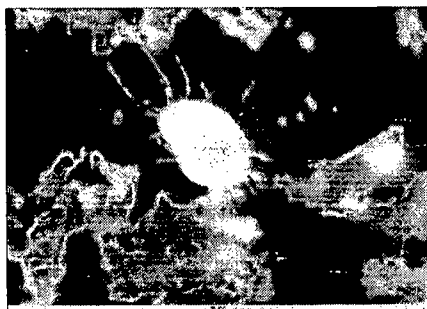


Fig. 5. Ácaro *Blomia tropicalis*

En Julio 16 / 2003 debido a la necesidad de obtener reactantes: alergen recombinantes, membranas de diálisis, y otros, se acordó la suspensión temporal de las actividades experimentales, mientras nos llegan los reactivos.

En Septiembre 12 / 2003 se obtuvieron 5 gramos de ácaros del Instituto de Inmunología de la Universidad de Cartagena, de la especie *Blomia tropicalis*.

En Septiembre 23 / 2003 se realizó la extracción de grasas mediante el método de soxhlet, utilizando éter etílico, luego se realizó la extracción de proteínas con bicarbonato de amonio 0.1M en una relación 1:20 p/v. se dividió el volumen resultante en tubos falcón de 50 ml y se dejó en rotación a 4°C durante toda la noche. Para la fecha se contaba con 28 pacientes que cumplían con los criterios de inclusión del estudio.

En Septiembre 26 / 2003 La concentración de proteínas en el extracto se determinaron por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Hercules, CA), para el cual se prepara una solución del colorante diluida 1:5 y se le adicionan 100 µl de la muestra y se lee la densidad óptica (DO) a 595 nm. La concentración de proteínas se determinó extrapolando la DO obtenida en una curva de titulación (DO vs concentración) construida utilizando un patrón de BSA. La DO obtenida es proporcional a la cantidad de proteína presente.

Septiembre 29 / 2003 se desarrolló el mismo procedimiento descrito para preparar el extracto de *D farinae*

88
175

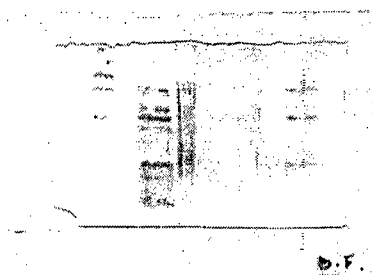


Fig. 6. Extracto de *D. farinae* en SDS PAGE. 1. Peso Molecular, 2. sin tto, 3. Tres horas con acaricida, 7 horas, 16 horas, ácido tánico 3 horas.

Octubre 1 / 2003 se realizo el procedimiento descrito con el extracto de *D. pteronyssinus*.

En Nov 29 / 2003 se realizo un viaje a Cartagena para el liofilizado de las muestras de los extractos en el Departamento de Química de la Universidad de Cartagena.

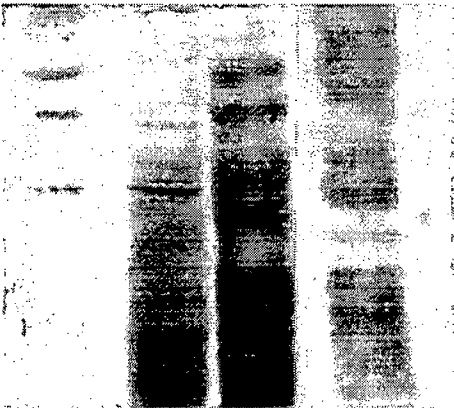


Fig. 7. Membranas con extractos de Bt, Dp y Df

Diciembre 03 / 2003 se recogieron las muestras en Cartagena, transportándose en hielo seco hasta el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular.

Diciembre 16 / 2003 se monta el inmunoblotting con las proteínas del extracto alergénico separadas en la electroforesis, se transfieren del gel a una membrana de nitrocelulosa (Trans-blot NC, 0.45μm, Bio-Rad, Hercules CA). El buffer utilizado en la transferencia tiene la siguiente composición :

- Tris base..... 3.03 g
- Glicina..... 14,4 g
- Metanol..... 200 ml

Agua c.s.p.. 1.000 ml.

Se realizo la transferencia por dos horas a 200 Amp en un Mini trans-blot (Bio-Rad)
 Las membranas se saturaron con PBS-BSA al 3% por dos horas, con el objeto de evitar uniones inespecíficas y se lavaron dos veces con PBS-T y una vez con PBS solo, cada lavado se realizo por 10 minutos. Cada membrana se incubo con dos ml de suero de los pacientes alérgicos y sueros controles diluidos 1:5 en PBS y con BSA como control adicional. La IgE unida se visualizo mediante incubación de las membranas con Anti-IgE humana marcada con fosfatasa alcalina y los resultados se evidenciaban luego de incubarlos con el sustrato cromogénico (NBT/BCIP). Esto nos permitio evidenciar el fraccionamiento de las partículas proteicas y de esta manera se estableció con certeza la eficacia desnaturalizante de la mezcla química acaricida Atlasac.

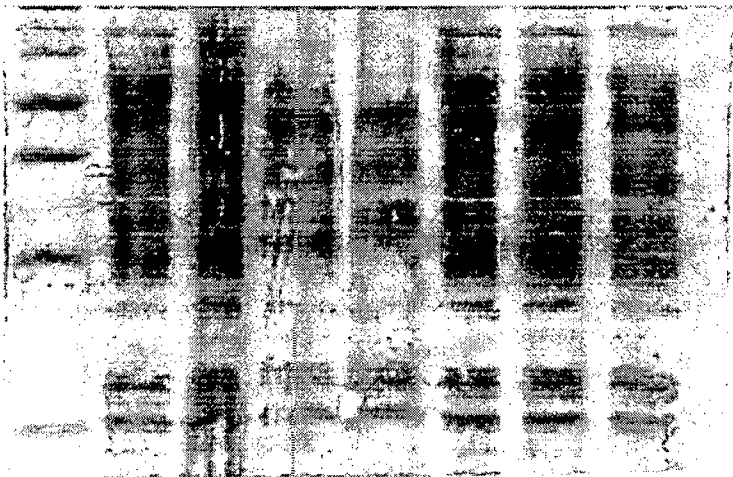


Fig. 8. SDS-PAGE del Extracto de *Blomia tropicalis* coloreada con azul de coomassie. 1.Peso molecular, 2. *B. tropicalis* sin tratamiento, 3. *B. tropicalis* tratada con Atlasac por tres horas, 4. *B. tropicalis* tratada por 7 horas con Atlasac, 5. *B. tropicalis* tratada por 16 horas con Atlasac, 6. *B. tropicalis* tratada con ácido tánico por 3 horas, 7. *B. tropicalis* tratada por 7 horas con ácido tánico 8. *B. tropicalis* tratada Con ácido tánico por 16 horas

En Febrero 27 / 2004 se hizo una evaluación del trabajo realizado hasta el momento. Las incubaciones del extracto de *B tropicalis* con Atlasac a 3 horas mostraron desnaturalización de algunas fracciones proteicas.

En Marzo 19 / 2004 se demuestro que el patrón de degradación con ácido tánico fue menor comparado con el acaricida Atlasac y al comparar las membranas

tratadas con ácido tánico y las membranas sin tratamiento se observa degradación.

En Marzo 31 / 2004 se decidió cambiar el tiempo de exposición a 7 horas, tanto con el ácido tánico como con el acaricida.

Mayo 20 / 2004 se suspendió el trabajo, ya que las membranas, papel filtro de Bio Rad no han llegado de Bogotá. Se verifico con compra esta información.

Junio 8 / 2004 se reanudan actividades, reconstituyendo el extracto de *D pteronyssinus*, distribuyéndose en 7 tubos eppendorf con 100 µl a una concentración de 12.84 µg / µl.

En Diciembre 16 / 2004 se evaluó el trabajo experimental. Se concluyo que los Immunoblotting con el extracto de *B tropicalis* usando sueros de pacientes seleccionados previamente, muestran un patrón reproducible. En este patrón se observan cambios en el corrido electroforético correspondientes a las bandas de las proteínas de alto peso molecular. Al comparar este patrón con el generado por el efecto del ácido tánico, existe una mayor degradación con Atlasac. Con el propósito de observar los cambios en los corridos electroforéticos el extracto de *B tropicalis* se trató con la solución Atlasac y se coloreo con azul de Coomassie, encontrándose un patrón de degradación similar al que se encontró en el inmublotting. Estos resultados reproducen y validan otros experimentos previos.

Los resultados no satisfactorios pueden ser explicados por cambios en algunas variables relacionadas con el pH o las características reactantes de los sueros. De otra parte el agua que se utilizo para desarrollarlos no fue tipo I (Milli Q) debido a daños en el equipo. Por ello el grupo decidió detener los experimentos hasta tanto no se arregle el problema del equipo milliQ y se consiguen nuevos sueros.

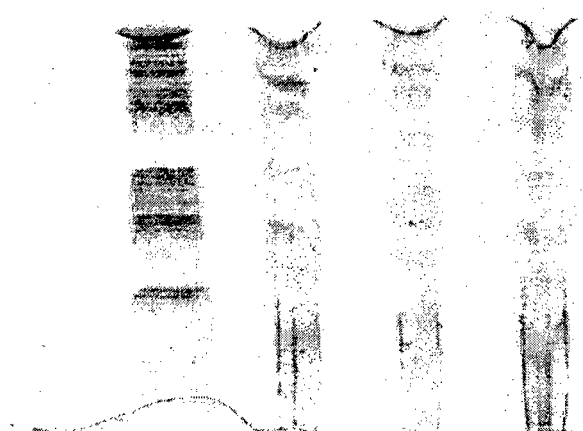


Fig. 9. Dp 1. Mw 2. Dp sin Tto. 3 Dp atlasac tres h, 4. Dp Atlasac 7 h, 5. Dp Atlasac 16 horas.

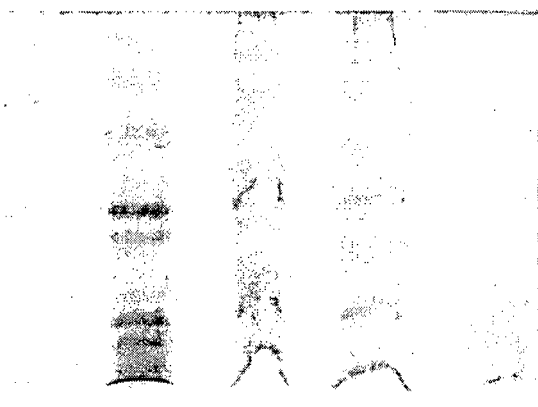


Fig. 10. Mw, 2. Df sin tto. 3. Atlasac 3 h, 4. Atlasac 7h, 5. Atlasac 16 horas

92
174

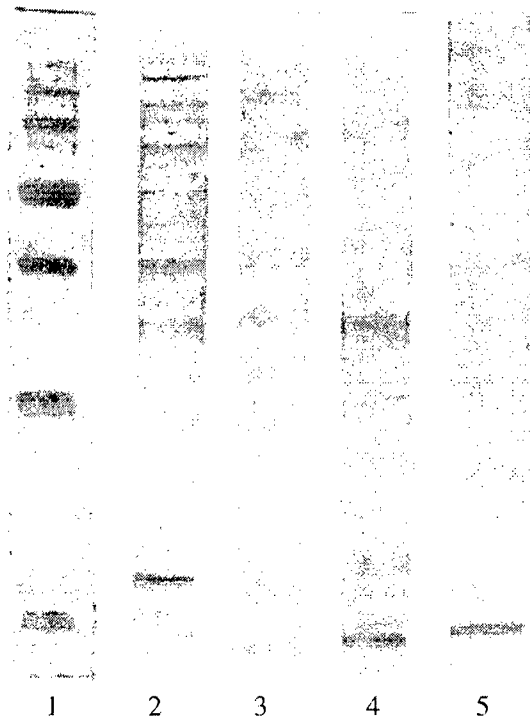


Fig. 11. Immunoblotting usando extracto *Blomia tropicalis* with suero de pacientes alérgicos t.
1. MW. 2. *B. Tropicalis* sin tratamiento, 3. *B. Tropicalis* 3 hours of Atlasac treatment, 4. *B. Tropicalis* after 7 hours 5. *B. Tropicalis* treated up to 16 hours

93
180

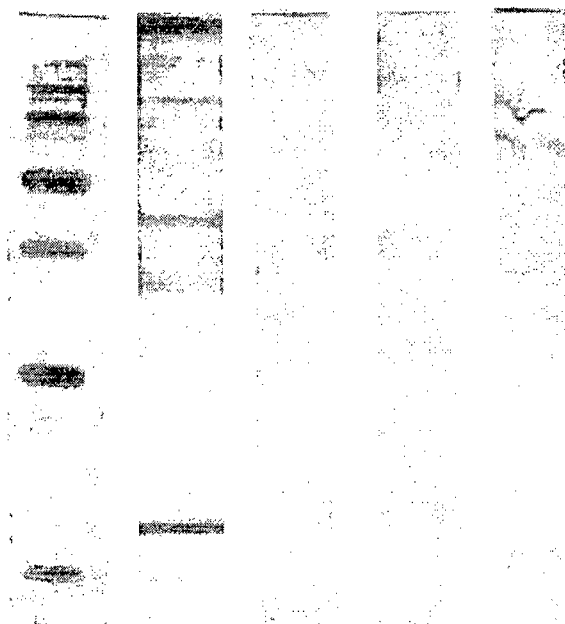


Fig. 12. Inmunoblotting del Extracto de *Blomia tropicalis* con el suero de un paciente alérgico. 1. Peso molecular, 2. *B. Tropicalis* sin tratamiento, 3. *B. Tropicalis* tratada con Atlasac por tres horas, 4. *B. tropicalis* tratada por 7 horas, 5. *B. tropicalis* tratada por 16 horas

7. CONCLUSIONES

Todos los experimentos y el trabajo de laboratorio desarrollado en este proyecto demuestran que Acar Klean tiene un efecto denaturalizante sobre las fracciones proteicas de los extractos de cuerpo entero de las tres principales especies de acaros. En la incubación de las fracciones proteicas entre 3 y 7 horas con el acaricida, desaparecen las fracciones alérgicas con peso moleculares entre 200 y 75 KD. En la de 7 horas las fracciones con peso molecular entre 20 y 30 KD disminuyen en forma muy marcada. Cuando aquellas se incubaron con ácido tánico, se observan cambios leves de denaturalización comparadas con el control no tratado. En la incubación de 16 horas se presenta una desaparición parcial de la mayoría de las fracciones alérgicas, especialmente las de peso molecular alto, con ácido tánico se observan algunos cambios especialmente en las fracciones de peso molecular alto. Estos resultados describen por primera vez el efecto desnaturalizante que tiene un acaricida sobre las proteínas alérgicas de un ácaro, incluso superior al ácido tánico el cual es descrito en la literatura como un potente desnaturalizante.

8. CUMPLIMIENTO DEL CRONOGRAMA

El proyecto se desarrollo en 40 meses Debido a varias dificultades relacionadas con la obtención de los extractos alergénicos y con la importación de algunos de los mismos así como la adquisición de equipos y elementos de trabajo, Por razones ajenas a la voluntad de los investigadores, los cultivos de ácaros se perdieron en su totalidad Esto atraso el inicio del proyecto en 8 meses Hubo además dos intervalos de suspensión de las actividades científicas, la primera de 6 meses y la segunda de cinco meses

9. LOGRO DE IMPACTOS ESPERADOS

Impacto Científico y Tecnológico

Se valido un modelo Immunoquimico para evaluar el efecto denaturalizante proteico de la mezcla química sinérgica ACAR Klean.

El modelo de evaluación molecular, se constituyó en el primero en Latinoamérica en demostrar el efecto desnaturalizante de los acaricidas presentes en el mercado, definiendo que la solución química, no solamente debe tener capacidad de matar los ácaros, sino que debe denaturalizar las proteínas alergénicas, en razón a que estas continúan siendo capaces de producir eventos inflamatorios involucrados en fisiopatología alérgica.

Es este el primer trabajo de investigación científica desarrollado en Latinoamérica y publicado en la literatura científica, que soporta con evidencia el efecto desnaturalizante.

Impacto Social

Los resultados de este trabajo aportan un fundamento académico y científico, que garantizan y soportan su uso en el ecosistema del paciente, como una medida de control de la acarofauna y un sistema de eliminación de los agentes desencadenantes de las enfermedades alérgica producidas por estos ácaros. Este producto puede mejorar la calidad de vida al disminuir el número de crisis asmáticas, y por tanto el número de visitas a la sala de urgencia. Disminuyendo probablemente los costos en el tratamiento de la enfermedad y los días de incapacidad laboral y escolar.

Impacto Económico

Los datos científicos generados por este proyecto, podrán la comercialización del mismo. Servirán para demostrar al consumidor y al equipo medico que lo formula, su real eficacia y su mecanismo de acción. Esto permitirá el posicionamiento del producto como estrategia de mercadeo.

10. DIVULGACIÓN DE LOS DESARROLLO REALIZADOS

Los resultados parciales y finales de este proyecto se sometieron a la evaluación de pares y fueron aceptados para su publicación en dos importantes congresos: uno nacional : El Congreso Nacional de Biotecnología en la ciudad de Bogota en el tercer trimestre del año anterior (septiembre 2004) y el congreso Mundial de la Word Allergy Organization en la ciudad de Munich, Alemania en marzo del 2005.

ABSTRACT, PÓSTER Y DISCUSION ORAL PRESENTADO EN EL SEGUNDO CONGRESO COLOMBIANO DE BIOTECNOLOGIA Y PRIMER SEMINARIO INTERNACIONAL DE BIONEGOCIOS

EFFECTO DESNATURALIZANTE PROTEICO DE UNA MEZCLA QUÍMICA ACARICIDA SOBRE EL EXTRACTO ALERGÉNICO DEL ÁCARO *Blomia tropicalis*

Alfredo Lagares¹, Mayra Escaf², E.E, Egea² Gloria Garavito², Eduardo Egea²

- 1. Grupo de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Atlántico
- 2. Grupo de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Norte

Palabras Claves: Acaricida, Desnaturalización, Extractos alérgicos, *Blomia tropicales*, SDS PAGE, Immunoblotting

Summary

The incidence of allergic diseases is increasing and many people die each year from asthma in both industrialized and developing countries. This disease results from a genetic predisposition to the effect of environmental factors. Domestic mites represent a large source of allergens and the most important environmental etiological factor regarding asthma and allergenic rhinitis. Different means of environmental control for reducing exposure to allergens have been proposed. Our group has developed a novel chemical mixture which has been shown to be highly acaricidal (Colciencias-Procaps-Uninorte) This Project's object was to demonstrate a denaturing effect on allergenic proteins present in the house dust mite extract from *Blomia tropicalis*.

INTRODUCCIÓN

La incidencia de las enfermedades alérgicas está aumentando y numerosas personas mueren anualmente por Asma. Esta enfermedad resulta de una predisposición genética sumada al efecto de factores ambientales (1-3). Los ácaros domésticos son una gran fuente de alergenos y el factor etiológico ambiental más importante de asma y rinitis alérgica. Se han propuesto diferentes medidas para reducir la exposición a los alergenos de los ácaros (4,5). Nuestro grupo desarrolló una novedosa mezcla química, la cual demostró tener un alto poder acaricida (Colciencias-Procaps-Uninorte Cod. 4262-08.002-98). El objetivo de este

proyecto es demostrar un efecto desnaturalizante sobre las proteínas alergénicas presentes en el extracto del ácaro del polvo *Blomia tropicalis*.

METODOLOGÍA

El extracto alergénico fue preparado siguiendo una metodología previamente descrita (5). Se corrieron diferentes muestras del extracto alergénico de *Blomia tropicalis* en una SDS PAGE al 12% en condiciones de reducción. Previamente estas muestras fueron tratadas por tiempos de 3, 7 y 16 horas con la mezcla química acaricida y con ácido tánico al 1%, como patrón estándar, en una relación de volumen 1:1 a temperatura ambiente, como control una muestra sin tratamiento. Posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de PVDF. Las membranas se incubaron O.N. con el suero de tres pacientes alérgicos y el suero de una persona sana sin antecedentes de alergias, diluidos 1:5 en PBS-BSA al 0.1% posteriormente se incubaron con Anti IgE marcada con fosfatasa alcalina diluida 1:500 y se dejaron O.N. El color fue desarrollado con el sustrato cromogénico NBT/BCIP y la reacción fue detenida con una solución Stop que contiene EDTA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la incubación de 3 y 7 horas con el acaricida desaparecen las fracciones alergénicas con peso molecular entre 200 y 75 KD en la de 7 horas las fracciones con peso molecular entre 20 y 30 KD disminuyen en forma muy marcada, en la incubación con ácido tánico no se observan cambios comparadas con el control no tratado. En la incubación de 16 horas se presenta una desaparición parcial de la mayoría de las fracciones alergénicas, especialmente las de peso molecular alto, con ácido tánico se observan algunos cambios especialmente en las fracciones de peso molecular alto. Estos resultados son preliminares y se describe por primera vez el efecto desnaturalizante que tiene un acaricida sobre las proteínas alergénicas de un ácaro, incluso superior al ácido tánico el cual es descrito en la literatura como un potente desnaturalizante

Agradecimientos,

A la Universidad del Norte y Laboratorios Procaps por la Financiación de esta investigación

BIBLIOGRAFÍA.

1. Duffi D. Genetic epidemiology of asthma. Epidemiol Rev 1997; 19:129-143.
2. Holloway J, Beghé B and Holgate T. The genetic basis of atopic asthma. (review). Clinical and Experimental Allergy.1999;29:1023-1032
3. Caraballo L. The influence of genes on the etiology of asthma. ACI International. 1999. 11:183-189.
4. Platts-Mills T.A.E, Veruloet D, Thomas W, Aaberse R. and Chapman M. Indoor allergens and ashma: report of the third international workshop. J allergy Clin Immunol. 1997;100:S1-20.

5. Fernandez-Caldas-Lopez, Patiño, Neffen H, Sanchez-Medina, Caraballo L. et al. Cutaneous sensitivity to Six mite in asthmatic patients from five latin american countries. J Invest Allergol Clin Immunol 1993; 3: 245-249

98
185

ABSTRACT, POSTER Y DISCUSIÓN ORAL PRESENTADO EN THE XIXth INTERNATIONAL CONGRESS OF ALLERGOLOGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY (ICACI) AND THE XXIVth CONGRESS THE EUROPEAN ACADEMY OF ALLERGOLOGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY (EAACI). Munich – Alemania 2005.

Proteic denaturing effect a novel acaricidal chemical mixture on a allergenic extract of three species of dust mites

Lagares A¹, Escaf M², Egea E.E², Garavito G¹, Egea E²

- 1.- Immunology and Molecular Laboratory Group, Universidad del Atlantico Barranquilla, Colombia South America
- 2.- Immunology and Molecular Laboratory : Health Division, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia South America

Introduction

The incidence of allergic diseases throughout the world is currently on the rise and many patients die annually from asthma. These diseases arise from the combination of genetic predisposition and environmental factors. Dust mites are a large source of allergens and are one of the mayor environmental factors in allergic rhinitis and asthma. Many measures have been proposed to reduce patients exposure to dust mite allergens. We have developed a novel chemical mixture composed of benzoic acid and terpenic alcohols obtained from pine oil which proved to be highly acaricidal. The purpose of this project was to demonstrate a denaturing effect of our mixture on allergenic proteins found in extracts of the three mains species of dust mites (*B. tropicalis*, *D. pteronissynus* and *D. farinae*).

Methods

The extracts were prepared using a previously described method. Samples of the extracts were run on SDS-PAGE at 12 %. These samples were previously treated to 3, 7 and 16 hours with our acaricidal mixture. Tanic acid at 1% was used as a standard control. A 1:1 volume relationship and room temperature was used. An untreated sample was used as negative control. The samples were then transferred to a PVDF membrane and incubated overnight with the serum of three allergic patients and one healthy individual with no history of allergic disease, diluted in 1:5 PBS-BSA at 0.1%. Afterwards they were incubated overnight with anti-IgE antibodies marked with alkaline phosphatase in a 1:500 dilution. The chromogenic substrate NBT/BCIP was used and the reaction was halted with a Stop solution containing EDTA.

Results

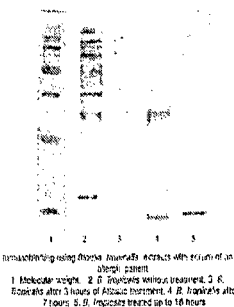
The samples incubated for 3 and 7 hours with our mixture showed a disappearance of allergenic fractions between 200 and 75 kd. In the 7 hours sample, fractions between 20 and 30 kd were markedly diminished. No significant changes were found in the incubation with tanic acid compared to untreated samples. The samples incubates for 16 hours showed a partial disappearance of the majority of allergenic fractions, specially the ones with high molecular weight. Some changes were observed in the tanic acid samples, in the high molecular weight fractions. These effects were observed on all mite species.

Conclusion

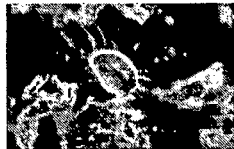
With these results, we can describe the denaturing effect that our acaricide has over the allergenic proteins of dust mites, which is higher than those found with tanic acid, described in the literature as a potent denaturing agent.

BIBLIOGRAFIA.

- 1. Duffi D. Genetic epidemiology of asthma. Epidemiol Rev 1997; 19:129-143.
- 2. Holloway J, Borge B and Holgate T. The genetic basis of atopic asthma. (review). Clinical and Experimental Allergy 1999;29:1023-1032
- 3. Caraballo L. The influence of genes on the etiology of asthma. ACI International. 1999; 11:183-189.
- 4. Platts-Mills T.A.E, Verulcet D, Thomas W, Aaberse R, and Chapman M. Indoor allergens and asthma: report of the third international workshop. J Allergy Clin Immunol. 1997;100:S1-20.
- 5. Fernandez-Caldas-Lopez, Patiño, Neffen H, Sanchez-Medina, Caraballo L, et al. Cutaneous sensitivity to Six mite in asthmatic patients from five latin american countries. J Invest Allergol Clin Immunol 1993; 3: 245-249



Immunoblotting using three allergic extracts with serum of an allergic patient.
1. Molecular weight, 2. B. tropicalis without treatment, 3. B. tropicalis after 3 hours of Atascac treatment, 4. B. tropicalis after 7 hours, 5. D. pteronissynus treated up to 16 hours



D. pteronissynus mite.



BIBLIOGRAFÍA

1. Testa MA, Simonson DC. Assesment of quality-of-life outcomes. *N Engl J Med* 1996;334:835-840
2. Dykewicz MS., Fineman S. Executive Summary of Joint Task Force Practice Parameters on Diagnosis and Management of Rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81:463-468.
3. Anderson RT, Rajagopalan R. Development and validation of a quality of life instrument for cutaneous diseases. *J Am Acad Dermatol* 1997;37:41-50.
4. Johansson S. G., Hourihane J., Bruijnzeel-Koomen C., et al. A revised nomenclature for allergy. *Allergy* 2001; 56: 813-824.
5. Platts-Mills TAE, Sporik R, Chapman MD, Heymann PW. The role of indoor allergens in asthma. *Allergy* 1995; 50 (Supl. 22): 5±12.
6. Egea E., Olivares M., Garavito G., Tirado F. Prevalencia de sensibilización a alergenos intra domiciliarios en pacientes con asma en la ciudad de Barranquilla. *Rev Col Neumologia* 2000; 12(Supl): S184.
7. Caraballo L., Mercadoo D., Jiménez S., et al. Análisis of the Cross-Reactivity between BtM and Der p 5, Two Group 5 Recombinant Allergens From *Blomia Tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 117: 38-45.
8. Patrick G., Peter D., Martinez F., Scott T., Björkstén B. et al. Drug development strategies for asthma: in search of a new paradigm. *Nature Immunol* 2004; 5(7): 695-699.
9. Dennis R., Caraballo L., García E., Caballero A., Aristizabal G., Córdoba H., Rodríguez M., Rojas M., Orduz C., Cardona R., Blanco A., Egea E., Verbel C. and Cala L. Asthma and other allergic conditions in Colombia: a study in 6 cities. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004; 93: 568-574.
10. Pastorello EA, Incorvaia C, et al. New allergens in fruits and vegetables. *Allergy* 1998;59(suppl 46):48-51.
11. Bidslev-jensen C, Poulsen LK. Accurancy of in vivo and in vitro tests. *Allergy* 1998;53(suppl 46):72-76.
12. Cuadros G., Maestre D., Guevara J., Garavito G., Egea E. Efecto acaricida de una mezcla química. *IATREIA* 2000; 13(2): 95.

13. Lagares A., Escaf M., Egea EE., Garavito G., Egea E. Proteic denaturing effect of a novel acaricidal chemical mixture on a allergenic extract of three species of dust mites. The Word Allergy Congress, Munich 2005. Aceptado para publicación.
14. Lagares A., Escaf M., Egea EE., Garavito G., Egea E. Efecto desnaturalizante proteico de una mezcla química acaricida sobre el extracto de ácaro *Blomia tropicalis*. Memorias II congreso Colombiano de Biotecnología y I congreso Internacional de Bionegocios.
15. Kern R.A. Dust sensibilization in bronchial asthma. Med. Clin. N. Amer. 1921; 5:751-58.
16. Storm Van Leeuwen W. Bronchial asthma in relation to climate. Proc. Roy. Soc. Med. 1924; 17: 19-26.
17. Oshima S. Observations on floor mites collecten in Yokohama. I. On the mites found in several schools in summer. Jap. J. Sanitary Zool. 1964; 15: 233-244.
18. Piccinni M-P., Mecacci F., Sampognaro S., et al. Aeroallergen sensitization an occur during fetal life. Int Arch Allergy Immunol 1993; 102:301.
19. Kay AB. Allergy and allergy disease. First to two parts. N. Engl. J Med. 2001; 344: 30-37.
20. Tovey E., Baldo B., Comparison by eletroblotting of IgE-binding components in extracts of house dust mite bodies and spent mite. J Allergy Clin Immunol 1987; 79: 93.
21. Dennis R., Caraballo L., Garcia E., Aristizabal G., Egea E., Et al. Comparación de prevalencia en santa fe de Bogota, Cali y Barranquilla. Rev Col Neumologia 2000; 12(Supl): S184.
22. Dennis R., Caraballo L., García E., Córdoba A., Aristizabal G., Rodríguez MN., Blanco A., Egea E. Estudio de casos y controles sobre factores asociados al diagnostico de Asma en Bogotá, Cali y Barranquilla. Rev Col Neumologia 2000; 12(Supl): S183.
23. Egea E., Olivares M., Garavito G., Tirado F. Cockroach Hypersensibility in the Pediatric of the Caribbean Colombian Area. J Allergy Clin Immunol 2000; 105: s326.
24. Sánchez M., Fernández-Caldas E., Correa C., Egea E., Iglesias A. ácaros en Colombia y su relación con las alergias respiratorias. Colciencias. ISBN 958-608-104-4.

101
188

25. American Academy of Allergy Asthma and Immunology Position Statement. Environmental allergen avoidance in allergic asthma. J Allergy Clin Immunol 1999; 103: 203-5.
26. WHO/IUIS Allergen Nomenclature List. <http://www.allergen.org>.
27. Egea E., Garavito G. Significado biológico de la reactividad cruzada entre el alérgeno mayor de cucaracha y la tropomiosina de artrópodos, nematodos y mamíferos. Rev. Asoc. Alerg asma e Inmunol 1999; 8(2): 27-30.
28. Sidenius K., Hallas T., Poulsen L., Mosbech H. Allergen cross-reactivity between house-dust mites and other invertebrates. Allergy 2001; 56: 723±733.
29. Thomas WR., Smith W. House dust mite allergens. Allergy 1998; 53: 821-832.
30. ALBERSE RC. Structural biology of allergens. J Allergy Clin Immunol 2000;106:228-238.
31. Platts-Mills TAE, Vervloet D, Thomas WR et al. Indoor allergens and Asthma: Report of the Third International Workshop. J Allergy Clin Immunol 1997; 100: S1-24.
32. Voorhorst R, Spieksma FT, et al. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergen it produces: identity with the house dust allergen. J Allergy 1964; 39: 325.
33. Angus AC, Ong ST, et al. sequence tag catalogs of dust mite expressed genomes: utility in allergen and acarologic studies. Am J Pharmacogenomics (in press).
34. Chew FT, Lim SH, et al. evaluation of the allergenicity of tropical pollen and airborne spores in Singapore. Allergy 2000; 55: 340-7.
35. Rizzo MC, Fernandez-Caldas E, et al. IgE antibodies to aeroallergens in allergic children in Sao Paulo, Brazil. J Investig Allergol Clin Immunol 1997; 7:242-8.
36. Eggleston PA, Bus RK. Environmental allergen avoidance: An overview. J Allergy Clin Immunol 2001; 107: S403-5.
37. Murray AB, Ferguson AC. Dust-free bedrooms in the treatment of asthmatic children with house dust or house dust mite allergy: a controlled trial. Pediatrics 1983; 71:418-422.
38. Buchanan DJ, Jones IG. Mites and house dust mite allergy in bronchial asthma in Northern Zambia. Post grad Med J 1974; 50: 680-2.

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

**CONCEPTO MEDIANTE EL CUAL SE RESUELVE UN RECURSO DE
REPOSICIÓN**

Radicación N° 03-68947

Una vez recibido y estudiado el recurso de reposición presentado por el interesado, contra lo que dicta la Resolución N° 9140 de donde se niega el otorgamiento de Patente de Invención, se emite el siguiente concepto:

1. Documentos estudiados:

1.1. Descripción: Folios: 4 a 14

1.2. Reivindicaciones: Folio: 15 a 17 (capítulo reivindicatorio original).

Folio: 74 a 76 (capítulo reivindicatorio modificado)

1.3. Prioridad: La solicitud no reivindica prioridad.

2. Objeto de invención:

Título de la solicitud: "Composición sinérgica para eliminar ácaros y sus alérgenos".

El objeto de la presente solicitud se refiere a: "La presente invención está dirigida a un nuevo producto para uso doméstico. Más particularmente, la presente invención se refiere a una composición de dos agentes acaricidas con efecto sinérgico, *pix* líquida (aceite de pino) y *bencilbencenocarboxilato* (benzoato de *bencilo*) para eliminar los ácaros del polvo doméstico que producen alergia.

El objeto de la solicitud definido anteriormente se clasificó en la IPC C11 D 3/48; A 01N 37/10

3. Fundamentos del Recurso

El señor memorialista expone los argumentos por medio de los expresa sus inconformidades con respecto a la resolución emitida por esta oficina; a cada uno de los apartes que expone le señor memorialista se les dará respuesta de acuerdo a cada uno de los apartados que se presentan en el recurso.

3.1. Motivos de inconformidad y fundamentos del recurso.

El señor memorialista presenta el siguiente argumento:

" Como se demostrará a lo largo del presente memorial, la resolución impugnada, además de haberse limitado a repetir mayormente los argumentos expuestos en el examen de patentabilidad ha dedicado tan solo algunas líneas a valorar la respuesta dada a dicha acción oficial, sin referirse al fondo de capítulo reivindicatorio..... "

Respuesta técnica:

A lo largo del trámite de la solicitud se realizaron las observaciones técnicas pertinentes para demostrar que el documento técnico citado afecta el nivel inventivo de la solicitud. Al emitir cada concepto técnico fue necesario profundizar en la materia contenida en el capítulo reivindicatorio y en el capítulo descriptivo. Por lo tanto, siempre se tuvieron en cuenta los argumentos por parte del solicitante así como la evidencia técnica presentada dentro de la solicitud para afectar por falta de requisitos de patentabilidad la solicitud en cuestión.

3.1.1. La formulación revelada en D1 no incluye aceite de pino y por ende, carece de relevancia para afectar el nivel inventivo de la composición sinérgica reivindicada.

Argumento del señor memorialista.

“ En efecto, como se verá en la tabla comparativa que se incluye enseguida, una comparación grosso modo de las composiciones planteadas tanto en la solicitud colombiana 03-068-947 y la EP 0017315 permite advertir las evidentes diferencias existentes entre una y otra..... Como se observa, tal vez el único elemento relevante en común entre los dos documentos es la presencia de benzoato de bencilo; más específicamente vemos que la solicitud en curso tiene como principios activos aceite de pino y benzoato de bencilo, los cuales tienen demostrada actividad acaricida y efecto sinérgico recíproco.... ”.

Respuesta técnica.

En primer lugar es necesario aclarar que la afectación realizada a la solicitud fue por falta de Nivel Inventivo” de la composición reivindicada y la definición de nivel inventivo esta dada a la luz del artic. 18 de la Decisión 486; en el cual se establece que : “ Se considerará que una invención tiene nivel inventivo , si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”.

De esta manera al comparar la composición presentada en la solicitud colombiana con respecto a la composición de la anterioridad D1 (documento patente EP 0017315) es posible evidenciar los siguientes elementos comunes: Las dos composiciones combaten ácaros específicamente aquella especie que es capaz de causar asma, en las dos composiciones se encuentre benzoato de bencilo compuesto que es reconocido como un eficiente acaricida y en las dos composiciones se utiliza un aceite esencial, tal como se presenta en la anterioridad D1 (folio 45) los ésteres de ácidos grasos incluyen aceites naturales no volátiles, dentro de los cuales es posible encontrar el aceite de pino. De esta manera los principales componentes de la formulación se encuentran como elementos comunes en las dos composiciones.

Por lo tanto, para una persona técnica con un nivel medio de conocimiento en la materia sería obviamente deducible una composición acaricida, alérgica a base de benzoato de bencilo y un aceite esencial.

3.1.2. El aceite esencial de pino empleado en la solicitud de patente es químicamente diferente a los aceites no volátiles a que hace referencia D1.

Argumentos del señor memorialista:

“ Como ya se ha mencionado en otros documentos adjuntados al expediente, el componente esencial de la invención reivindicada es el aceite esencial de pino, el cual, además, es químicamente diferente a los aceites no volátiles que hace referencia la patente europea D1; en efecto, según la Farmacopea Británica y la Farmacopea de Estado Unidos , el aceite esencial de pino tiene las siguientes características fisicoquímicas que lo diferencian de los ésteres de ácidos grasos utilizados en la formulación D1, veamos.....”

“Los monoterpenos alcohólicos alfa-pineno y b-pineno, componentes principales del aceite esencial de pino y de la mezcla acaricida, son productos bioactivos con actividad acaricida; por su parte, los aceites vegetales no volátiles.....”

Respuesta técnica:

Indudablemente, tal como lo presenta el solicitante las diferencias entre los terpenos que se encuentran en el aceite de pino y los esteroides de ácidos grasos son estructuralmente diferentes y por ende sus características químicas son diferentes, este hecho es innegable. Pero se debe tener en cuenta que el aceite de pino no se encuentra compuesto exclusivamente por los terpenos a los que hacer referencia el solicitante; ya que también es posible encontrar esteroides de ácidos grasos característicos de cualquier aceite esencial de origen vegetal. De otra parte, tal como lo menciona el solicitante en el capítulo descriptivo la composición de el aceite de pino es variable dependiendo de la naturaleza del material vegetal.

Por lo tanto, la acción antiacaricida del aceite de pino puede ser adjudicada a los otros componentes del aceite de pino y no específicamente a los terpenos ya que este hecho no fue demostrado a lo largo de la solicitud o sencillamente se deba a la acción del benzoato de bencilo ya que tampoco fue demostrado de manera satisfactoria que el efecto de la composición fuera mayor que el efecto de los componentes individuales. (Ver una discusión más amplia de este aspecto en el numeral 3.1.3. del presente documento).

3.1.3. A la fecha de presentación de la solicitud, no existía evidencia científica sobre el efecto acaricida del aceite del pino empleado en ésta.

Argumento del señor memorialista.

" Ahora bien, y si en gracia de discusión fuera posible que en la literatura se encontraran documentos que describan las propiedades plaguicidas de los aceites esenciales en especial la acción acaricida del aceite de pino, no se documenta una formulación que este comprendida textualmente por los dos principios activos citados en la solicitud....."

" En cuanto al segundo componentes activo de la solicitud en cuestión, es decir, el Benzoato de bencilo, es de conocimiento en el arte anterior y esta ampliamente divulgado en la literatura científica que dicho compuesto posee actividad para eliminar ácaros, tal es el caso de varias referencias bibliográficas incluyendo el documento D1 el cual incorporamos como referencia en nuestra solicitud....."

Respuesta técnica

Es de conocimiento común que varios aceites esenciales presentan propiedades, plaguicidas, y también son utilizados con fines terapéuticos para tratamiento de diversas enfermedades. De otra parte, tal como lo citó el solicitante en el capítulo descriptivo (folio 6): "Por su parte, el aceite de pino es otro producto conocido por su efecto acaricida"; esto demuestra que en el estado de la técnica el efecto específico del aceite de pino es conocido; por lo que para una persona de nivel medio es obvia la preparación de una composición con compuestos activos que presenten propiedades acaricidas.

Cabe resaltar que si se encontrara en el estado del arte una formulación que presentar los dos principios activos, la afectación realizada a la solicitud sería por novedad ya que los principales componentes de la composición habían sido revelados en el estado del arte. Pero la afectación realizada a la solicitud es por Nivel Inventivo en la cual se establece si es obvio o no para una persona de nivel medio en la técnica derivar la composición de la solicitud a partir de la información presentada en el estado de la técnica.

Ahora bien, la actividad sinérgica de la composición de aceite de pino y benzoato de bencilo no fue suficientemente demostrada en la solicitud por lo que no es

posible descartar el hecho de que en las composiciones que se encuentre benzoato de bencilo este sea el compuesto que procure la acción acaricida. La anterior afirmación se basa en el hecho de que el solicitante allegó a esta oficina la siguiente información al realizar la observación de que la composición no se encontraba lo suficientemente sustentada en el capítulo descriptivo: "Experimentalmente se demostró, por parte de los inventores, que el tiempo de dosis letal 100 (DL 100) fue menor (muerte del 100% de los ácaros) cuando se utilizó la mezcla sinérgica que cuando fueron evaluados por separado los componentes de ésta (benzoato de bencilo solo, en proporción de 0,5-4% p/v, aceite de pino solo, en proporción entre 0,1-7% v/v). La muerte del 100% de los ácaros se evidenció a los 3 minutos con la mezcla alcohólica; en contraste con el benzoato de bencilo alcohólico y con el aceite de pino alcohólico evaluados por separado, se da a los 5 minutos" (folio 73)

Del apartado anterior es claro que la diferencia es de solo 2 minutos para erradicar una cierta población de ácaros con los productos individuales y con la composición. Esta diferencia en tiempo no indica que en realidad la acción de la composición sea superior con respecto a la acción de los compuestos individuales. Ya que esta diferencia puede ser atribuible a la incertidumbre del experimento ya que no se presenta el valor de la misma dentro de los datos reportados.

De otra parte, es conocido en la técnica que al considerar que una composición es sinérgica es porque se conocen las concentraciones específicas de los componentes en las cuales se presenta dicho sinergismo; de acuerdo a la información presentada por el solicitante se presenta un rango de concentraciones para el cual es posible realizar la siguiente consideración: al tener una cantidad de benzoato de bencilo de 0,5% y de aceite de pino de 0,1% para los compuestos individuales y luego considerar que se tiene una composición cuyas concentraciones son benzoato de bencilo 1% + aceite de pino 1% (estas son las concentraciones mínimas reportadas para la composición en la reivindicación 1); es claro que las concentraciones de la composición son mucho más altas por lo que el efecto observado probablemente se debe a una mayor concentración del principio activo. Lo anterior es posible afirmarlo ya que el solicitante no presentó datos de la efectividad de la composición a lo largo del rango de concentraciones en las cuales pueden estar presentes los principios activos.

3.1.4. D1 no revela una formulación alcohólica.

Argumento del señor memorialista:

"Una diferencia esencial adicionalmente existente entre la solicitud en curso y D1 consiste en que aquella revela una composición alcohólica, en la cual el aceite de pino juega un papel importante para eliminar ácaros y sus alérgenos, además, de ejercer un poder sinérgico junto con el benzoato de bencilo y generar menor irritación en mucosas"

"En efecto, "la composición sinérgica para eliminar ácaros y sus alérgenos", a diferencia de D1, se trata de una composición alcohólica acaricida y sinérgica que permite incorporar o vehiculizar no solo el benzoato de bencilo sino el aceite de pino; dicha composición y como consta

Respuesta técnica.

Tanto en la composición de la solicitud como en la composición de la anterioridad D1 se presentan los mismos principios activos como son el benzoato de bencilo y el aceite esencial, adicionalmente las dos composiciones contienen un propelente ya que se utilizan en forma de spray. Para una persona que se desempeñe en el campo técnico es posible establecer los demás adyuvantes que se encuentren conformando la composición de acuerdo a las características que se requieran para el producto. De esta manera, el hecho que la composición contenga un

adyuvante diferente no le proporciona la altura inventiva suficiente para ser diferenciada de la composición presente en el estado del arte ya que en la anterioridad D1 se están presentando como constituyentes principales los mismos principios activos y las dos composiciones presentan efecto acaricida. Teniendo en cuenta que el objeto de la solicitud es la composición acaricida y no una composición alcohólica que permite incorporar el benzoato de bencilo y el aceite de pino, la anterioridad D1 desvirtúa el nivel inventivo de la solicitud.

3.1.5. D1 no demuestra ni permite inferir, aún en combinación con otros documentos, la presencia de un efecto sinérgico entre el aceite de pino y el benzoato de bencilo.

Argumento del señor memorialista.

“Cabe anotar que la conclusión en cuanto a dicho efecto sinérgico, se obtuvo luego de años de investigación y desarrollo por parte de investigadores reconocidos mundialmente, expertos en la materia en conjunto con grupos científicos de entes reconocidos mundialmente, expertos en la materia en conjunto con grupos científicos de entes reconocidos por su avance en innovación.....”

“ A la luz de dichos documentos, los cuales comprenden la validación de numerosos ensayos experimentales, deberá concluirse que la invención solicitada tiene como propósito específico proporcionar un producto de innovación y desarrollo tecnológico, útil como agente degradante y desnaturalizante de los epitopes alergénicos de las principales especies de ácaros *Dermatophagoides Faringe*, *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Blomia tropicales*, involucrados en la fisiopatogenia del asma alérgica y otras enfermedades de origen alérgico, que no había sido revelado anteriormente en la literatura especializada, ni podría derivarse, menos en forma evidente de la lectura de D1”

Respuesta técnica:

Esta oficina no desconoce la actividad científica realizada a lo largo del desarrollo de la formulación; tampoco desconoce la experiencia a nivel de investigación de los diferentes profesionales involucrados en el grupo de investigación, pero desafortunadamente la composición presentada no cumplía con todos los requisitos de patentabilidad establecidos de acuerdo a la Decisión 486 por medio de la cual se rige la legislación de patentes de nuestro país.

Indudablemente no se desconoce el valor científico que presentan las pruebas desarrolladas para demostrar la actividad de la composición, pero estas no fueron objeto de la solicitud por lo que no es posible decidir con respecto a la patentabilidad de la solicitud con dichas pruebas.

Argumento del señor memorialista:

“ Es del caso reiterar que dicha mezcla química (aceite de pino/benzoato de bencilo) demostró ampliamente un efecto sinérgico acaricida jamás revelado con anterioridad, y que los resultados que comprobaron este efecto biológico, anexos ahora como prueba, fueron presentados –sin publicarse- ante la Subdirección Nacional de Desarrollo e Innovación tecnológica en el año 2001; en consecuencia, tales estudios son prueba inequívoca respecto del Nivel Inventivo presente en la solicitud de patente que motiva estas diligencias”.

Respuesta técnica.

Dentro del memorial del Recurso de Reposición el solicitante anexó los estudios que describe, desafortunadamente estas pruebas fueron allegadas a este Despacho fuera de los plazos establecidos, por lo que dichos estudios no pueden ser admitidos como complemento de la información presentada

inicialmente en la solicitud. De otra parte, si los estudios presentados eran tan relevantes para demostrar el efecto sinérgico de la composición y por medio de los cuales era posible despejar cualquier duda con respecto a la altura inventiva de la solicitud; dichos estudios se debieron adjuntar dentro del capítulo descriptivo de la solicitud originalmente presentada.

Argumento del señor memorialista:

“ Del mismo modo, es importante llamar la atención del Despacho que a la fecha de culminación del proyecto y de presentación de esta solicitud, no existía en la literatura científica un modelo de evaluación molecular para demostrar el efecto desnaturalizante de los acaricidas presentes en el mercado tal como se hace en esta solicitud en trámite....”

“ Por tanto, es significativo resaltar que los resultados que se obtuvieron del desarrollo experimental de este proyecto y por ende de la composición reivindicada demuestran no solo que la misma tiene un efecto biológico acaricida sobre las tres especies más importantes involucradas como agentes desencadenantes de las enfermedades alérgicas respiratorias.... ”

Respuesta técnica:

El modelo de evaluación molecular al que hace referencia el solicitante se encuentra fuera del alcance de la presente solicitud por lo que las ventajas que haya proporcionado esta metodología a la investigación realizada no son relevantes para demostrar la patentabilidad de la solicitud.

Tal como lo expresa el solicitante la composición presenta un efecto biológico acaricida pero dentro de la solicitud no se sustentó adecuadamente la superioridad de dicho efecto con composiciones similares a las del estado del arte.

Argumento del señor memorialista.

“ Por si fueran pocos los argumentos proporcionados e independientes que las dos formulaciones, pese a sus diferencias esenciales, sean aptas para productos tipo spray, es importante resaltar que si bien es cierto las dos contienen propelente dicho componente es diferente.....”

Respuesta técnica.

La diferencia de las formulaciones básicamente se basa en los coadyuvantes de las mismas, la selección de estos coadyuvantes va encaminada a la manera como la composición sea asperjada; de esta manera en la solicitud se deseaba que la composición ingresara a almohadas y colchones por lo que se tenía que seleccionar un vehículo propelente par lograr la penetración deseada; por lo tanto la selección de tales coadyuvantes era posible predecirla.

Argumento del señor memorialista:

“ Así las cosas, si bien algunas características del objeto reivindicado pueden haberse revelado en el arte anterior, lo cierto es que el documento citado por el señor examinador – individualmente considerado y aún en combinación con enseñanzas generales del área técnica respectiva no motivarían efectivamente a derivar en forma evidente el objeto reivindicado.

Es bien sabido que partiendo de materias conocidas pueden proponerse solicitudes novedosas e inventivas, merecedoras de protección por la vía de la patente de invención, como ocurre en este caso respecto de la ingeniosa

formulación reivindicada”

Respuesta técnica

De acuerdo a los argumentos presentados anteriormente la solicitud carece de nivel inventivo ya que no se logró demostrar adecuadamente la superioridad de la composición reivindicada con respecto a composiciones similares que se encuentran reveladas en el estado del arte. Por lo que la composición presentada no resulta ser novedosa y carece de nivel inventivo.

Lo anterior para los efectos legales a que haya lugar.

Bogotá, D.C., 25 de Junio del 2010.

CONCEPTO TÉCNICO No. 2318	EXAMINADOR TÉCNICO Código No. 202043
-------------------------------------	--