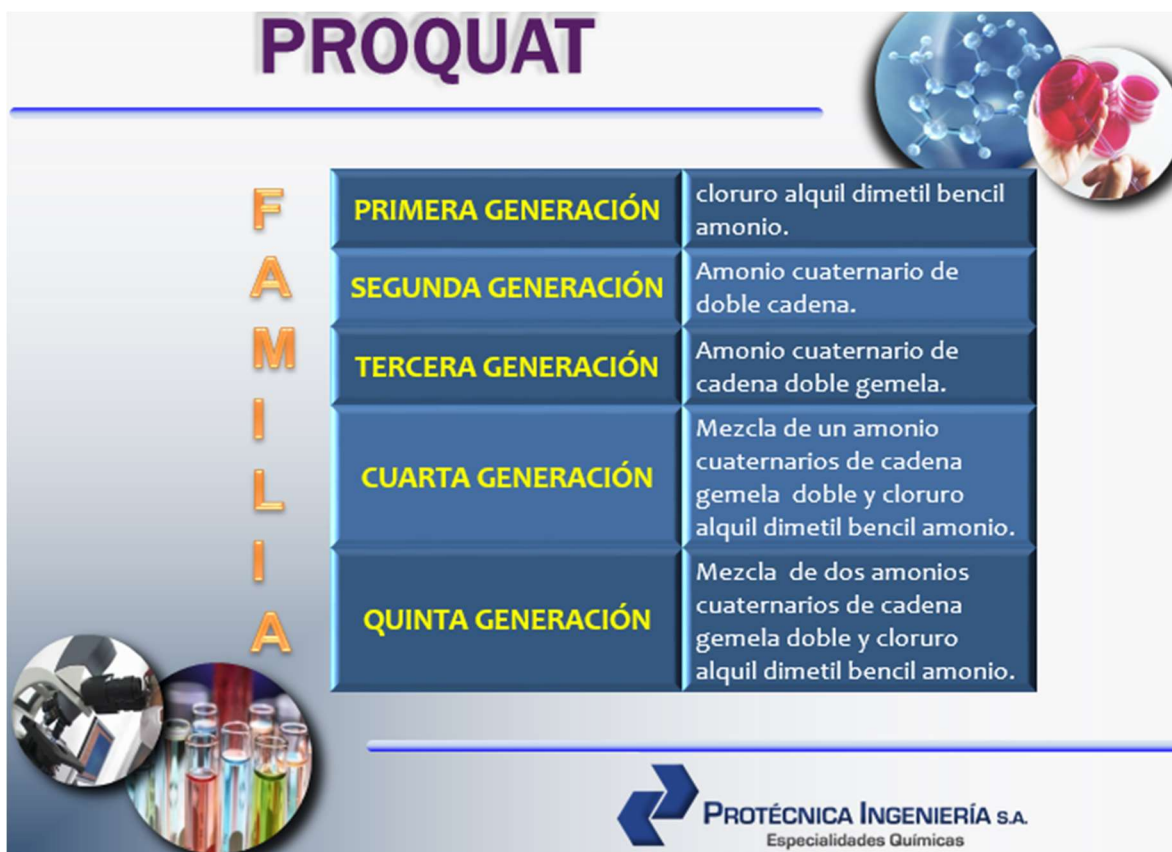


c- Descripción de la Invención. El desinfectante que la invención propone, consta de dos etapas:

c-1. ETAPA. Desarrollo de laboratorio. Se definieron varias pruebas a nivel de laboratorio utilizando el compuesto químico principal AMONIO CUATERNARIO de primera generación (cloruro alquil dimetil bencil amonio), suministrado por Protecnica, reforzado con el ingrediente ETANOL como potencializador para los efectos de desinfección buscando dar respuesta a los objetivos inicialmente trazados con el producto: EFECTIVIDAD; VELOCIDAD DE ACCIÓN; NO INFLAMABILIDAD



c-1.1 Buscar una buena efectividad contra microorganismos conocidos y para ello se plantearon diferentes concentraciones (ppm) del ingrediente activo: **amonio cuaternario**. En ese sentido se prepararon muestras con diferentes concentraciones: 500 ppm,

1000 ppm, 10000 ppm. Con esto se pretende tener un buen espectro de microorganismos (2), (3).

PROTÉCNICA INGENIERÍA S.A.
Especialidades Químicas

(2)

Escherichia coli
Pseudomona aeruginosa
Staphylococcus aureus
Aspergillus niger
Candida albicans
Salmonella Typhimurium

c-1.2 Buscar una buena velocidad de eliminación de microorganismos potencializando la acción del desinfectante con la adición de otro componente en la formulación como lo es el **etanol**, el cual posee propiedades desinfectantes, pero con la característica de generar inflamabilidad dependiendo de la concentración usada de este elemento en la formulación. Para evitar que el desinfectante quedara con propiedades inflamables al usar el etanol, se probaron varias diluciones de alcohol - agua en la formulación encontrándose, la de 33% de alcohol en la formulación global que no lo hiciera inflamable. Esto nos permite mejorar las propiedades del desinfectante encontrando una respuesta rápida de eliminación según lo muestran los análisis microbiológicos (3)

c-1.3 Inflamabilidad. Como se explica en el literal **b**, el producto no es inflamable.

El amplio espectro de acción (tipo de microorganismos eliminados) están descritos en análisis microbiológicos de laboratorio realizados con diferentes concentraciones de producto y para diferentes tipos de microorganismos y en diferentes condiciones de cultivo que permitieron optimizar la concentración ideal de producto a utilizar.

Adicionalmente los estudios permitieron después de varias pruebas, determinar la velocidad de eliminación de los diferentes microorganismos y con ello optimizar su eficacia de acción. (2), (3).

(2), (3)

ACREDITADO

TECNIMICRO ONAC

Laboratorio de Análisis S.A.S.

ORGANISMO NACIONAL DE ACREDITACIÓN DE COLOMBIA

ISO/IEC 17025:2017

10-LAB-053

REPORTE DE ANÁLISIS/ANALYSIS REPORT

Muestra/Sample #: 534496

Empresa / Company: SUMINISTROS INTEGRALES S.A.S.

Telf. / Phone 376 45 45 Ext 206 **Sede / Headquarters:** Sede principal

Calle 27 No. 41 - 73/93, Itagui **Producto / Product:** NO MIC MAXO

16 **Muestra / Sample:** Fecha de vencimiento: 31/03/22

Fecha de Recepción / Reception date: 02/04/2020

Temp. de Recepción / Temp. Reception: 26,8°C **Cantidad /**

Amount: 500 ml **Contenedor / Container:** Recipiente plástico con

tapa / Plastic container with lid **Enviada por /Send by:** Carlos

Londoño

Aspecto / Aspect: Olor / **Smell:** Color / Color:

Líquido, homogéneo, libre de partículas extrañas /

Homogeneous liquid, free of foreign particles. Inobjetable /

Unobjectionable Propio del producto / Characteristic of the product

F.E.E

Resultado/

Result

Análisis microbiológico/

Microbiological analysis Reducción de (Reduction of) E. coli ATCC 8739*

Especificaciones()/ Specifications(**)**

5 Log

Método/

Method NTC 5150:2003

Trazabilidad /Traceability

038025
03/04/2020 06/04/2020
Reduccion de
viabilidad de 6.0×10^5 / 5.8 Log a los 15 segundos de
contacto

NTC 5150:2003
Reducción de (Reduction of) E. coli ATCC 8739*
5 Log
038025
03/04/2020 06/04/2020
Reduccion de
viabilidad de 6.0×10^5 / 5.8 Log a los 30 segundos de
contacto

NTC 5150:2003
Reducción de (Reduction of) E. coli ATCC 8739*
03/04/2020 06/04/2020
5 Log
038025
Reduccion de
viabilidad de 6.0×10^5 / 5.8 Log a los 45 segundos de
contacto

NTC 5150:2003
Reducción de (Reduction of) E. coli ATCC 8739*
5 Log
038025
03/04/2020 06/04/2020
Reduccion de
viabilidad de 6.0×10^5 / 5.8 Log a los 60 segundos de
contacto

Reducción de (Reduction of) E. coli ATCC 8739*
NTC 5150:2003
5 Log
03/04/2020 06/04/2020
038025
Reduccion de
viabilidad de 6.0×10^5 / 5.8 Log a los 120 segundos de contacto

5 Log
NTC 5150:2003
038025
Reducción de (Reduction of) P. aeruginosa ATCC 15442*
03/04/2020 06/04/2020
Reduccion de

viabilidad de 4.9×10^5 / 5.7 Log a los 15 segundos de contacto

Una empresa del grupo

Tecnimicro Laboratorio de Análisis S.A.S. Carrera 42 No 10-37 Medellín Colombia
PBX (Páginal PageAxde)3268 1996 www.tecnimicro.net

Muestra/Sample: 534496

MERIEUX

NutriSciences

• **TECNIMICRO**

ACREDITADO

Aceitado ONAC

Laboratorio de Análisis S.A.S.
ORGANISMO NACIONAL DE ACREDITACIÓN DE COLOMBIA

ISO/IEC 17025:2017
10-LAB-053

NTC 5150:2003

Reducción de (Reduction of) P. aeruginosa ATCC 15442*
03/04/2020

06/04/2020

5 Log
038025

Reduccion de viabilidad de 4.9×10^5 / 5.7 Log a los 30 segundos de contacto

5 Log
NTC 5150:2003
038025

Reducción de (Reduction of) P. aeruginosa ATCC 15442*
03/04/2020 06/04/2020

Reduccion de viabilidad de 4.9×10^5 / 5.7 Log a los 45 segundos de contacto

5 Log
NTC 5150:2003

Reducción de (Reduction of) P. aeruginosa ATCC 15442*
038025

03/04/2020 06/04/2020

Reduccion de viabilidad de 4.9×10^5 / 5.7 Log a los 60 segundos de contacto

5 Log

NTC 5150:2003
038025

Reducción de (Reduction of) *P. aeruginosa* ATCC 15442*

03/04/2020 06/04/2020

Reduccion de
viabilidad de 4.9×10^5 /5.7 Log a los 120 segundos de
contacto

5 Log

NTC 5150: 2003

03/04/2020 06/04/2020

Reducción de (Reduction of) *B. Subtilis* ATCC 6633*

038025

Reduccion de
viabilidad de 2.3×10^5 /5,4 Log a los 15 segundos de
contacto

NTC 5150: 2003

Reducción de (Reduction of) *B. Subtilis* ATCC 6633*

5 Log

038025

03/04/2020 06/04/2020

Reduccion de
viabilidad de 2.3×10^5 /5,4 Log a los 30 segundos de
contacto

NTC 5150: 2003

Reducción de (Reduction of) *B. Subtilis* ATCC 6633*

03/04/2020 06/04/2020

5 Log

038025

Reduccion de
viabilidad de 2.3×10^5 /5,4 Log a los 45 segundos de
contacto

Reducción de (Reduction of) *B. Subtilis* ATCC 6633*

NTC 5150: 2003

5 Log

03/04/2020 06/04/2020

038025

Reduccion de
viabilidad de 2.3×10^5 /5,4 Log a los 60 segundos de
contacto

NTC 5150: 2003

Reducción de (Reduction of) *B. Subtilis* ATCC 6633*

5 Log
038025
03/04/2020 06/04/2020
Reduccion de
viabilidad de $2.3 \times 10(5)/5,4$ Log a los 120 segundos de
contacto

03/04/2020
5 Log
NTC 5150:2003
038025
Reducción de (Reduction of) S. aureus ATCC 6538*
06/04/2020
Reduccion de
viabilidad de $6.07 \times 10(5)/5.8$ Log a los 15 segundos de
contacto

Una empresa del grupo
Tecnimicro Laboratorio de Análisis S.A.S. Carrera 42 No 10-37 Medellín
Colombia PBX (Página Page 2de)3268 1996 www.tecnimicro.net

O MERIEUX “NutriSciences

Muestra/Sample: 534496

N ° LeOTADO **TECNIMICRO ONAC**

ACREDITADO

Laboratorio de Análisis S.A.S.
ORGANISMO NACIONAL DE ACREDITACIÓN DE COLOMBIA

ISO/IEC 17025:2017
10-LAB-053

NTC 5150:2003
Reducción de (Reduction of) S. aureus ATCC 6538*
03/04/2020

06/04/2020
5 Log
038025
Reduccion de
viabilidad de $6.07 \times 10(5)/5.8$
Log a los 30 segundos de
contacto

5 Log
NTC 5150:2003
038025
Reducción de (Reduction of) S. aureus ATCC 6538*
03/04/2020 06/04/2020

Reduccion de
viabilidad de 6.07×10^5 /5.8
Log a los 45 segundos de
contacto

5 Log

NTC 5150:2003

Reducción de (Reduction of) *S. aureus* ATCC 6538*
038025

03/04/2020 06/04/2020

Reduccion de
viabilidad de 6.07×10^5 /5.8
Log a los 60 segundos de
contacto

NTC 5150:2003

Reducción de (Reduction of) *S. aureus* ATCC 6538*

5 Log

038025

03/04/2020 06/04/2020

Reduccion de
viabilidad de 6.07×10^5 / 5.8 Log a los 120 segundos de
contacto

(**) Según Norma / Acoording to Standard: NTC 5150: 2003 NTC 5540: 2007 UNE EN 13624:2003 (*) Métodos acreditados/Methods Accredited: ONAC, Certificado/Certificate: 10-LAB-053 Fecha/Date: 2014-09-05 ISO/IEC 17025:2005 (F.E.E) Fecha de Ejecución del Ensayo/ Analysis execution date **NCLUSION/CONCLUSION** La muestra recibida y analizada en el laboratorio evidencia una reducción > 5,4 Log para los microorganismos retados, en los tiempos de contacto evaluados. / The sample received and analyzed in the laboratory shows reduction of > 5,4 Log for the challenged microorganisms, at the evaluated contact times.

W i //

2-tndread

Yurley Andrea Luna Peñaloza Coordinadora (E) Laboratorio Microbióloga

Universidad Pamplona Fecha de Impresión/printing date: lunes, 06 de abril de 2020

Fecha / Date: 06/04/2020 Informe firmado digitalmente, Sin sello seco de TECNIMICRO la información no tiene validez/Digitally signed report, without dry seal of TECNIMICRO this information is not valid Este informe no puede ser reproducido total ni parcialmente sin autorización de Tecnimicro Laboratorio de Análisis S.A.S/ / This report can't be reproduced in whole or in part without Tecnimicro Laboratorio de Análisis's authorization

FIN DE INFORME/ END OF REPORT Tecnimicro Laboratorio de Análisis
S.A.S. Carrera 42 No 10-37 Medellín Colombia PBX (Página Page 3 (de)368 1996
www.tecnimicro.net

Una empresa del grupo

MERIEUX A NutriSciences

Muestra/Sample: 534496

Reducción de (Reduction of) P. aeruginosa ATCC 15442*	03/04/2020 06/04/2020	Reduccion de viabilidad de 4.9x10(5) / 5.7 Log a los 30 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025
Reducción de (Reduction of) P. aeruginosa ATCC 15442*	03/04/2020 06/04/2020	Reduccion de viabilidad de 4.9x10(5) / 5.7 Log a los 45 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025
Reducción de (Reduction of) P. aeruginosa ATCC 15442*	03/04/2020 06/04/2020	Reduccion de viabilidad de 4.9x10(5) / 5.7 Log a los 60 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025
Reducción de (Reduction of) P. aeruginosa ATCC 15442*	03/04/2020 06/04/2020	Reduccion de viabilidad de 4.9x10(5) / 5.7 Log a los 120 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025
Reducción de (Reduction of) B. Subtilis ATCC 6633*	03/04/2020 06/04/2020	Reduccion de viabilidad de 2.3x10(5) / 5,4 Log a los 15 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150: 2003	038025
Reducción de (Reduction of) B. Subtilis ATCC 6633*	03/04/2020 06/04/2020	Reduccion de viabilidad de 2.3x10(5) / 5,4 Log a los 30 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150: 2003	038025
Reducción de (Reduction of) B. Subtilis ATCC 6633*	03/04/2020 06/04/2020	Reduccion de viabilidad de 2.3x10(5) / 5,4 Log a los 45 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150: 2003	038025
Reducción de (Reduction of) B. Subtilis ATCC 6633*	03/04/2020 06/04/2020	Reduccion de viabilidad de 2.3x10(5) / 5,4 Log a los 60 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150: 2003	038025
Reducción de (Reduction of) B. Subtilis ATCC 6633*	03/04/2020 06/04/2020	Reduccion de viabilidad de 2.3x10(5) / 5,4 Log a los 120 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150: 2003	038025
Reducción de (Reduction of) S. aureus ATCC 6538*	03/04/2020 06/04/2020	Reduccion de viabilidad de 6.07x10(5) / 5,8 Log a los 15 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025

Reducción de (Reduction of) S. aureus ATCC 6538*	03/04/2020 06/04/2020	Reducción de viabilidad de $6.07 \times 10(5)$ / 5.8 Log a los 30 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025
Reducción de (Reduction of) S. aureus ATCC 6538*	03/04/2020 06/04/2020	Reducción de viabilidad de $6.07 \times 10(5)$ / 5.8 Log a los 45 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025
Reducción de (Reduction of) S. aureus ATCC 6538*	03/04/2020 06/04/2020	Reducción de viabilidad de $6.07 \times 10(5)$ / 5.8 Log a los 60 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025
Reducción de (Reduction of) S. aureus ATCC 6538*	03/04/2020 06/04/2020	Reducción de viabilidad de $6.07 \times 10(5)$ / 5.8 Log a los 120 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025

(**) Según Norma / According to Standard: NTC 5150: 2003 NTC 5540: 2007 UNE EN 13624:2003

(*) Métodos acreditados/Methods Accredited: ONAC, Certificado/Certificate: 10-LAB-053 Fecha/Date: 2014-09-05 ISO/IEC 17025:2005

(F.E.E) Fecha de Ejecución del Ensayo/ Analysis execution date

CONCLUSIÓN/CONCLUSION

La muestra recibida y analizada en el laboratorio evidencia una reducción $\geq 5,4$ Log para los microorganismos retados, en los tiempos de contacto evaluados. / The sample received and analyzed in the laboratory shows reduction of $\geq 5,4$ Log for the challenged microorganisms, at the evaluated contact times.

Andrea I.

Yurley Andrea Luna Peñaloza
Coordinadora (E) Laboratorio
Microbiología
Universidad Pamplona
Fecha / Date: 06/04/2020

Fecha de Impresión/printing date: lunes, 06 de abril de 2020

Informe firmado digitalmente, Sin sello seco de TECNIMICRO la información no tiene validez/Digitally signed report, without dry seal of TECNIMICRO this information is not valid

Este informe no puede ser reproducido total ni parcialmente sin autorización de Tecnimicro Laboratorio de Análisis S.A.S. / This report can't be reproduced in whole or in part without Tecnimicro Laboratorio de Análisis's authorization

FIN DE INFORME/ END OF REPORT

REPORTE DE ANÁLISIS/ANALYSIS REPORT

Muestra/Sample #: 534497

Empresa / Company: SUMINISTROS INTEGRALES S.A.S. **Telf. / Phone** 376 45 45 Ext 206
Sede / Headquarters: Sede principal Calle 27 No. 41 - 73/93, Itagui
Producto / Product: NO MIC MAXO 56
Muestra / Sample: Fecha de vencimiento: 31/03/22
Fecha de Recepción / Reception date: 02/04/2020 **Temp. de Recepción / Temp. Reception:** 26,8°C
Cantidad / Amount: 500 ml
Contenedor / Container: Recipiente plástico con tapa / Plastic container with lid
Enviada por /Send by: Carlos Londoño
Aspecto / Aspect: Líquido, homogéneo, libre de partículas extrañas / Homogeneous liquid, free of foreign particles.
Olor / Smell: Inobjetable / Unobjectionable
Color / Color: Propio del producto / Characteristic of the product

Análisis microbiológico/ Microbiological analysis	F.E.E	Resultado/ Result	Especificaciones(**)/ Specifications(**)	Método/ Method	Trazabilidad /Traceability
Reducción de (Reduction of) E. coli ATCC 8739*	03/04/2020 06/04/2020	Reducción de viabilidad de 6.0x10(5) / 5.8 Log a los 15 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025
Reducción de (Reduction of) E. coli ATCC 8739*	03/04/2020 06/04/2020	Reducción de viabilidad de 6.0x10(5) / 5.8 Log a los 30 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025
Reducción de (Reduction of) E. coli ATCC 8739*	03/04/2020 06/04/2020	Reducción de viabilidad de 6.0x10(5) / 5.8 Log a los 45 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025
Reducción de (Reduction of) E. coli ATCC 8739*	03/04/2020 06/04/2020	Reducción de viabilidad de 6.0x10(5) / 5.8 Log a los 60 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025
Reducción de (Reduction of) E. coli ATCC 8739*	03/04/2020 06/04/2020	Reducción de viabilidad de 6.0x10(5) / 5.8 Log a los 120 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025
Reducción de (Reduction of) P. aeruginosa ATCC 15442*	03/04/2020 06/04/2020	Reducción de viabilidad de 4.9x10(5) / 5.7 Log a los 15 segundos de contacto	5 Log	NTC 5150:2003	038025

Macroproceso Gestión de laboratorios Proceso

Gestión de laboratorios Formato reporte Técnico

FORMATO REPORTE TECNICO LABORATORIO GENÓMICO ONE HEALTH

Fecha Reporte (DD/MM/AA) 18-04-20 **Código del servicio** LAB-2020-04 **Servicio solicitado** Evaluación actividad viricida in vitro de soluciones desinfectantes (1G, 5G, G1 500ppm, G5 500ppm) **Descripción metodológica** **1. Virus:** Influenza A (CA/09/H1N1) 1×10^4 unidades TCID₅₀/ml

2. Línea celular: Se utilizaron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) cultivadas en medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de SFB, 1% piruvato, 1% aminoácidos no esenciales y 1% de antibiótico-antimicótico.

3. Solución desinfectante: (A): 1G; (B): 5G; (C): G1 500ppm; (D): G5 500ppm.

4. Titulación Viral: Se realizó la titulación viral mediante ensayo de dosis infecciosa 50 (TCID) según protocolo estandarizado del LGOH¹. Para este ensayo se utilizó un plato de 96 pozos con células MDCK confluentes. La infección con el virus, se realizó en diluciones virales del stock de A(H1N1) utilizando medio de infección (DMEM, 0.5% BSA, 1 µg/ml tripsina TPCK Y 1% penicilina-estreptomicina) en diluciones seriadas en base 10. Se incubó a 37°C con 5% de CO₂ por 72 horas, verificando diariamente el efecto citopático causado por el virus en las células. Después de 72 horas de incubación, se realizó la tinción del plato con cristal violeta 1X y se realizó el cálculo del título viral con el método Reed & Muench. El ensayo para las 8 diluciones seriadas se hizo por triplicado.

5. Evaluación de la citotoxicidad: para conocer la citotoxicidad de los compuestos, se sembraron células MDCK en platos de 96 pozos con medio de crecimiento y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Cuando se tuvo una confluencia celular de 85% aproximadamente, se llevó a cabo el ensayo. Se tomaron los 4 compuestos en concentración al 1% y se realizaron diluciones seriadas en base 10 con medio de infección, como se muestra en la figura 1. Se usó como control negativo el medio de infección. Se inocularon las células con las diluciones respectivas y se incubaron a 37°C

con 5% de CO₂ por 48 horas. Se revisaron las células en el microscopio después de 48 horas, tiempo en el cual terminó el ensayo. Además de la observación del efecto citopático sobre las células, se realizó tinción con cristal violeta 1X. Se clasificó el efecto de cada compuesto como efecto citopático menor al 20%, entre 20% y 50%, y mayor al 50%.

Código: GL-PS-FO085 Versión: 0.0 Página 1 de 6
Macroproceso Gestión de
laboratorios Proceso
Gestión de laboratorios
Formato reporte Técnico

Figura 1. *Diseño ensayo de citotoxicidad de los compuestos en concentración 1% con diluciones seriadas base 10.*

6. Evaluación actividad viricida. Se determinó la reducción relativa de la infección viral por el método de neutralización viral basada en MTT. Se utilizó una concentración inicial de 1% de cada compuesto y a partir de esta, se realizaron diluciones seriadas en base 10 en medio de infección. Se utilizó una concentración viral de 1×10^4 TCID₅₀/ml. Se utilizó Albumina Sérica Bovina (BSA) en concentración final de 0.5 mg/ml como medio proteico. Se hizo la mezcla de cada producto (A, B, C y D) con el virus y con la BSA en relación 8:1:1 respectivamente, y se inició el conteo del tiempo de contacto según correspondía (5, 10, 15 y 20 min). Al cumplimiento de los tiempos de contacto se

inocularon las células. Se usó un control negativo celular de cada compuesto en diluciones 10^{-3} hasta 10^{-4} , así como controles negativos de medio de infección y controles positivos del virus sin exponer al producto desinfectante. Una vez terminado el montaje del ensayo, se incubó a 37°C con 5% de CO_2 por 48-72 horas. Para la medición de la inhibición viral y viabilidad celular, se usó el reactivo MTT stock (0.5 mg/ml) en cada pozo. Se incubó por 4 horas a 37°C y se adicionaron 150 μl de DMSO para detener la reacción. Se dejó actuar por 5 min y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm usando un lector de microplatos de ELISA. EL ensayo de MTT se basa en la conversión del compuesto de MTT soluble en agua (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) en un producto de formazán insoluble. Las células viables con metabolismo activo convierten el MTT en formazán. Las células muertas, por otro lado, pierden esta capacidad y, por lo tanto, no muestran señal. Por lo tanto, la formación de color sirve como un marcador útil y conveniente de células viables. La absorbancia medida es por tanto proporcional al número de células viables o no infectadas (Müller, et al., 2017). Para estimar la reducción del efecto citopático causado por la infección viral, se calcularon los valores promedio para cada tratamiento en cada dilución y se normalizaron los valores de absorbancia de los tratamientos restando el valor de la absorbancia de los controles negativos (células con cada dilución del compuesto, medio de infección y células no infectadas sin solución desinfectante). Después se evaluó la reducción del valor de la absorbancia comparando el control positivo y negativo con cada tratamiento hecho con cada compuesto.

Para determinar la fracción de células que fueron destruidas por el virus, los valores OD normalizados obtenidos de los pozos infectados se restaron de las OD normalizados obtenidos en los pocillos de control celular no infectados (Cermelli, et al., 2011; Smee, et al., 2017; Müller, et al., 2017). Los valores

Código: GL-PS-FO085 Versión: 0.0 Página 2 de 6
Macroproceso Gestión de
laboratorios Proceso
Gestión de laboratorios
Formato reporte Técnico

resultantes delta OD (ΔOD) se usaron para calcular el porcentaje de células muertas en cada tratamiento (Müller, et al., 2017). En la figura 2 se muestra la configuración del ensayo.

Figura 2. *Diseño del plato para ensayo de actividad viricida.*

7. Análisis estadístico: El delta OD promedio se calculó a partir de pozos duplicados usando Microsoft Excel. Los valores se analizaron utilizando la prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis con el software R (RStudio Team, 2015), paquete pgirmess v1.6.9. (Giraudoux, 2012). Se consideró $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo. Se excluyeron del análisis aquellos pocillos donde se evidencio alta citotoxicidad de los compuestos.

RESULTADOS Evaluación actividad citotóxica Una vez concluido el ensayo se encontró que los compuestos A y B en las concentraciones mayores a 0.01% son citotóxicas con destrucción de la monocapa mayor al 50%. Por otra parte los compuestos C y D en las concentraciones mayores a 0.1% fueron citotóxicos con destrucción de la monocapa mayor al 50%, como se muestra en figura 3.

Figura 3: *Resultado citotoxicidad. Soluciones A, B, C, D. Nota: la intensidad de la coloración denota la presencia e integridad de la monocapa celular. A mayor intensidad menor efecto citopático.*

Evaluación actividad viricida

Código: GL-PS-FO085 Versión: 0.0 Página 3 de 6
Macroproceso Gestión de
laboratorios Proceso
Gestión de laboratorios
Formato reporte Técnico

Al examen visual de la placa del ensayo MTT se observó que los pocillos que contenían los controles de células no infectadas contenían una solución púrpura oscura, mientras

que los pozos controles que se infectaron con el virus y que mostraron un CPE pronunciado contenían una solución más transparente, de forma similar a los pocillos controles del medio de infección solo. Los pocillos que contenían los diferentes tratamientos con los desinfectantes estuvieron relacionados también con la reducción de la intensidad de la coloración en las concentraciones menos citotóxicas. Por lo tanto, el desarrollo de cristales de formazán en los pocillos que tenían células vivas permitieron determinar la estimación indirecta de la actividad neutralizante de los compuestos desinfectantes sobre el virus (Smee, et al., 2017). Las figuras 4 y 5 ilustran la disminución del valor delta OD para los compuestos en las diluciones sin efecto citotóxico.

No se observó una diferencia significativa en los resultados obtenidos para los diferentes tiempos de exposición sin embargo se recomienda realizar un mayor numero de replicas para aumentar el poder estadístico de este resultado preliminar obtenido.

Figura 4. Valores normalizados promedio de la absorbancia en la medición de neutralización viral por prueba MTT para compuestos A y B. Valores delta OD cercanos al control negativo (CN) indican reducción del efecto citopático por replicación viral en comparación con el control positivo (CP).

Figura 5. Valores normalizados promedio de la absorbancia en la medición de neutralización viral por prueba MTT para compuestos C y D. Valores delta OD cercanos al control negativo (CN) indican reducción del efecto citopático por replicación viral en comparación con el control positivo (CP).

En el ensayo de inhibición viral medido por reducción del efecto citopático se observó que las

Código: GL-PS-FO085 Versión: 0.0 Página 4 de 6

**Macroproceso Gestión de
laboratorios Proceso
Gestión de laboratorios
Formato reporte Técnico**

concentraciones menos citotóxicas (-3, -4 y -5) de los desinfectantes A y B, tienen actividad viricida y logran neutralizar la infectividad viral. Por otra parte, se observó que las concentraciones menos citotóxicas (-2, -3, y -4) de los desinfectantes C y D, tienen actividad viricida y logran neutralizar la infectividad viral. Sin embargo, se asume que las concentraciones mayores de todos compuestos también tengan gran actividad viricida, aunque por su efecto citotóxico no haya sido posible demostrarlo en este experimento. Las figuras 6 y 7 muestran el porcentaje de células muertas observada para cada uno de los tratamientos.

Figura 6. Porcentaje de células muertas por prueba MTT para compuestos A y B. Valores menores al control positivo (CP) indican reducción del efecto citopático. La muerte celular observada en diluciones -1 y -2 se atribuyen al efecto citotóxico del compuesto.

Figura 7. Porcentaje de células muertas por prueba MTT para compuestos C y D. Valores menores al control positivo (CP) indican reducción del efecto citopático. La muerte celular observada en dilución - 1 se atribuye al efecto citotóxico del compuesto.

CONCLUSIONES Los resultados obtenidos en el ensayo MTT demostraron que los cuatro compuestos (1G, 5G, G1 500 ppm y G5 500 ppm) causaron inactivación o neutralización del virus influenza logrando una reducción parcial o total de la muerte celular causada por la infección. Aunque el efecto citotóxico de los compuestos impidió hacer una evaluación precisa de la actividad viricida de concentraciones cercanas o mayores de 1%, y teniendo en cuenta que los métodos de este trabajo siguieron los lineamientos estándar de evaluación de desinfectantes químicos y antisépticos (BS EN 14675_2006), se concluye que los 4 compuestos evaluados tiene potente actividad viricida en concentraciones de 1%, esto debido a

Código: GL-PS-FO085 Versión: 0.0 Página 5 de 6
Macroproceso Gestión de
laboratorios Proceso
Gestión de laboratorios
Formato reporte Técnico

que demostraron actividad neutralizante en concentraciones menores del 1% en todos los tiempos de exposición evaluados.

Es importante resaltar que evaluaciones realizadas por otros investigadores en productos desinfectantes ampliamente usados en laboratorio microbiológicos y que reportan actividad viricida como Virkon®, demostraron que diluciones 1:1000 a partir de concentraciones de 1% tienen amplia actividad viricida (1), siendo un hallazgo similar al reportado en este trabajo.

Referencias

1. Hernández A, Martró E, Matas L, Martín M, Ausina V. Assessment of in-vitro efficacy of 1% Virkon against bacteria, fungi, viruses and spores by means of AFNOR guidelines. J Hosp Infect. 2000;46(3):203-9.
2. Ciulli S, Volpe E, Grodzki M. Evaluation of in vitro virucidal activity of virkon ® against betanodavirus. 2009. Corpus ID: 29397527
3. Müller, J. A., Harms, M., Schubert, A., Mayer, B., Jansen, S., Herbeuval, J. P., Michel, D., Mertens, T., Vapalahti, O., Schmidt-Chanasit, J., & Münch, J. (2017). Development of a high-throughput colorimetric Zika virus infection assay. Medical microbiology and immunology, 206(2), 175–185. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0493-2>
4. Smee, D. F., Hurst, B. L., Evans, W. J., Clyde, N., Wright, S., Peterson, C., Jung, K. H., & Day, C. W. (2017). Evaluation of cell viability dyes in antiviral assays with RNA viruses that exhibit different cytopathogenic properties. Journal of virological methods, 246, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.03.012>
5. Cermelli, C., Cuoghi, A., Scuri, M. et al. In vitro evaluation of antiviral and virucidal activity of a high molecular weight hyaluronic acid. Virol J 8, 141 (2011). <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-141>

	Elaboró	Revisó	Aprobó	Cargo	Líder técnico
responsable	Coordinador técnico	Coordinador científico	Fecha	04-10-20	04-10-20
20					

Fin del reporte

i LGOH: Laboratorio Genómico One Health Universidad Nacional de Colombia

d- ETAPA. DESCRIPCION DE PROCESO EN LÍNEA.

Para la producción en línea se dispone de varios tanques cuyas capacidades van desde 1000 hasta 4000 litros.

Para efectos de la descripción del proceso, se toma como base la descripción para 1000 litro.

d-1. -Se pesan los ingredientes de acuerdo con la fórmula probada y evaluada:

AMONIO CUATERNARIO	2%
ETANOL	32.6%
AGUA	65.4%

d-2. Se pesa el agua en el tanque y se pone agitación dando encendido al variador de velocidad que da movimiento al agitador de dicho tanque

d-3. Se pesan en recipiente aparte el amonio cuaternario y el etanol, se mezclan estos ingredientes y se adicionan al tanque que contiene el agua.

d-4. Se agita la mezcla hasta homogenización completa. Aproximadamente 15 minutos.

d-5. Se para agitación, se toma muestra y se evalúan las características fisicoquímicas siguientes:

CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS	
CARACTERÍSTICA	VALOR
pH	8.3 – 8.9
APARIENCIA	Líquido claro libre de partículas
COLOR	Sin color
AROMA	Sin fragancia

d-6. Se procede al envasado en la línea de llenado automático en envase dispuesto para ello en botellas de 800 mls, con tapa atomizadora, etiquetado y empacado en cajas de cartón corrugado con 15 unidades por caja; debidamente codificadas botellas y caja con lote de fabricación.

B- REIVINDICACIONES

1. El desinfectante catiónico MAXO NO- MIC 60, es un producto de tres componentes y producto de una mezcla entre ellos, los cuales son y poseen las siguientes características:

a. Amonio cuaternario: es un compuesto químico de carácter desinfectante y amplio espectro de eliminación de microorganismos como: virus, bacterias, hongos, levaduras, etc.⁽⁴⁾.

(4) https://es.wikipedia.org/wiki/Cati%C3%B3n_de_amonio_cuaternario

Los compuestos de amonio cuaternario se fijan a la superficie de los microorganismos, ejerciendo una acción biocida, inhibiendo su acción por destrucción de su pared celular.

b. Alcohol: Compuesto químico conocido como alcohol etílico, ampliamente usado para diferentes aplicaciones.⁽⁵⁾