

PATENTE DESINFECTANTE MAXO NO-MIC 60

I - TÍTULO DE LA INVENCION

Desinfectante catiónico

Identificación comercial: MAXO NO MIC 60

II- DESCRIPCION

a- Campo - Sector Tecnológico. Esta invención se relaciona con el desarrollo de una formulación, la implementación del proceso y la producción de un desinfectante para superficies y objetos que elimine el VIRUS SARS-COV2 que produce la enfermedad conocida hoy en todo el mundo como COVID19 constituida en pandemia mundial.

b- Antecedente-Tecnología Anterior. La producción de desinfectantes de superficies y objetos domésticos como productos para eliminar microorganismos, está dirigida para combatir y eliminar virus como: el H1N1, la Influenza, etc y para eliminar bacterias, hongos, y otros tipos de microorganismos. Existen en el mercado nacional e internacional diferentes productos con ingredientes considerados como efectivos para el control de diferentes microorganismos mas no específicamente para el SARS COV2, causante del COVID19, ⁽¹⁾ por no existir pruebas de laboratorio

de productos usados para la eliminación de este virus en superficies y objetos.

La EPA “Environmental Protection Agency,” (Agencia de Protección Ambiental de EE.UU.), organismo para la protección del ambiente y la vida, es una agencia que coordina actividades de protección de la salud humana y el medio ambiente: aire, agua y suelo con leyes que proveen herramientas que permiten controlar el uso de sustancias químicas y otras sustancias peligrosas para la sociedad.

Esta agencia, ha promulgado una lista (lista N) de productos que podrían funcionar como efectivos para eliminar el SARS COV2 sin ser probados específicamente contra este virus, sino basados en la eficacia contra otro tipo de virus similares a éste y más difíciles de matar.

Entre las sustancias químicas recomendadas para formular desinfectantes se consideran entre otras: Aldehídos, peróxidos, hipocloritos, amonios cuaternarios, yodoformos, (etc), los cuales proporcionan acción viricida, bactericida, fungicida, etc.

Como el SARS COV2 es un virus nuevo, desconocido y el patógeno no estaba disponible para uso en pruebas de laboratorio (febrero 2020) y por lo tanto la EPA, para poder dar una recomendación de desinfectantes efectivos contra este virus, se basó en desinfectantes efectivos contra otros similares (tipo coronavirus) para su uso contra el COV2 y en recomendar sustancias que contienen estos desinfectantes actuales del mercado para ser utilizados en este propósito.

La aparición de este nuevo virus que ha ocasionado una grave crisis social, económica y de otros órdenes, esto llevó a

Suministros Integrales (área Técnica) a probar algunas sustancias químicas sugeridas (EPA) con carácter desinfectante para la preparación y búsqueda de una fórmula que ayude a combatir y eliminar de superficies y objetos este microorganismo y soportando con análisis microbiológicos su efectividad. ⁽¹⁾

(1) How does EPA know that the products on List N work on SARS-CoV-2?

While surface disinfectant products on List N have not been tested specifically against SARS-CoV-2, the cause of COVID-19, EPA expects them to kill the virus because they:

- Demonstrate efficacy (e.g. effectiveness) against a harder-to-kill virus; or
- Demonstrate efficacy against another type of human coronavirus similar to SARS-CoV-2.

⁽¹⁾There is much to learn about the novel coronavirus (SARS-CoV-2) that causes coronavirus disease 2019 (COVID-19). Based on what is currently known about COVID-19, spread from person-to-person of this virus happens most frequently among close contacts (within about 6 feet). This type of transmission occurs via respiratory droplets. On the other hand, transmission of novel coronavirus to persons from surfaces contaminated with the virus has not been documented. Recent studies indicate that people who are infected but do not have symptoms likely also play a role in the spread of COVID-19. Transmission of coronavirus occurs much more commonly through respiratory droplets than through fomites. Current evidence suggests that SARS-CoV-2 may remain viable for hours to days on surfaces made from a variety of materials. Cleaning of visibly dirty surfaces followed by disinfection is a best practice measure for prevention of COVID-19 and other viral respiratory illnesses in households and community settings.

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

1- ETAPA. DESARROLLO EN LABORATORIO

2- ETAPA. DESCRIPCIÓN DE PROCESO EN LÍNEA

Su objetivo es desarrollar un desinfectante para eliminar la supervivencia del virus COV2 de las superficies y objetos y limitar su propagación basados en dos conceptos fundamentales combinados:

La limpieza, referida a la eliminación de suciedad e impurezas de las superficies. No mata los gérmenes.

La desinfección, se refiere al uso de productos químicos, denominados desinfectantes y registrados por la EPA, para matar los gérmenes en las superficies eliminando el riesgo de propagación de la infección

En la práctica la limpieza de rutina de las superficies que se tocan con frecuencia (por ejemplo: mesas, pomos de puertas, interruptores de luz, manijas, escritorios, inodoros, grifos, fregaderos y dispositivos electrónicos, etc), se realizan con productos de limpieza del hogar (EPA desinfectantes registrados) que son apropiados específicamente para tal fin, siguiendo las instrucciones de la etiqueta. Las etiquetas contienen instrucciones para el uso seguro y efectivo del producto de limpieza, incluidas las precauciones que debe tomar al aplicar el producto, como usar guantes y asegurarse de tener una buena ventilación durante el uso del producto.

c-1. ETAPA. Desarrollo de laboratorio.

Para desarrollar esta NUEVA FÓRMULA, se partió en conocer en que consistía el virus en su conformación como tal, la cual describió así entre otras referencias el profesor Palli Thordarson, profesor de química en la Universidad de Nueva Gales del Sur de Australia como que “la mayoría de **los virus están contruidos de tres elementos claves: el ARN, las PROTEINAS y los LÍPIDOS (GRASAS)**. Los lípidos, que forman

una capa alrededor del virus tanto para protegerlo como para ayudarlo a su propagación e invasión celular. El ARN, las proteínas y los lípidos se auto ensamblan para formar el virus.”

Con base en lo anterior, se pensó en un desinfectante que tuviera en su composición un DISOLVENTE que DILUYERA la capa lipídica (grasa) y a la vez inactivara (desmoronara) el virus; adicionalmente que dentro de sus componentes tuviera un DESINFECTANTE (lista N) que actuara conjuntamente con el disolvente en la inactivación del VIRUS.

De acuerdo con lo anterior, se utilizaron respectivamente dos productos con esas características: ETANOL y un AMONIO CUATERNARIO. El etanol cumple con las características de diluyente según la definición de DISOLVENTE:

Etanol.

“El término “disolventes” se refiere a una clase de compuestos químicos descritos por su función; el término deriva del latín, que significa algo así como “aflojar”. En química, los disolventes, que generalmente se encuentran en su forma líquida, se usan para disolver, suspender o extraer otros materiales sin modificar químicamente los disolventes ni otros materiales.

Diferentes disolventes se utilizan en una amplia variedad de aplicaciones de productos de uso diario; desde pintura, productos de cuidado personal y productos farmacéuticos, **hasta pesticidas, productos de limpieza** y tintas. Sin disolventes, muchos de los productos que solemos usar no funcionarían tan bien.

Existe una diversa cantidad de disolventes versátiles que satisfacen necesidades específicas a la hora de fabricar productos de desempeño óptimo, entre otros, pinturas en aerosol de secado rápido que no obstruyen la boquilla de pulverización, tintas que no manchan, pinturas que lucen bien y duran mucho tiempo **y productos de limpieza resistentes para trabajos duros y eliminación de grasas.**

Muchos productos cosméticos se basan en disolventes para disolver los ingredientes y permitirles funcionar correctamente. Los disolventes se utilizan en lociones, polvos y cremas de afeitar para proporcionar la consistencia apropiada para el producto. **Los fabricantes de perfumes utilizan etanol** como disolvente de elección por su bajo nivel de olor.

Amonios Cuaternarios

“Los **amonios cuaternarios** son una familia de compuestos antimicrobianos, que poseen **acción** bactericida, fungicida y **viricida.**”

“Eucida Advanced ha demostrado actividad bactericida, fungicida, virucida y tuberculicida en 1 minuto. De acuerdo con información bibliográfica, los cloruros de amonio cuaternario tienen acción sobre virus envueltos en capa lipídica.”

“COMPUESTO DE AMONIO CUATERNARIO (Cloruro de benzalconio, cloruro de alquildimetilbenzilamonio y cloruro de didecildimetilamonio). Son compuestos que no manchan, son inodoros, no corrosivos y relativamente no tóxicos. Su acción se ha atribuido a la inactivación de las enzimas productoras de energía, desnaturalización de las proteínas celulares esenciales y la ruptura de la membrana celular.

Actividad microbica. Los compuestos utilizados como desinfectantes generalmente son bactericidas, funguicidas y viricidas de **virus lipídicos**. De amplio espectro, efectivo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los cloruros de amonio cuaternario son particularmente activos a un pH alcalino. Son comúnmente usados en el saneamiento del ambiente y de superficies no críticas, como pisos, paredes y muebles. Boletín Técnico N° 002 – **Desinfectantes Químicos** **www.provinas.net”-**

Se definieron varias pruebas a nivel de laboratorio utilizando ETANOL como el disolvente de la fórmula y AMONIO CUATERNARIO de primera generación (cloruro alquil dimetil bencil amonio), PROQUAT suministrado por Protecnica, buscando entre otros los siguientes objetivos con el producto: EFECTIVIDAD; VELOCIDAD DE ACCIÓN; y NO INFLAMABILIDAD.

PROQUAT

FAMILIA

PRIMERA GENERACIÓN	cloruro alquil dimetil bencil amonio.
SEGUNDA GENERACIÓN	Amonio cuaternario de doble cadena.
TERCERA GENERACIÓN	Amonio cuaternario de cadena doble gemela.
CUARTA GENERACIÓN	Mezcla de un amonio cuaternarios de cadena gemela doble y cloruro alquil dimetil bencil amonio.
QUINTA GENERACIÓN	Mezcla de dos amonios cuaternarios de cadena gemela doble y cloruro alquil dimetil bencil amonio.



PROTÉCNICA INGENIERÍA S.A.
Especialidades Químicas

c-1.1 Buscar una buena efectividad contra microorganismos conocidos y para ello se plantearon y prepararon diferentes concentraciones (ppm) del ingrediente **amonio cuaternario** en la fórmula. 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 y una alta efectividad como **BACTERICIDA** (2), (3).

(2)

PROTÉCNICA INGENIERÍA S.A.
Especialidades Químicas

Escherichia coli

Pseudomona aeruginosa

Staphylococcus aureus

Aspergillus niger

Candida albicans
Salmonella Typhimurium

c-1.2 Buscar una buena velocidad de eliminación de microorganismos y en particular del COV2 potencializando la acción del desinfectante con la adición del otro componente en la formulación como lo es el **etanol**, el cual posee propiedades desinfectantes, pero con la particularidad de que el alcohol genera 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)}. para ello se plantearon diferentes concentraciones

(ppm) del **amonio cuaternario**. En ese sentido se prepararon muestras con diferentes concentraciones: 500 ppm, 1000 ppm, 10000 ppm. Con esto se pretendía tener un buen espectro de microorganismos ^{(2), (3)}

(2)

PROTÉCNICA INGENIERÍA S.A.
Especialidades Químicas

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

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 6.0x10(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 6.0x10(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 $6.0 \times 10(5)/5.8$ 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 $6.0 \times 10(5) / 5.8$ 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 $6.0 \times 10(5)/5.8$ 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 $4.9 \times 10(5)/5.7$ 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 (Páginaxde)3268 1996 www.tecnimicro.net

Muestra/Sample: 534496

MERIEUX

NutriScien**ces**

• **TECNIMICRO**

ACREDITADO

Aceitado ONAC

Laboratorio de Análisis S.As.

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 $4.9 \times 10(5)$ / 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 $4.9 \times 10(5)$ / 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 $4.9 \times 10(5)$ /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 $4.9 \times 10(5)$ /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 2.3×10^5 /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 $6.07 \times 10(5)/5.8$

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 $6.07 \times 10(5)/5.8$

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 $6.07 \times 10(5) / 5.8$ Log a los 120 segundos de

contacto

(**) Según Norma / Acoordinng 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 (Págin al Page 3 (de)368 1996
www.tecnimicro.net

Una empresa del grupo

MERIEUX A NutriScienc es

Muestra/Sample: 534496







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 LGOH. 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 1x10⁴ 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 CO₂ 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 número 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

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

Laboratorio Genómico One Health. Calle 75#79 A 51 Bloque M15, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia (050034). Teléfono +57-4-4255249. Email: lab_CWOHC@unal.edu.co

**Fin del
reporte**

c 1.4. ELIMINACIÓN COV2. La característica principal pretendida con el desinfectante MAXO NoMic60 es la eliminación del VIRUS SARS-COV2, el cual cumplió con el objetivo según se muestra en los resultados de análisis realizados en el laboratorio de inmunovirología de la Universidad de Antioquia como se muestra a continuación para concentraciones de 1000 y 10000 ppm.

Lo anterior nos presenta al **DESINFECTANTE NoMic60** alcanzando el objetivo principal y adicionalmente, ser el único hasta el momento en tener certificación de **VIRICIDA**, probado con cepa del SARS COV2



FACULTAD DE MEDICINA
Grupo Inmunovirología

Medellín, 6 de junio de 2020

CERTIFICADO

El Grupo Inmunovirología de la Universidad de Antioquia se permite certificar que:

El análisis de la actividad antiviral contra el virus SARS-CoV-2 (Cepa de virus aislada en la Universidad de Antioquia) realizado al desinfectante **Maxo NoMic** de la empresa Suministros Integrales, a una concentración de 10.000ppm o 1.000ppm durante un tiempo de contacto menor de 125 segundos con el virus en solución, produjo el siguiente resultado:

Se observó que la viabilidad celular se mantiene en un 100%, medida por la técnica de MTT, cuando las células fueron infectadas con el virus SARS-CoV-2 previamente en contacto con el **Maxo NoMic**; sugiriendo un efecto viricida, que se hace evidente con la disminución del efecto citopático del virus.

Atentamente,

María Teresa Rugeles López. MSc., PhD.

Coordinadora

Grupo Inmunovirología

Universidad de Antioquia

Teléfono: 2196634

e-mail: maria.rugeles@udea.edu.co

Wildeman Zapata Builes. MSc., PhD.

Coordinador Científico

Universidad de Antioquia: Carrera 51D No. 62 – 29
Conmutador: 2196000 – Fax: 2630253 Nit: 890980040-8 Apartado: 1226
Correo electrónico: facultad@medicina.udea.edu.co <http://medicina.udea.edu.co> Medellín, Colombia
Correo del grupo: inmunovirologia@siu.udea.edu.co Teléfono: 219 64 82
Ubicación: SIU - Calle 62 52-59, torre 2, laboratorio 532

c 2- 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 litros.

c-2. 1. -Se pesan los ingredientes de acuerdo con la fórmula probada y evaluada a nivel de laboratorio:

AMONIO CUATERNARIO del 80%	2%
ETANOL	32.6%
AGUA	65.4%

c-2.2 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

c-2.3 Se pesan en recipiente aparte el amonio cuaternario y el etanol, se mezclan estos ingredientes y se adicionan al tanque que contiene el agua.

c-2.4. Se agita la mezcla hasta homogenización completa. Aproximadamente 15 minutos.

c-2.5. Se para agitación, se toma muestra y se evalúan las características fisicoquímicas siguientes:

CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS	
CARACTERÍSTICA	VALOR
pH	7.0 – 8.9
APARIENCIA	Líquido claro libre de partículas

COLOR	Sin color
AROMA	Sin fragancia

c-2.6. Se procede al envasado en la línea de llenado automático en en botellas de: 5000 cc, 1000 cc, 800 cc (con tapa atomizadora); etiquetado y empacado en cajas de cartón corrugado debidamente codificadas las botellas y cajas con lote de fabricación.

III - REIVINDICACIONES

a. El desinfectante catiónico MAXO NoMic 60, es un producto de tres componentes y de una mezcla entre ellos; los cuales poseen las siguientes características:

a.1. 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.

<https://es.wikipedia.org/wiki/Biocida>

a.2. Alcohol: Compuesto químico conocido como alcohol etílico, ampliamente usado como disolvente para diferentes aplicaciones.⁽⁵⁾

(5) <https://es.wikipedia.org/wiki/Etanol>

(5) <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-antisepticos-desinfectantes-13044452>

(5) <https://medicalguidelines.msf.org/viewport/EssDr/latest/alcohol-etilico-etanol-22286288.html>

(5)https://www.insst.es/documents/94886/326962/ntp_429.pdf/353cf0a5-b164-4f6f-b53b-3124b0c90302

a.3. Agua: Sustancia compuesta por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno. Sustancia esencial e imprescindible para todos los seres vivos de la naturaleza. (6)

(6)<https://es.wikipedia.org/wiki/Agua>

b. El desinfectante catiónico MAXO NoMic60, de acuerdo con las pruebas microbiológicas de laboratorio, cumplió con las expectativas trazadas de: VIRICIDA, VELOCIDAD, AMPLIO RANGO DE ATAQUE Y NO INFLAMABILIDAD, lo que caracteriza ampliamente el desinfectante como producto eficaz y seguro.

c. El desinfectante catiónico MAXO NOMIC 60, en las pruebas microbiológicas de laboratorio dieron efectividad para **60 segundos de contacto**, cumpliendo con las expectativas deseadas.

d. El desinfectante catiónico MAXO NOMIC 60, es un producto desarrollado para la limpieza de superficies con el fin de eliminar el virus COVID 19 causante de pandemia con altos niveles de propagación.

e. El desinfectante catiónico MAXO NO-MIC 60, es un producto que se utiliza directamente o diluyendo 1 en 10, esparciendo su contenido en la superficie a tratar con el fin de ejercer una acción desinfectante y viricida.

f. El desinfectante catiónico MAXO NO-MIC 60, se aplica entre otros objetos del hogar en: mesas, mesones, sillas, teléfonos, armarios, gabinetes, sofás, pasamanos, tubos, puertas, ventanas, sanitarios, lavamanos, mesones de cocina, suiches, manijas de puertas, chapas, llaves, etc.

Para elementos electrónicos, se recomienda realizar la desinfección utilizando un paño suave.

g. El desinfectante catiónico MAXO NoMic 60, se desarrolló sin el uso de color y fragancia (NEUTRO) con el fin de facilitar su uso en restaurantes y empresas de producción de alimentos, ya que allí tanto el color como las fragancias tienen un uso restringido. En esencia, tanto el color como la fragancia constituyen en el producto un aspecto estético (color y olor) y no influyen para nada en la efectividad para el fin deseado del producto ^{(7), (8)}

PROPOSITO:

“La limpieza de superficies visiblemente sucias seguida de desinfección es una medida de mejores prácticas para la prevención de COVID-19 y otras enfermedades respiratorias virales en hogares y entornos comunitarios.”

El objetivo de control es limitar la supervivencia del virus en los entornos

⁽⁷⁾There is much to learn about the novel coronavirus (SARS-CoV-2) that causes coronavirus disease 2019 (COVID-19). Based on what is currently known about COVID-19, spread from person-to-person of this virus happens most frequently among close contacts (within about 6 feet). This type of transmission occurs via respiratory droplets. On the other hand, transmission of novel coronavirus to persons from surfaces contaminated with the virus has not been documented. Recent studies indicate that people who are infected but do not have symptoms likely also play a role in the spread of COVID-19. Transmission of coronavirus occurs much more commonly through respiratory droplets than through fomites. Current evidence suggests that SARS-CoV-2 may remain viable for hours to days on surfaces made from a variety of materials. Cleaning of visibly dirty surfaces followed

by disinfection is a best practice measure for prevention of COVID-19 and other viral respiratory illnesses in households and community settings.

(8)https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/cleaning-disinfection.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fprepare%2Fcleaning-disinfection.html

NOTA 1: RESALTADO ROJO, CITAS BIBLIOGRÁFICAS

NOTA 2. RESALTADO AZUL, RESULTADOS LABORATORIO.

La transmisión del coronavirus ocurre con mucha más frecuencia a través de gotitas respiratorias que a través de objetos y superficies, como: pomos de puertas, encimeras, teclados, juguetes, etc, se genera una fuente alta de contaminación y propagación. La evidencia actual sugiere que el SARS-CoV-2 puede permanecer viable durante horas o días en superficies hechas de una variedad de materiales. La limpieza de superficies visiblemente sucias seguida de desinfección es una medida de mejores prácticas para la prevención de COVID-19 y otras enfermedades respiratorias virales en hogares y entornos comunitarios.

El objetivo de control es limitar la supervivencia del virus en los entornos.