

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 263**

51 Int. Cl.:

A01N 33/12 (2006.01)
A01N 35/08 (2006.01)
A01N 47/44 (2006.01)
A61L 2/00 (2006.01)
A01N 31/08 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2014 PCT/GB2014/052614**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15028806**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2014 E 14759051 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 3041352**

54 Título: **Líquido limpiador**

30 Prioridad:

02.09.2013 GB 201315573

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2018

73 Titular/es:

**JVS PRODUCTS LIMITED (100.0%)
C/O Wilkins Kennedy LLP Templars House
Lulworth Close
Chandlers Ford Hampshire SO53 3TL, GB**

72 Inventor/es:

SCOONES, ROBERT

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 655 263 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Líquido limpiador

5 La presente invención se refiere a un líquido limpiador. Más particularmente, la presente invención se refiere a un líquido limpiador para desinfectar superficies y desinfectar suministros de agua. La presente invención también se refiere a un método para formar un líquido limpiador.

10 Las superficies a menudo están en contacto con, proporcionan un medio y proporcionan una atmósfera propicia para patógenos potencialmente nocivos. Ejemplos no limitativos de superficies incluyen suelos, tableros y encimas de cocina que tienen cualquier ángulo en relación con el nivel del suelo y con cualquier forma, es decir, la referencia a las superficies no se limita a superficies planas. Un patógeno potencialmente nocivo es cualquier organismo que puede causar enfermedad. Ejemplos de patógenos potencialmente nocivos incluyen bacterias, hongos, virus, alérgenos, mohos y levaduras.

15 Es común limpiar superficies con agentes que actúan para mitigar y/o destruir patógenos nocivos. La limpieza de superficies de esta manera es beneficiosa para la salud humana y animal, así como para prevenir la propagación de enfermedades y mitigar las posibilidades de que un sujeto o sujetos contraigan una enfermedad al estar en contacto con patógenos potencialmente nocivos.

20 Un medio donde es particularmente beneficioso limpiar superficies con agentes que actúan para mitigar y/o destruir patógenos potencialmente nocivos es un medio veterinario, por ejemplo, en un quirófano veterinario.

25 Otro medio donde es particularmente beneficioso limpiar superficies con agentes que actúan para mitigar y/o destruir patógenos potencialmente nocivos es un medio hospitalario, por ejemplo, en un quirófano de hospital.

Otro medio donde es particularmente beneficioso limpiar superficies con agentes que actúan para mitigar y/o destruir patógenos potencialmente nocivos es un servicio público, por ejemplo, el suelo alrededor de una piscina.

30 Hay otros muchos medios donde es particularmente beneficioso limpiar superficies con agentes que actúan para mitigar y/o destruir patógenos potencialmente nocivos que incluyen, aunque no se limitan a, limpieza general del hogar, escenarios de hostelería, hoteles, asilos, cruceros y equipos industriales que procesan alimentos.

35 Las superficies en quirófanos veterinarios, hospitales, servicios públicos y otras áreas donde personas y animales podrían entrar en contacto con patógenos nocivos debería limpiarse regularmente para prevenir la acumulación de patógenos potencialmente nocivos. Los líquidos limpiadores usados para limpiar superficies incluyen soluciones con lejía, soluciones de detergente para vajillas, desinfectantes con base de alcohol y líquido desinfectante general. Un ejemplo no limitativo de líquido desinfectante es Dettol™, como lo venden actualmente en Reino Unido Reckitt Benckiser™.

40 Al usar líquidos limpiadores, el líquido limpiador a menudo se transfiere desde el depósito, por ejemplo, un cubo o un bol, u otro recipiente, a una superficie potencialmente contaminada con uno o más patógenos.

45 Al limpiar superficies y/o suministros de agua, en particular al limpiar superficies en hospitales, es preferible que el agente anti-patógeno esté activo en presencia de materia orgánica durante un número de minutos, por ejemplo, hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 y 90 minutos, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 horas, y todos los otros tiempos entre ellos. Es particularmente preferible que el agente anti-patógeno esté activo durante al menos 60 minutos y hasta 24 horas en un medio de hospital para que un limpiador pueda continuar usando una solución limpiadora que contiene un líquido limpiador durante una cantidad adecuada de tiempo, sin tener que rellenar repetidamente la solución limpiadora, por ejemplo porque la actividad del agente anti-patógeno haya disminuido.

50 Las formulaciones conocidas para limpiar suelos incluyen soluciones con lejía, que son efectivas en la destrucción de patógenos en superficies. Sin embargo, la lejía puede ser perjudicial para humanos y animales en sí misma. Las soluciones líquidas para fregar tienen actividad anti-patógeno relativamente débil. Los desinfectantes con base de alcohol se usan, pero el alcohol, que tiene actividad anti-patógeno, es relativamente volátil de manera que se evapora y tiene un tiempo de actividad anti-patógeno relativamente corta.

55 Es preferible que los líquidos limpiadores, específicamente aquellos usados en un medio de hospital, tengan una actividad anti-patógeno relativamente larga (alrededor de 1 hora) para que, por ejemplo, después de que el suelo se haya fregado la actividad anti-patógeno continúe durante un tiempo suficiente como para que los patógenos no tengan la opción de asentarse y/o crecer entre ciclos de limpieza. El desinfectante líquido, por ejemplo, Dettol™, es efectivo en su actividad anti-patógeno, pero muchos patógenos desarrollan resistencia a desinfectantes con largos usos.

65

Los líquidos limpiadores también se usan en suministros de agua, por ejemplo, en piscinas, jacuzzis (por ejemplo Jaccuzzis™) y balnearios donde las personas se ponen en contacto con agua comunal. Los suministros de agua en piscinas a menudo se tratan con cloro. Los suministros de agua en jacuzzis a menudo se tratan con ozono y/o con la introducción de halógenos, por ejemplo, bromuro, en el suministro de agua.

En el caso de un patógeno particular, concretamente *Cryptosporidium parvum*, la contaminación de piscinas y aguas recreativas es un problema serio. Una vez que las aguas se contaminan, es fácil que el organismo se transmita a humanos y la infección ocurra tan pequeña como a partir de 132 ooquistes (DuPont et al. (1995), La infectividad de *Cryptosporidium parvum* en voluntarios sanos, 332(13): 855-859). El tratamiento actual de estas aguas con cloro es inefectivo para eliminar este organismo, como previos estudios han demostrado que el tratamiento con 4 ppm de cloro a pH 7 durante 25 horas dio como resultado ningún descenso en la viabilidad celular como se ve en el ensayo DAPI/PI, y solamente el 4% de reducción en viabilidad celular cuando se usó el ensayo de exquistación (Widmer, (2002), Mecanismos moleculares de inactivación química de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*, Fundación de Investigación AWWA).

WO 2012/080918 se refiere a composiciones microbicidas sinérgicas que comprenden un compuesto de amonio cuaternario, tal como cloruro de benzalconio, y un biocida catiónico, tal como PHMB.

Existe la necesidad de un líquido limpiador nuevo que pueda aplicarse a superficies y usarse en tratamiento de agua, que sea efectivo en la mitigación de totales de patógenos y no tenga efectos secundarios dañinos, o tenga muy pocos, en humanos y animales.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un líquido limpiador para inhibir patógenos, comprendiendo el líquido limpiador:

cloruro de benzalconio,
cloruro de didecildimetilamonio,
clorhidrato de polihexametileno biguanida,
Bronopol, y
p-cloro-m-cresol.

Preferentemente, comprende además un glicol de alquileo.

Preferentemente además, donde el glicol de alquileo es glicol de etileno, glicol de propileno, glicol de dietileno, copolímeros en bloque de etilenoóxido y propilenoóxido, y otros glicoles de alquileo formados combinando óxido de alquileo y/o cualquier combinación de glicoles de alquileo.

Ventajosamente, donde el glicol de alquileo comprende o consiste en glicol de etileno.

Preferentemente, donde el líquido limpiador no incluye uno o más siloxanos.

Además preferentemente, donde el líquido limpiador comprende 0,5-2,5% de peso de glicol de alquileo.

Ventajosamente, donde el líquido limpiador comprende 0,01-0,1% de peso de p-cloro-m-cresol.

Preferentemente, donde el líquido limpiador comprende, en% de peso:

0,5-10 cloruro de benzalconio,
0,5-10 cloruro de didecildimetilamonio,
0,5-10 clorhidrato de polihexametileno biguanida,
0,3-5 bronopol, y
0,01-0,1 p-cloro-m-cresol.

Además preferentemente, donde el líquido limpiado comprende o consiste en:

cloruro de benzalconio;
cloruro de didecildimetilamonio;
clorhidrato de polihexametileno biguanida;
bronopol;
p-cloro-m-cresol;
etanol; y
glicol de etileno.

Ventajosamente, donde el líquido limpiador comprende, o consiste en, en% de peso:

- 5 0,5-10 cloruro de benzalconio;
0,5-10 cloruro de didecildimetilamonio;
0,5-10 clorhidrato de polihexametileno biguanida;
0,3-5 bronopol;
0,01-0,1 p-cloro-m-cresol;
3-10 etanol; y,
0,5-2,5 glicol de etileno;
- 10 y/o cualquier valor intermedio de cada rango para cada componente; siendo el resto agua.
- 15 Preferentemente, donde el líquido limpiador comprende, o consiste en, en% de peso:

3 cloruro de benzalconio;
3 cloruro de didecildimetilamonio;
3,3 clorhidrato de polihexametileno biguanida;
0,9 bronopol;
0,04 p-cloro-m-cresol;
4,9 etanol; y,
1,0 glicol de etileno;
- 20 siendo el resto agua.
- 25 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una mezcla acuosa que comprende: agua y un líquido limpiador de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores.
- 30 Preferentemente, donde el agua es agua del grifo, agua potable, agua destilada, agua sucia, agua que contiene tierra, agua que contiene efluente, agua que contiene patógenos, agua que contiene desechos, aguas residuales y/o agua salobre.
- 35 Además preferentemente, donde la composición tiene una proporción de agua por volumen con líquido limpiador de desde 99% agua a 1% líquido limpiador, de 1% agua a 99% líquido limpiador, o cualquier valor intermedio.
- 40 Ventajosamente, donde la composición tiene una proporción de agua por volumen con líquido limpiador de 99%, 95%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% o 0,05% de agua con líquido limpiador.
- 45 Preferentemente, donde la composición tiene una proporción de agua por volumen con líquido limpiador de desde 99% agua a 1% líquido limpiador.
- 50 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para limpiar una superficie, que comprende:

proporcionar un líquido limpiador o una mezcla acuosa de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores; y aplicar la mezcla a una superficie.
- 55 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para desinfectar agua, que comprende:

proporcionar un líquido limpiador o una mezcla acuosa de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores; y poner en contacto el líquido limpiador o mezcla acuosa con agua para desinfectar.
- 60 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar un líquido limpiador de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores;

proporcionar los componentes de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores; y mezclar los ingredientes en una mezcladora.
- 65 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una toallita para su aplicación en la piel, comprendiendo la toallita un líquido limpiador o una mezcla acuosa de acuerdo con una cualquiera de los anteriores.
- De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un líquido limpiador o una mezcla acuosa de uno cualquier de los anteriores, en uno cualquiera de:

limpiar una superficie;
desinfectar un suministro de agua; o
desinfectar un área de la piel.

5 Preferentemente, el uso en la desinfección de un suministro de agua, cuando el líquido limpiador o mezcla acuosa de uno cualquiera de los anteriores se usa como un suplemento, o demás del tratamiento de agua con cloro.

Composición A

10 Algunos de los componentes de los líquidos limpiadores de la presente invención, junto con sus fuentes, se exponen más abajo.

15 La composición A, también referida como SQ53 en esta especificación (algunas veces referida como JVS 90 o JVS Fórmula 90 por el inventor, pero no en esta especificación), es un ejemplo no limitativo de una composición de acuerdo con la presente invención:

Nombre en el mercado	Nombre genérico	Número CAS	Cantidad de composición A (% peso) en neto	Cantidad (% peso) en 1:19 v/v
Acticide BAC50M	Cloruro de benzalconio	63449-41-2	3	0,15
Acticide DDQ50	Cloruro de didecildimetilamonio	7173-51-5	3	0,15
Acticide PHB20	Clorhidrato de polihexametileno biguanida	27083-27-8	3,3	0,165
Acticide L	Bronopol	52-51-7	0,9	0,045
Acticide PCMC	P-cloro-m-cresol	59-50-7	0,04	0,002
	Etanol	64-17-5	4,9	0,245
	Glicol de etileno	107-21-1	1,0	0,05
	Agua		83,86	99,193

35 La composición A es una composición de acuerdo con una realización preferente de la presente invención. Los nombres de los ingredientes se enumeran, junto con su número CAS (servicio de abstractos químicos). El número CAS se ha dado porque el registro CAS es una referencia estándar para personas que miran clasificar compuestos que son conocidos en la literatura científica. En todas las composiciones, la cantidad de cada ingrediente se proporciona en % de peso (también referido en esta especificación como % peso o % p/p). La columna "cantidad ... en neto" muestra la composición neta. La columna "cantidad... 1:19 v/v" muestra la cantidad de cada componente en una solución de composición-agua neta 1:19 v/v. La indicación v/v indica que la proporción es por volumen.

45 Componentes de la composición A

50 Cloruro de benzalconio es una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio de varias longitudes de cadena de alquilo de número par. El cloruro de benzalconio puede actuar entre otros como un biocida, un surfactante catiónico y un agente de transferencia de fase. Un ejemplo no limitativo de un tamaño de lote para composición A es 10 kg.

Cloruro de didecildimetilamonio es un compuesto que actúa entre otros como un antiséptico y/o desinfectante, esto es, un biocida.

55 Clorhidrato de polihexametileno biguanida es un polímero que actúa entre otros como un desinfectante y/o un antiséptico, esto es, un biocida.

Bronopol es un compuesto que actúa entre otros como antimicrobiano, esto es, un biocida. Bronopol se usa comúnmente como un conservante en productos de consumo, por ejemplo, en cosméticos.

60 P-cloro-m-cresol (4-cloro-3-metilfenol) es un compuesto que actúa entre otros como un antiséptico y conservante, esto es, un biocida. P-cloro-m-cresol se usa a menudo en lavado de manos.

65 Etanol es un líquido incoloro a menudo usado como un disolvente.

Glicol de etileno es un compuesto comúnmente usado en anti-congelantes y como un precursor para algunos polímeros. En otras realizaciones, glicol de etileno puede sustituirse, en su totalidad o en parte, por otros glicoles de alquileo, por ejemplo: glicol de propileno, glicol de dietileno, copolímeros en bloque de etilenoóxido y propilenoóxido (por ejemplo, diferentes tipos de Pluronic™ como lo vende BASF™), cualquier otro glicol de alquileo formado combinando óxido de alquileo y/o cualquier combinación de glicoles de alquileo.

Protocolo de fabricación para composición A

Lo siguiente es un protocolo para formar un líquido limpiador de acuerdo con la composición A mostrada anteriormente. Las cantidades de cada ingrediente usado en cada etapa se muestran más arriba, esto es, no se especifica en el método más abajo.

En una realización ejemplar, todos los ingredientes de la composición A se mezclan en cualquier orden, en las cantidades especificadas en las tablas, para dar como resultado una formulación de acuerdo con la presente invención.

En otra realización ejemplar, la composición a se prepara de la siguiente manera:

- i. Seleccionar un recipiente limpio para fabricación, por ejemplo, un recipiente de mezcla de acero inoxidable con un eje de transmisión.
- ii. Asegurar que todas las entradas o salidas del vaso de fabricación estén limpias.
- iii. Medir todas las materias primas, como sean requeridas para la composición.
- iv. Opcionalmente, añadir agua para la dilución final deseada.
- v. Introducir los siguientes componentes, preferentemente en orden: (1) Acticide PCMC; (2) Acticide L; (3) Acticide BAC 50; (4) Acticide DDQ 50; (5) Acticide PHB20, mezclar los componentes bien de manera continua o después de cada introducción.
- vi. Añadir por separado en etanol, seguido de glicol de etileno, mezclar de manera continua a 25°C y 100kPa hasta que todos los componentes se hayan disuelto.
- vii. Opcionalmente, añadir agua adicional para diluir la mezcla hasta un grado deseado.

La composición se filtra opcionalmente con un filtro de 25 micrones.

Los rangos para cada uno de los ingredientes en la composición A se proporcionan en la tabla más abajo. Se espera que todas las composiciones que se clasifican dentro de estos límites tengan los mismos efectos. Los rangos se proporcionan para mostrar los rangos que se han probado. Los rangos incluyen individualmente un valor intermedio, por ejemplo, 10-20 incluye 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, y cada uno además un valor intermedio.

Rangos de composición A (ejemplo):

Nombre en el mercado	Nombre genérico	Número CAS	Cantidad de composición A (% peso) en neto	Rangos para cantidad de composición A (% peso) en neto
Acticide BAC50M	Cloruro de benzalconio	63449-41-2	3	0,5-10
Acticide DDQ50	Cloruro de didecildimetilamonio	7173-51-5	3	0,5-10
Acticide PHB20	Clorhidrato de polihexametileno biguanida	27083-27-8	3,3	0,5-10
Acticide L	Bronopol	52-51-7	0,9	0,3-5
Acticide PCMC	P-cloro-m-cresol	59-50-7	0,04	0,01-0,1
	Etanol	64-17-5	4,9	3-10
	Glicol de etileno	107-21-1	1,0	0,5-2,5
	Agua		83,86	52,40-94,69

La composición A, de acuerdo con la presente invención, está de acuerdo con la Regulación (CE) 1907/1006 (REACH). En otras palabras, los ingredientes cumplen con la ley relevante de la CE en seguridad de sustancias químicas usadas en medios domésticos.

En una realización alternativa, el glicol de etileno puede sustituirse por un glicol de etileno diferente, por ejemplo, glicol de monopropileno. Otros ejemplos de glicoles de alquileo incluyen, aunque no se limitan a, glicol de dietileno, copolímeros en bloque de etilenoóxido y propilenoóxido (por ejemplo, diferentes tipos de Pluronic™ como lo

vende BASF™), cualquier otro glicol de alquileo formado combinando óxido de alquileo y/o cualquier combinación de glicoles de alquileo.

5 En uso, las composiciones de la presente invención se mezclan con agua. Las proporciones preferentes de mezcla con agua para composición A neta ejemplar son, en términos de porcentaje (donde 1% significa 99 partes de agua y 1 parte de composición ejemplar) 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% y 0,05%. Una proporción opcional de mezcla es 1%, las realizaciones ejemplares incluyen mezclar la
10 composición neta con desde 15 a 25 partes de agua (o cualquier valor intermedio) con una parte de composición A neta, por volumen, en una realización particularmente preferente, la composición neta se mezcla con agua en una proporción de una parte de composición neta con 19 partes de agua (1:19 v/v), esto es, como se muestra en la columna a mano derecha de la tabla que subraya la composición neta A. En otra realización particularmente preferente, la composición neta se mezcla con agua en una proporción de una parte de composición neta con 20 partes de agua (1:20 v/v). En otra realización particularmente preferente, la composición neta se mezcla con agua en
15 una proporción de una parte de composición neta con 60 partes de agua (1:60 v/v).

En uso, las composiciones de limpieza de la presente invención se aplican a una superficie mediante un aplicador, por ejemplo, una fregona, una esponja, un trapo, una toalla o un guante. En uso, las composiciones de limpieza de la presente invención se almacenan en un receptáculo, por ejemplo, un cubo, para su aplicación con un aplicador. En una realización particularmente preferente, las composiciones de limpieza de la presente invención se almacenan en un bol y se aplican a una superficie con un trapo.

En un uso alternativo, las composiciones de limpieza de la presente invención se producen en un suministro de agua, por ejemplo, un suministro de agua para usarse en o para introducirse en una piscina. El suministro de agua contacta con la composición de limpieza y después se vuelve a introducir en la piscina.

En un uso alternativo, las composiciones de limpieza de la presente invención se introducen en la piel de un usuario, por ejemplo, por medio de una toallita o aplicando con un atomizador.

30 **Pruebas de desinfección de superficies**

1. Una variedad de patógenos

35 Se realizaron un número de pruebas en la composición A por D. C. Watson en Abbott Analytical, en New Ferry, Reino Unido, bajo un acuerdo de confidencialidad. Estas pruebas se realizaron bajo diferentes estándares europeos, usando un dilución 1:20 v/v de la versión "heta" de la composición A con agua. Estos estándares europeos son referidos como EN XX, donde XX es el número asignado a la prueba estándar por la Organización Europea de Estandarización. Las conclusiones de Abbott Analytical fueron las siguientes:

- 40 • Composición A, cuando está diluida en 1:20 v/v, pasa el requisito de EN 1276 para actividad bactericida (*Pseudomonas aeruginosa* (NCIMB 10421), *Escherichia coli* (NCTC 10418), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Enterococcus hirae* (NCIMB 8192)) en 5 minutos a 20°C bajo condiciones sucias contra todos los organismos de referencia detallados.
- 45 • Composición A, cuando está diluida en 1:20 v/v, pasa los requisitos de EN 1276 para actividad bactericida (*Listeria monocytogenes* (NCTF 11994), *Salmonella typhimurium* (NCTC 74), *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (NCTC 12493)) en 5 minutos a 20°C bajo condiciones sucias contra todas los organismos de referencia citados.
- 50 • Composición A, cuando está diluida en 1:20 v/v, pasa los requisitos de EN 1276 para actividad bactericida (*Legionella pneumophila* (NCTC 12821)) en 60 minutos a 30°C contra *Legionella pneumophila*.
- 55 • Composición A, cuando está diluida en 1:20 v/v, pasa los requisitos de EN 1276 para actividad bactericida (*Streptococcus dysgalactiae* (NCIMB 702023), *Streptococcus uberis* (NCIMB 2038), *Streptococcus suis* (NCTC 10234), *Streptococcus equi* (NCTC 7912)) en 5 minutos a 20°C bajo condiciones sucias contra todas los organismos de referencia citados.
- 60 • Composición A, cuando está diluida en 1:20 v/v, pasa los requisitos de EN 1650 para actividad fungicida (*Aspergillus fumigatus* (NCPF 7102)) en 15 minutos a 20°C bajo condiciones sucias contra todas los organismos de referencia citados.
- 65 • Composición A, cuando está diluida en 1:20 v/v, pasa los requisitos de EN 13704 para actividad esporicida (*Clostridium difficile* (NCTC 11209)) en 60 minutos a 20°C bajo condiciones sucias contra todas los organismos de referencia citados.

- Composición A, cuando está diluida en 1:20 v/v, pasa los requisitos de EN 13704 para actividad esporicida (*Bacillus subtilis* (NCIMB 8054), *Bacillus cereus* (ATCC 12826)) en 60 minutos a 20°C bajo condiciones sucias contra todos los organismos de referencia citados.
- Composición A, cuando está diluida en 1:20 v/v, pasa los requisitos de EN 1500 para friegas higiénicas con manos cuando se probó bajo los procedimientos descritos anteriormente. Esto muestra que la composición es adecuada para mitigar la presencia de patógenos en manos.

En resumen, la composición A resultó tener efectos antibacterianos, antifúngicos y antiesporicidas. La composición A también resultó ser adecuada para su uso como friega manual.

2. Seguridad

Además, Reading Scientific Services Ltd, Reading, Reino Unido, realizó una evaluación de seguridad de la composición A, bajo un acuerdo de confidencialidad.

Reading Scientific Services Ltd concluyó que la composición A cumple con la Regulación Europea de Cosméticos y no debería causar daño a la salud bajo uso normal y razonablemente predecible.

3. Efecto contra MRSA y E. coli

Se realizaron más pruebas sobre la efectividad de las composiciones de la presente invención, concretamente, las composiciones A detalladas anteriormente.

Las pruebas las realizaron la Doctora Susanna Sherwin y el Profesor Bill, Keevil, bajo un contrato de confidencialidad, en la Unidad de Salud Ambiental en la Universidad de Southampton, Reino Unido, sus métodos y resultados se exponen más abajo, con referencia a las figuras.

Se usaron cuatro protocolos experimentales

A. Conteos celulares cultivables: Cubrir la superficie con bacterias y después añadir biocida

Cultivos de MRSA (20 µl) durante la noche se cubrieron en cupones de acero inoxidable de 1 cm² y se dejaron secar; 20 µl de alícuotas de composición A 5% (v/v) se añadieron a los cupones, y se incubaron a temperatura ambiente durante 0 horas (control) o 2 horas. Después de la incubación, las células se retiraron de los cupones con vórtice en PBS con gotas de vidrio, y la solución resultante se diluyó y se colocó en placas con nutriente de agar. Después de incubación durante la noche a 37°C, se contaron las células viables. Las colonias que crecieron en las placas con nutriente de agar en este periodo de tiempo indican los números de MRSA presentes en la muestra original que fueron cultivables en el laboratorio, y se denominan unidades formadoras de colonias (UFC).

B. Conteos de células cultivables: Cubrir la superficie con biocida y después añadir bacterias

Los cupones de acero inoxidable se sumergieron en la composición A, retiraron y dejaron secar. Después se añadieron cultivos de MRSA (20 µl) durante la noche a los cupones, y los cupones se incubaron a temperatura ambiente durante 0 horas (control) y 2 horas. Después de la incubación, las células se retiraron de los cupones con vórtice en PBS con gotas de vidrio, y la solución resultante se diluyó y se colocó en placas con nutriente de agar. Después de incubación durante la noche a 37°C, se contaron las células viables.

C. Tinción en microscopio live/dead

Se realizaron experimentos como se ha mencionado anteriormente, y después de la incubación se añadió tinte fluorescente live/dead a los cupones de acero, y se incubaron a oscuras durante 15 minutos. Se usó un microscopio de epifluorescencia para observar el número total de células (verde) en comparación con las células muertas con membranas citoplásmicas dañadas (rojo).

D. Ensayo de alargamiento celular usando E. coli

Una alícuota de 100 µl de un cultivo de una noche de *E. coli* (cepa DH5-α) se añadió a 900 µl de tampón PBS, o 900 µl de biocida (5% v/v). Después de 2 horas de incubación, las células se granularon mediante centrifugación, y después se volvieron a suspender en 1 ml PBS. Esto se añadió a 9 ml de 50% de caldo R2. Se añadió ácido pipemídico (concentración final de 100 µg/ml) a la solución para parar la réplica de células vivas, provocando que las células vivas se alargaran. Las muestras se incubaron durante 18 horas a 22°C, antes de teñirse con tinte fluorescente SYTO9. Una alícuota de 1 ml de la muestra se filtró a través de filtros de policarbonato de 0,2 µm, y se examinó usando un microscopio epifluorescente. Se contaron las células de longitud normal (muertas), al igual que las células alargadas (vivas).

Resultados:

A y B. Conteos de células cultivables

5 La composición A (en una concentración de 1 partes “neta” con 19 partes de agua (1:19 v/v)) dio como resultado una eliminación bactericida después de dos horas de tiempo de contacto. Sin embargo, el orden con el que las bacterias y el biocida se añadieron a los cupones de acero resultaron ser cruciales para el efecto eliminador de la composición. Si los cupones de acero inoxidable estaban pre-cubiertos con MRSA, y los biocidas se añadían posteriormente, se veía un efecto eliminador 1-2 log usando métodos de cultivo (Tabla 1 y Figura 1). Sin embargo, se un cupón estéril se cubrió en biocida antes de introducir MRSA al sistema, no se pudo detectar MRSA viable después de 2 horas de incubación (Tabla 1 y Figura 2).

Tabla 1. Números de células viables cultivadas después de incubación durante la noche.

15 Las células cultivables se miden como unidades formadoras de colonias (UFC)

Condiciones	Número medio de células en hora 0 (UFC ml ⁻¹)	Número medio de células en hora 2 (UFC ml ⁻¹)	% de supervivencia
MRSA sólo	4,13E+06	3,47E+06	83,87
MRSA precubierto más SQ53	6,67E+05	1,97E+04	2,96
SQ53 precubierto más MRSA	1,77E+06	0,00E+00	0,00

20

25 La Figura 1 muestra el conteo bacteriano cultivable medio después de tratamiento con composición A. MRSA se pre-cubrió en cupones de acero, y se añadió el biocida SQ53. Cada barra es una media de 6 réplicas, con barras de error que indican el error estándar de las réplicas.

30 La Figura 2 muestra el conteo bacteriano cultivable medio después de tratamiento con composición. SQ53 se pre-cubrió en cupones de acero, y se añadió MRSA. Cada barra es una media de 6 réplicas, con barras de error que indican el error estándar de las réplicas.

35 Las Figuras 1 y 2 muestran que la composición A tiene un efecto fuerte contra MRSA, bajo las condiciones especificadas de la prueba.

C. Conteo de células totales usando tinción de viabilidad BacLight Live/Dead

40 Además de los métodos de cultivo, las células tratadas se tiñeron con tintes fluorescentes Live/Dead para que la proporción de células supervivientes pudiera enumerarse usando microscopio de epifluorescencia. Sin embargo, mientras fue posible recoger imágenes fluorescentes de células bacterianas totales usando el tinte Live/Dead, no fue posible observar tinte fluorescente de célula “muerta” usando el tinte de yoduro de propidio (IP) para membranas bacterianas comprometidas. Esto puede ser debido a la acción de la composición A (esto es, SQ53) que se cree que envuelve la célula bacteriana, afectando así al uso de moléculas más grandes, como la cepa PI “muerta”.

D. Estudio de alargamiento celular usando *E. coli*

50 Se realizó un experimento adicional con el fin de determinar la eficacia de los biocidas usando microscopio. Para este experimento solamente se usó una bacteria diferente, *E. coli*. Después del tratamiento con biocidas, las células se incubaron con un antibiótico, ácido pipemédico. Si hubiera presentes células vivas, comenzarían a replicarse, pero serían incapaces de separarse físicamente, dando como resultado una célula alargada, fácilmente visible bajo el microscopio, mientras que las células muertas mantendrían el tamaño de una bacteria sencilla. Se fotografiaron una media de 50 campos de visión por tratamiento, y usando estos resultados, pueden calcularse el total de células vivas y muertas por muestra original.

Cálculo de número de campos de visión por filtro:

60

Un campo de visión	= 11623,58 µm ²
Diámetro de membrana filtro	= 21000 µm
Área de membrana filtro (π r ²)	= 346360590,1 µm ²
Números de campos de visión por filtro	= 346360590,1 / 11623,58
	= 23963,702 campos de visión

65 Por lo tanto, el conteo global medio de total de células por campo de visión se multiplicó por este factor para conseguir el conteo de célula total por filtro, y así el conteo de célula total por una muestra de 1 1 ml (los datos se

muestran en la Tabla 2). Mediante este método, fue posible determinar que la composición A dio como resultado al menos una eliminación de 2 log, aunque en este ensayo la composición A pareció dar como resultado la eliminación completa de células de *E. coli* (Figura 3). Sin embargo, la composición tuvo un efecto adverso en el ensayo. Una vez que las células se habían tratado con la composición, se hicieron mucho más pegajosas que las células de control. Esto significó que fueron incapaces de volver a suspender por completo las células tratadas antes del ensayo de alargamiento celular, lo que dio como resultado un menor número de células que podían contarse (Tabla 2).

Tabla 2. Número total de células *E. coli* vivas y muertas determinado por microscopio de efluorescencia. Las células por ml se determinaron calculando células medias por campo de visión de un total de 50 campos de visión, y después calculando el número de células por filtro.

	Número medio de células muertas (células ml ⁻¹)	Número medio de células alargadas (células ml ⁻¹)
Control (<i>E. coli</i> en PBS)	1,31E+07	1,31E+0,6
SQ53	5,18E+06	0,00E+00

La Figura 3 muestra el número total de células *E. coli* vivas y muertas que se determina usando el ensayo de alargamiento celular. Las barras indican el conteo de células muertas, y los conteos de células vivas (alargadas) como lo determinó el ensayo de alargamiento celular, y las barras de error indican errores estándares de las réplicas.

El ensayo de alargamiento celular, llevado en *E. coli*, fue capaz de mostrar que la composición A, cuando se aplicó a un cultivo celular, da como resultado una muerte celular completa. La composición A resultó ser más efectiva que líquidos limpiadores conocidos, mientras que al mismo tiempo no incluye componentes que son dañinos para la salud humano o animal.

4. Pruebas comparativas

Se realizaron más pruebas por D. C. Watson en Abbott Analytical, en New Ferry, Reino Unido, bajo un acuerdo de confidencialidad. Estas pruebas se realizaron bajo el mismo estándar europeo, usando una dilución 1:20 v/v de la versión "neta" de la composición A.

Como se ha mencionado anteriormente, la composición A pasa los requisitos de EN 1276 para actividad bactericida (*Pseudomonas aeruginosa* (NCIMB 10421), *Escherichia coli* (NCTC 10418), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Enterococcus hirae* (NCIMB 8192)) en 5 minutos a 20°C bajo condiciones sucias contra todos los organismos de referencia detallados.

Como comparación, soluciones de Acticide BAC50M (cloruro de benzalconio), Acticide DDQ 50 (cloruro de didecildimetilamonio), Acticide PHB 20 (clorhidrato de polihexametileno biguanida), Acticide L (Bronopol) y Acticide PCMC (p-cloro-m-cresol) se probaron individualmente bajo las mismas condiciones. En estas pruebas estuvieron presentes las mismas cantidades relativas de etanol, glicol de etileno y agua, como en la composición A.

Acticide BAC50M (cloruro de benzalconio) en la misma concentración que en la composición A, cuando se diluyó en 1:20 v/v, no pasa los requisitos de EN 1276 para actividad bactericida (*Pseudomonas aeruginosa* (NCIMB 10421), *Escherichia coli* (NCTC 10418), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Enterococcus hirae* (NCIMB 8192)) en 5 minutos a 20°C bajo condiciones sucias contra todos los organismos de referencia detallados.

Acticide DDQ50 (cloruro de didecildimetilamonio) en la misma concentración que en la composición A, cuando se diluyó en 1:20 v/v, no pasa los requisitos de EN 1276 para actividad bactericida (*Pseudomonas aeruginosa* (NCIMB 10421), *Escherichia coli* (NCTC 10418), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Enterococcus hirae* (NCIMB 8192)) en 5 minutos a 20°C bajo condiciones sucias contra todos los organismos de referencia detallados.

Acticide PHB20 (clorhidrato de polihexametileno biguanida) en la misma concentración que en la composición A, cuando se diluyó en 1:20 v/v, no pasa los requisitos de EN 1276 para actividad bactericida (*Pseudomonas aeruginosa* (NCIMB 10421), *Escherichia coli* (NCTC 10418), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Enterococcus hirae* (NCIMB 8192)) en 5 minutos a 20°C bajo condiciones sucias contra todos los organismos de referencia detallados.

Acticide L (Bronopol) en la misma concentración que en la composición A, cuando se diluyó en 1:20 v/v, no pasa los requisitos de EN 1276 para actividad bactericida (*Pseudomonas aeruginosa* (NCIMB 10421), *Escherichia coli* (NCTC 10418), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Enterococcus hirae* (NCIMB 8192)) en 5 minutos a 20°C bajo condiciones sucias contra todos los organismos de referencia detallados.

Acticide PCMC (P-cloro-cresol) en la misma concentración que en la composición A, cuando se diluyó en 1:20 v/v, no pasa los requisitos de EN 1276 para actividad bactericida (*Pseudomonas aeruginosa* (NCIMB 10421), *Escherichia coli* (NCTC 10418), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Enterococcus hirae* (NCIMB 8192)) en 5 minutos a 20°C bajo condiciones sucias contra todos los organismos de referencia detallados.

Sin desear estar ligado a ninguna teoría, se cree que la combinación de Acticide BAC50M, Acticide DDQ 50, Acticide PHB 20, Acticide L y Acticide PCMC, de acuerdo con las composiciones de la presente invención, proporciona un efecto sinérgico al proporcionar un efecto desinfectante. El efecto sinérgico se evidencia al menos por la combinación de estos cinco componentes que proporcionan una actividad bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa* (NCIMB 10421), *Escherichia coli* (NCTC 10418), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Enterococcus hirae* (NCIMB 8192) bajo una prueba EN 1276; mientras bajo las mismas condiciones cada componente individual no pasa la prueba EN 1276.

Se realizaron pruebas comparativas adicionales por D. C. Watson en Abbott Analytical, en New Ferry, Reino Unido, bajo un acuerdo de confidencialidad. Estas pruebas se realizaron bajo el mismo estándar europeo.

La composición A pasa los requisitos de EN 13727:2012+A1:2013 para actividad bactericida (*Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 13359)) en 5 minutos a 20°C bajo condiciones sucias.

Como una comparación adicional, diferentes soluciones de mezclas de tres (Tabla 2S) o cuatro o cinco (Tabla 2B) de: Acticide BAC50M (cloruro de benzalconio: referido como B en las tablas 2A y 2B), Acticide DDQ 50 (cloruro de didecildimetilamonio: referido como A (esto es componente A más que composición A anterior) en las tablas 2A y 2B), Acticide PHB 20 (clorhidrato de polihexametileno biguanida: referido como E en las tablas 2A y 2B), Acticide L (Bronopol: referido como C en las tablas 2A y 2B), y Acticide PCMC (p-cloro-m-cresol: referido como D en las tablas 2A y 2B); se probaron todos bajo las mismas condiciones. En estas pruebas, estuvieron presentes las mismas cantidades relativas de etanol, glicol de etileno y agua, como en la composición A. Los resultados de la Tabla 2ª se obtuvieron usando una dilución de 1:20 v/v de la composición "neta". Los resultados de la Tabla 2B se obtuvieron usando una dilución de 1:60 v/v de las composiciones "netas".

Tabla 2A: efecto de mezclas bajo EN 13727:2012+A1:2013 contra *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 13359)

Mezcla	Reducciones log contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ABC	4,04
BCD	3,96
CDE	<3,86
DEA	4,47
ACE	4,50
BDA	3,97

Tabla 2B: efecto de mezclas bajo EN 13727:2012+A1:2013 contra *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 13359)

Mezcla	Reducciones log contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EABC	4,32
ABCD	3,98
CDEB	<3,88
ACED	4,24
ABDE	4,61
ABCDE	>5,24

Las tablas 2A y 2B muestra que la combinación de Acticide BAC50M (cloruro de benzalconio: referido como B en las tablas 2A y 2B), Acticide DDQ 50 (cloruro de didecildimetilamonio: referido como A (esto es componente A más que composición A anterior) en las tablas 2A y 2B), Acticide PHB 20 (clorhidrato de polihexametileno biguanida: referido como E en las tablas 2A y 2B), Acticide L (Bronopol: referido como C en las tablas 2A y 2B), y Acticide PCMC (p-cloro-m-cresol: referido como D en las tablas 2A y 2B) proporcionan una mayor reducción log contra *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 13359) que cualquier otro componente solo y cualquier combinación posible de tres o cuatro de los componentes. Como se muestra en la Tabla 2B, las mayores diluciones también proporcionan un efecto desinfectantes. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, se cree que la combinación de Acticide BAC50M, Acticide DDQ 50, Acticide PHB 20, Acticide L y Acticide PCMC, de acuerdo con composiciones de la presente invención, proporciona un efecto sinérgico al proporcionar una acción desinfectante.

Pruebas de desinfección de agua

5 La Doctora Susanna Sherwin y el Profesor Bill Keevel, bajo un contrato de confidencialidad, en la Unidad de Salud Ambiental en la Universidad de Southampton, Reino Unido, realizaron pruebas sobre la eficacia de la composición A como tratamiento de agua. Sus métodos y resultados se exponen más abajo, con referencia a las figuras.

1. *Inactivación de Cryptosporidium parvum*

10 Las pruebas ayudaron a determinar la concentración de biocida SQ53 (composición A neta) necesaria para inactivar ooquistes de *Cryptosporidium parvum*. Esto se evaluó usando tinción Live/Deadq, que detecta si la membrana de los ooquistes se ha dañado lo suficiente como para que el tinte “muerto” entre en la célula.

15 Se usó un rango de diluciones del biocida SQ53 neto. Se detallan en la Tabla 3 más abajo, junto con las partes por millón de ingredientes activos para cada dilución. Las concentraciones conocidas como 1:19 v/v y 1:15 v/v se nombran en esta evaluación de tratamiento de agua como diluciones 5% y 6,25%, respectivamente.

Tabla 3 Concentración de biocida SQ53 usado en el estudio, junto con sus niveles equivalentes de ppm

Diluciones de SQ53 concentrado usado en estudios (%)	Partes reales por millón (ppm) de diluciones
10,00	16.140,00
6,25	10.087,50
5,00	8.070,00
2,00	3.228,00
1,00	1.614,00
0,50	807,00
0,20	322,80
0,10	161,40

A. Incubación de *C. parvum* con biocida y posterior tinción live/dead de ooquistes

35 Los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* se recibieron en una muestra de 1 ml con un total de 1 x 10⁷ ooquistes. Cada réplica usada en este estudio consistió en una alícuota de 10 µl de estas existencias, que contenían una media de 1 x 10⁵ ooquistes. Cada concentración de biocida examinado tuvo tres réplicas por punto de tiempo examinado.

40 Cada alícuota de ooquistes se incubó durante 24 horas en un volumen final de 100 µl que contenían uno de un rango de concentraciones de biocida SQ53 (Tabla 3). 1 hora antes del punto de tiempo, los controles se sometieron a 1 ml de HBSS acidificado (solución de sales equilibradas de Hanks (pH 2,75)) con el fin de permitir que el tinte DAPI penetrara en la membrana celular. Las incubaciones con el biocida ocurrieron a 37°C, a oscuras.

45 En cada punto en el tiempo, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm en una micro-centrifugadora durante 95 segundos, el sobrenadante (que contenía el biocida) se retiró cuidadosamente, y el gránulo se volvió a suspender (con vórtice) en HBSS neutral (pH 7) y se lavó repitiendo este proceso tres veces. Después de la etapa final de centrifugación, 100 µl de sobrenadante HBSS se dejó con los ooquistes en gránulos, y 10 µl de DAPI y 10 µl de PI se añadieron a las muestras. Los ooquistes se volvieron a suspender con vórtices, y se incubaron con los tintes Live/Dead durante 2 horas a 37°C a oscuras.

50 Después de la incubación con los tintes live/dead, los ooquistes volvieron a lavarse 2 veces mediante centrifugación y re-suspensión en HBSS neutral. Después de la etapa final de centrifugación, se dejaron 10-20 µl de sobrenadante en la muestra, y los ooquistes se volvieron a suspender con vórtices, y el volumen total se colocó en un portaobjetos de vidrio y se dejó secar. Una vez que la muestra se secó, se usó aceite de inmersión para colocar una cubierta, y se analizaron los portaobjetos con microscopio durante las 48 horas desde la preparación de la muestra.

B. Microscopia y análisis de ooquistes de *C. parvum*

60 Los ooquistes de *C. parvum* se analizaron para la presencia de PI de tinte “muerto” y el tinte opuesto DAPI. Cada muestra se examinó bajo microscopia de epifluorescencia con inmersión de aceite, y se tomaron fotografías de todos los ooquistes posibles, para permitir un conteo de >100 ooquistes por réplica donde fue posible. Si el número de ooquistes era bajo, se tomaron fotografías de todos los ooquistes visualizados. Después se contaron los números células muertas y vivas, y se calculó el porcentaje de ooquistes vivos para cada muestra de réplica. Después se calculó el porcentaje de supervivencia media en todas las réplicas.

La Figura 4 muestra la supervivencia porcentual de ooquistes de *C. parvum* después de 24 horas de incubación con un rango de concentraciones de biocida SQ53 (barras grises). El total de ooquistes contabilizados para generar la supervivencia porcentual para cada barra se muestran con la línea gris oscura. Se muestran las barras de error estándar.

5

C. Incubación de 24 h con biocida

Los niveles de *C. parvum* "vivo" recuperados de las muestras después de la incubación con biocida SQ53 durante 24 h se muestran en la Figura 4. Las concentraciones más bajas de biocida (0,01-0,02% SQ53) mostraron un máximo de reducción de solamente 16% de ooquistes visibles después de 24 horas, mientras que la concentraciones de biocida que fueron 0,5% del concentrado o mayores mostraron una reducción de 80-90% de ooquistes viables, con la mayor concentración de biocida mostrando una reducción de 97% de ooquistes viables. Los niveles de recuperación de ooquistes fueron altos en este estudio y no mostraron correlación con el nivel de supervivencia de ooquistes en las muestras, lo que significa que los resultados pueden tratarse con alta confianza.

15

Como se ha mencionado anteriormente, la contaminación de aguas de piscinas y aguas recreativas con el organismo *C. parvum* es un serio problema en todo el mundo, por ejemplo en el Reino Unido. Una vez que las aguas se contaminan, es fácil que el organismo se transmita a humanas y la infección puede darse con tan sólo 132 ooquistes (DuPont et al. (1995), La infectividad de *Cryptosporidium parvum* en voluntarios sanos, 332(13): 855-859). El tratamiento actual de estas agua con cloro es inefectivo para eliminar este organismo, ya que previos estudios han demostrado que el tratamiento con 4ppm de cloro a pH 7 durante 25 horas dio como resultado ningún descenso en viabilidad celular como se ve en el ensayo DAPI/PI, y solamente una reducción de 40% en viabilidad celular cuando se usó el ensayo de exquistación (Widmer, (2002), Mecanismos moleculares de inactivación química de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*, Fundación de investigación AWWA).

20

En contraste con esto, estas pruebas muestran que el biocida SQ53 (composición A neta) puede dar como resultado 80-90% de reducción en viabilidad celular, cuando se usan concentraciones de 0,5% y superiores. Si se usan concentraciones de 10%, puede verse una reducción de 97% (Figura 5). Esto es un tratamiento mucho más eficiente que el cloro de 4 ppm.

25

2. Inactivación de *Klebsiella pneumoniae*

La Doctora Susanna Sherwin y el Profesor Bill Keevel, bajo un contrato de confidencialidad, en la Unidad de Salud Ambiental en la Universidad de Southampton, Reino Unido, también probaron la acción de SQ53 (composición A) contra la bacteria altamente resistente a antibióticos *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 (Nueva Delhi metallo-β-lactamasa). Se usaron las mismas concentraciones que las mostradas en la Tabla 3, más arriba.

30

Klebsiella pneumoniae creció a 22°C durante la noche en caldo LB, con 150 rpm agitación orbital, a una densidad óptica (DO₆₂₀) de 0,6. Biocida SQ53 (composición A) se diluyó en agua estéril, y se calcularon las existencias de trabajo para que 20 µl de cada existencia de trabajo pueda añadirse a 180 µl de cultivo para crear las concentraciones finales mostradas en la Tabla 3, más abajo. Cda pocillo de control recibió 20 µl de agua estéril en lugar de biocida. Después de la adición de cultivo, la palca se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas, y se tomaron muestras para colocar en placas a las 0 horas, 2 horas y 4 horas. Las muestras se neutralizaron con caldo neutralizador, diluyeron en LB y se colocaron en placas de agar LB. Las placas se incubaron a 37°C durante la noche antes de contar las células viables (UFC).

35

A las 2 horas de exposición a biocida, una dilución de 1/100 del cultivo tratado se incubó a oscuras con 50 µl de tinte live/dead durante 30 minutos. 100 µl de esta muestra se filtró en un filtro de policarbonato negro con tamaño de poro de 0,2 µm y los conteos totales de células vivas y muertas se registraron con contraste de interferencia diferencial episcópico/epifluorescencia (CIDE/EF). Cada filtro se representó en imágenes en 10 campos de visión arbitrario, y las medias de estos se usaron para calcular los conteos totales de células por ml de muestra filtrada.

40

Cálculo de número de campos de visión por filtro:

45

Un campo de visión	= 11623,58 µm ²
Diámetro de membrana filtro	= 21000,00 µm
Área de membrana filtro (π r ²)	= 346360590,10 µm ²
Números de campos de visión por filtro	= 346360590,10 / 11623,58
	= 23963,702 campos de visión

50

Por lo tanto, el conteo global medio de total de células por campo de visión se multiplicó por este factor para conseguir el conteo de célula total por filtro, y así se pudo calcular el conteo de célula total por una muestra de 1 ml de cultivo original.

55

El tratamiento de la bacteria *K. pneumoniae* con concentraciones de SQ53 de 2% o mayores dio como resultado una reducción 8-log de unidades formadoras de colonias (UFC), sin detectarse ninguna bacteria cultivable tanteeo a las 2 como a las 4 horas (Figura 5 y Tabla 4). En cambio, cuando se usaron concentraciones más bajas de biocida, la capacidad para cultivar bacterias fue más variable, con reducciones de entre 4 a 5-log y 3 a 7-log de bacterias (a las 2 horas y 4 horas respectivamente), que fueron proporcionales a la concentración de biocida que se probó.

Figura 5: Capacidad para cultivar *K. pneumoniae* después de tratamiento con varias concentraciones de biocida SQ53. *K. pneumoniae* se trató con SQ52 durante 2 y 4 horas. Cada estudio examinó la eficacia de concentraciones de biocida entre 0,1-10%. Las unidades formadoras de colonias (UFC ml⁻¹) se calcularon después de crecimiento durante la noche a 37°C.

Tabla 4: Reducciones log en *Klebsiella pneumoniae* después de incubación con 0,1-10% biocida SQ53

Concentración de biocida (%)	Ensayo de placa agar 2H	Ensayo de placa agar 4H
10,00	3,08E+08	3,08E+08
6,25	3,08E+08	3,08E+08
5,00	3,08E+08	3,08E+08
2,00	3,08E+08	3,08E+08
1,00	3,08E+08	2,80E+07
0,50	3,51E+05	3,08E+08
0,20	1,29E+05	6,14E+04
0,10	3,84E+04	3,08E+03
0,00	1,00E+00	1,00E+00

Para la bacteria *K. pneumoniae*, las pruebas estándares de capacidad para cultivo demostraron que la incubación con el biocida SQ53 dio como resultado una reducción de 4 a 5-log de la bacteria en concentraciones de biocida de 1% o menores a las 2 horas, y una reducción de 3 a 7-log de la bacteria en concentraciones de biocida de 1% o menores a las 4 horas. En concentraciones de biocida de 2% y mayores, se vio una reducción de bacteria de 8-log, sin detectarse células cultivables (Figura 5 y Tabla 4). Esto significa que en concentraciones de 2% y mayores, el biocida SQ53 inactiva 8-log de organismos de *K. pneumoniae*.

3. Características deseable de un tratamiento de agua

La Tabla 5 analiza, cualitativamente, las propiedades deseables de biocidas para tratamiento de agua. La Tabla 5 es un extracto modificado del libro "Directorio de microbicidas para la protección de materiales", editado por Wilfred Paulus, Kluwer Academic Publishers, 2004, Sección 5.3, Unhoch et al. "Biocidas para tratamiento de agua recreativa". Este extracto establece que las "características requeridas" en la columna a mano derecha de la Tabla 5 son características deseable de los biocidas para tratamiento de agua, por ejemplo para su uso en la desinfección de sistemas de agua recreativa.

La Tabla 5 muestra que la composición A (referida como SQ53 en la Tabla 5) satisface las características deseadas de un biocida desinfectante de agua. El uso de la composición A en desinfección de agua proporciona una combinación de características que no se ven en otras técnicas de desinfección de agua.

Estabilidad

La composición A ha resultado ser estable, esto es, no pierde nada de su actividad al limpiar superficies, durante hasta 12 meses después de la preparación inicial de la composición.

Como puede verse a partir de los resultados anteriores, está claro que un producto de acuerdo con la presente invención es capaz de actuar como un líquido limpiador que tiene propiedades beneficiosas.

Cuando se usan en esta especificación y reivindicaciones, los términos "comprende(n)" y "que comprende(n)" y variaciones de los mismos significan que las características, etapas y números especificados están incluidos. Los términos no deben interpretarse como excluyentes de la presencia de otras características, etapas o componentes.

REIVINDICACIONES

1. Un líquido limpiador para inhibir patógenos, comprendiendo el líquido limpiador:
- 5 cloruro de benzalconio,
 cloruro de didecildimetilamonio,
 clorhidrato de polihexametileno biguanida,
 Bronopol, y
 p-cloro-m-cresol.
- 10 2. Un líquido limpiador de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende un glicol de alquileo, tal como glicol de etileno, glicol de propileno, glicol de dietileno, copolímeros en bloque de etilenoóxido y propilenoóxido, y otros glicoles de alquileo formados combinando óxido de alquileo y/o cualquier combinación de glicoles de alquileo.
- 15 3. Un líquido limpiador de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde el líquido limpiador no incluye uno o más siloxanos.
4. Un líquido limpiador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el líquido limpiador comprende 0,5-2,5% de peso de glicol de alquileo.
- 20 5. Un líquido limpiador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el líquido limpiador comprende 0,01-0,1% de peso de p-cloro-m-cresol.
6. Un líquido limpiador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el líquido limpiador comprende, en% de peso:
- 25 0,5-10 cloruro de benzalconio,
 0,5-10 cloruro de didecildimetilamonio,
 05-10 clorhidrato de polihexametileno biguanida,
 0,3-5 bronopol, y
 0,01-0,1 p-cloro-m-cresol.
- 30 7. Un líquido limpiador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el líquido limpiador comprende o consiste en:
- 35 cloruro de benzalconio;
 cloruro de didecildimetilamonio;
 clorhidrato de polihexametileno biguanida;
 bronopol;
 p-cloro-m-cresol;
 etanol; y,
 glicol de etileno.
- 40 8. Una mezcla acuosa que comprende: agua y un líquido limpiador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 45 9. La mezcla acuosa de la reivindicación 8, donde el agua es agua del grifo, agua potable, agua destilada, agua sucia, agua que contiene tierra, agua que contiene efluente, agua que contiene patógenos, agua que contiene desechos, aguas residuales y/o agua salobre.
- 50 10. La mezcla acuosa de una de las reivindicaciones 8 o 9, donde la composición tiene una proporción de agua por volumen con líquido limpiador de desde 99% agua con 1% líquido limpiador a 1% agua con 99% líquido limpiador, o cualquier valor intermedio.
- 55 11. El método para limpiar una superficie, que comprende:
- proporcionar un líquido limpiador o una mezcla acuosa de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores; y,
 aplicar la mezcla a una superficie.
- 60 12. Un método para desinfectar agua, que comprende:
- proporcionar un líquido limpiador o una mezcla acuosa de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores; y
 poner en contacto el líquido limpiador o mezcla acuosa con agua para desinfectar.
- 65 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde el líquido limpiador o mezcla acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 se usa como un complemento, o además del tratamiento de agua con cloro.

14. Una toallita para su aplicación en la piel, comprendiendo la toallita un líquido limpiador o una mezcla acuosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

15. Un líquido limpiador o una mezcla acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en la desinfección de un área de la piel.

5

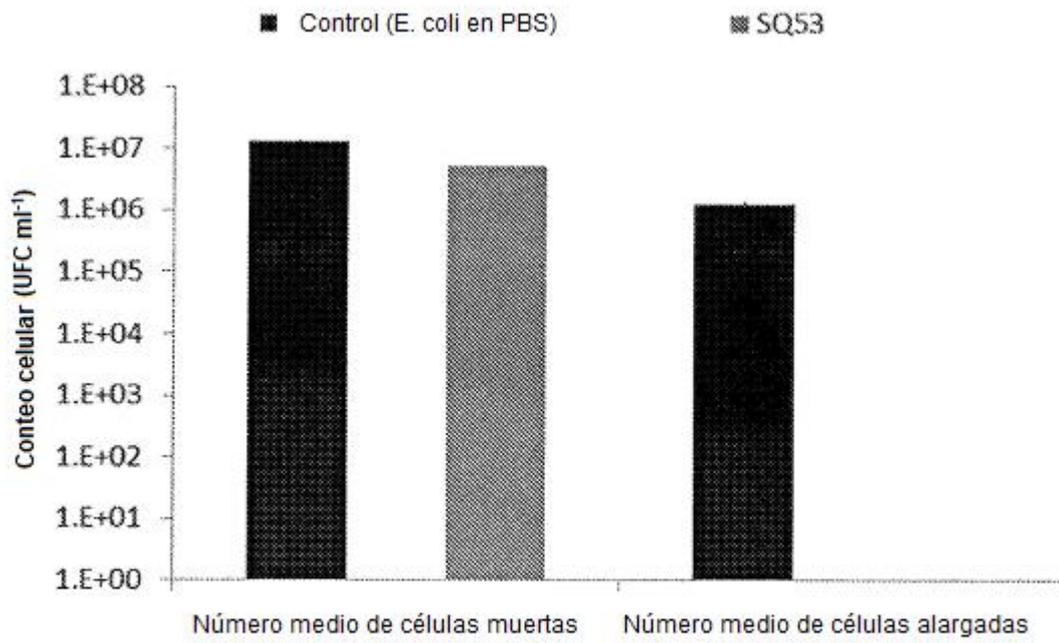


Figura 3

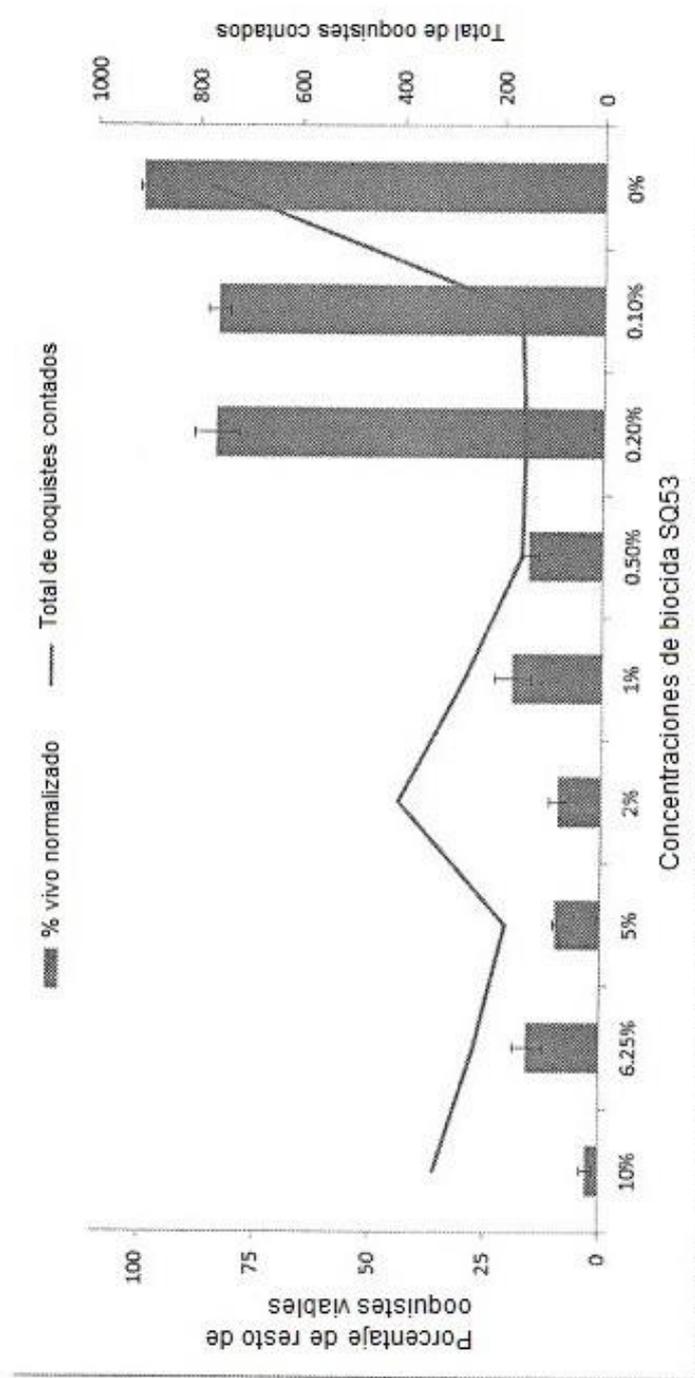


Figura 4

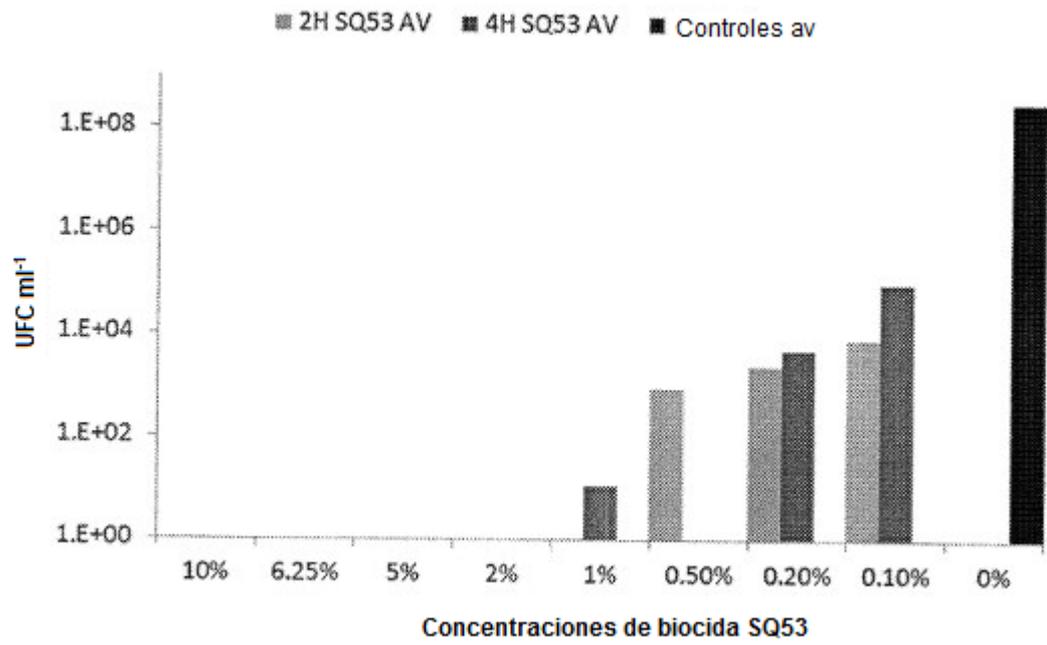


Figura 5

Tabla 5

Características requeridas	Sales de cobre	Plata coloidal	Cloro	Bromo	Polihexametileno biguanida	Ozono	UV	SQ 53
Efectivo contra patógenos y microorganismos molestos	Parcial	Parcial	Sí	Sí	Parcial	Sí	Sí	Sí
Orden bajo de toxicidad o preferentemente no tóxico para humanos, animales y vida de plantas	Parcial	Parcial	Sí	Parcial	Sí	Si controlado	Sí	Sí
Seguro de manipular	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
No se degrada o reacciona con otras sustancias químicas de la piscina o balneario para formar desinfección nociva por productos	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Vida útil adecuada a temperaturas de almacén durante un mínimo de 1 año	Sí	Sí	No	No	Sí	N/A	N/A	Sí
Eficaz en presencia de y estable a impurezas orgánicas de bañistas y medio, alta y baja temperatura del agua, variaciones del pH, diferentes calidades de agua y luz solar	No	No	No	No	Sí	Sí	No	Sí
No debería impartir color, olor o sabor al agua	Sí	Sí	No	No	Sí	No	Sí	Sí
Capaz de controlarse con un kit de prueba simple de punto de uso	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí
No debería decolorar/dañar las superficie e instalaciones de las superficies de la piscina o balneario	No	No	No	No	Sí	No	Sí	Sí
Actuación de floculación	No	No	No	No	No	No	No	Sí
Biopelícula	No	No	Parcial	Parcial	Parcial	Parcial	No	Sí