

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 700**

51 Int. Cl.:

<b>A01N 25/10</b>	(2006.01)
<b>A01N 25/34</b>	(2006.01)
<b>A01N 59/00</b>	(2006.01)
<b>A01N 59/06</b>	(2006.01)
<b>C09D 5/14</b>	(2006.01)
<b>C09D 139/06</b>	(2006.01)
<b>C09D 7/80</b>	(2008.01)
<b>A61L 2/00</b>	(2006.01)
<b>A62D 5/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2014 PCT/US2014/017135**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14149321**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2014 E 14768598 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2967031**

54 Título: **Método para preparar un recubrimiento de superficie reactivo que tiene propiedades de descontaminación química y biocida**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201313836364**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.11.2019**

73 Titular/es:

**AMERICAN STERILIZER COMPANY (100.0%)  
5960 Heisley Road  
Mentor, OH 44060, US**

72 Inventor/es:

**KAISER, HERBERT J.;  
SHAVER, MIRANDA C. y  
GIDDENS, TIMOTHY LEE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 730 700 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**

Método para preparar un recubrimiento de superficie reactivo que tiene propiedades de descontaminación química y biocida.

5 Esta invención se refiere a un método para proporcionar una composición de recubrimiento reactivo para superficies y artículos, que tiene la capacidad de reducir o eliminar la contaminación microbiana y/o neutralizar los agentes químicos. El recubrimiento reactivo comprende un polímero y un activo. Excepcionalmente, la composición reactiva puede renovarse o recargarse mediante una nueva aplicación del agente activo.

10 Las Fuerzas Armadas de los EE. UU. tienen la necesidad de operar, sobrevivir y mantener las operaciones de manera segura en entornos con peligros químicos y biológicos. La proliferación continua de armas químicas y biológicas crea la necesidad de garantizar que las Fuerzas de los Estados Unidos puedan completar misiones con éxito en entornos que podrían contaminarse con agentes químicos y biológicos. Se necesitan tecnologías para apoyar al soldado en todo el espectro de posibles conflictos y exposiciones a contaminantes. Además, otros entornos, particularmente en las instalaciones de salud, tienen la necesidad de operar y mantener las operaciones en áreas que están expuestas a confrontaciones de contaminantes químicos y biológicos a diario.

15 Los métodos actuales de descontaminación/limpieza para contaminantes biológicos y químicos son laboriosos y dependen en gran medida del cuidado y la atención al detalle del personal de limpieza. Tradicionalmente, estos métodos requieren el uso de productos químicos peligrosos y, en general, no proporcionan una protección duradera o continua. Una vez que una superficie se ha limpiado manualmente, los nuevos contaminantes en la superficie pueden representar una amenaza para la salud y la seguridad de quienes entran en contacto con ella hasta el  
20 siguiente procedimiento de limpieza manual.

En aplicaciones militares en particular, la descontaminación operativa requiere que un objeto o dispositivo pueda volver al servicio lo más rápido posible; la descontaminación completa permite que un objeto o dispositivo sea manejado por cualquier usuario sin equipo de protección personal. Tanto la descontaminación operativa como la completa son ventajas que pueden lograrse con las composiciones de recubrimiento reactivas de la invención.

25 Los recubrimientos reactivos han estado en desarrollo durante varios años con cierto éxito limitado. Se han demostrado recubrimientos reactivos con la capacidad de descontaminar áreas o artículos más pequeños y/o cantidades más pequeñas de agentes químicos y biológicos. Tradicionalmente, debido a los límites en la cantidad de "reactividad" que puede aplicarse a una superficie o incorporarse a un artículo, es improbable que los recubrimientos reactivos por sí solos tengan la capacidad de efectuar una descontaminación operativa o completa de áreas de  
30 superficie más grandes altamente contaminadas con agentes químicos o biológicos de guerra.

Un recubrimiento reactivo con la capacidad de reducir, eliminar o neutralizar la contaminación entre limpiezas brinda beneficios significativos. La mayoría de las tecnologías de recubrimiento reactivo disponibles en la actualidad se consideran "permanentes" en el sentido de que cuando se integran en un material de tela o sustrato o se aplican a una superficie, permanecen continuamente reactivas hasta que se ensucian con contaminantes. En ese momento, el material o la superficie generalmente debe limpiarse y descontaminarse a fondo, o removerse, eliminarse y  
35 reemplazarse.

Por el contrario, un recubrimiento renovable es un sistema de dos partes que consiste en una primera capa de base no reactiva que puede integrarse en un sustrato o aplicarse como un recubrimiento de superficie, y la segunda, una química de activación (líquida o gaseosa), o "activo", que hace que la capa de base sea "reactiva" a un contaminante  
40 en la superficie. La reactividad de un recubrimiento renovable se puede "recargar" o renovar mediante una nueva aplicación del agente activo después de la exposición a contaminantes químicos y biológicos. Idealmente, no habría necesidad de limpiar o descontaminar a fondo, remover, eliminar y reemplazar la capa de base de un recubrimiento renovable.

Los recubrimientos renovables, en particular, ofrecen una solución potencial a los problemas que suelen surgir con las tecnologías de superficies reactivas tradicionales. Ellos incluyen: ensuciamiento por contaminantes ambientales, capacidad reactiva limitada en la superficie y rápido deterioro de la superficie por condiciones ambientales o  
45 exposición continua a contaminantes.

En general, los químicos utilizados contra especies biológicas y contaminantes químicos se clasifican como "activos" e incluyen, sin limitación, halógenos, oxidantes, fenoles, sales de amonio cuaternario, metales pesados y aldehídos. Cuando los niveles más altos de activos están presentes y disponibles en la superficie, la eficacia de la descontaminación mejorará. Comercialmente, se han agregado activos a las superficies para intentar crear materiales reactivos y de liberación prolongada. Dos ejemplos disponibles actualmente son HALOSHIELD, un sistema a base de cloro de liberación lenta para la fabricación de textiles antimicrobianos, y TRIOSYN, un recubrimiento de trióxido de amonio cuaternario. Los textiles tratados con HALOSHIELD se basan en el reemplazo  
55 del cloro de la lejía cuando se lavan.

Los intentos por crear recubrimientos antimicrobianos para superficies y artículos se describen en la bibliografía y han tenido cierto éxito limitado. La patente U.S. N° 7.306.777 se refiere a un copolímero de polietileno/alcohol

polivinílico que comprende composiciones antimicrobianas a base de metal dentro del polímero para su aplicación a una variedad de sustratos. El copolímero no se declara renovable.

5 La patente U.S. Nº 7.449.194 se refiere a un artículo "que cubre un cuerpo" (como un delantal, bata o guante) que está hecho de un material antimicrobiano. El material antimicrobiano comprende un polímero, tales como poliolefinas, PVC, látex, nitrilo, mylar, poliuretano y neopreno; un plastificante y un activo capaz de generar y liberar al menos un gas al exponerse a la luz y/o la humedad. El gas es antimicrobiano y retardará, controlará, eliminará o evitará la contaminación microbiológica de la piel u otra superficie en contacto con el artículo. La composición "generadora de gas" incluye peróxido de hidrógeno (0,5-20% en peso), dióxido de cloro, dióxido de azufre, dióxido de carbono y óxido nitroso. El artículo no es renovable o recargable con agente activo.

10 La publicación de patente U.S. Nº 2008/0138373 se refiere a un artículo protector o de limpieza que tiene una superficie exterior de al menos un recubrimiento o capa parcial de un compuesto de peróxido estabilizado y un tratamiento para artículos protectores y artículos de limpieza, tales como pañuelos y guantes. El peróxido de hidrógeno y otras sales de peróxido se clasifican como antimicrobianos oxidantes que se consideran viricidas y bactericidas. Los copolímeros de vinilpirrolidona se mencionan como agentes estabilizantes de peróxido de hidrógeno; sin embargo, los homopolímeros de vinilpirrolidona no son aceptables porque crean películas rígidas. Los copolímeros de vinilpirrolidona preferibles son aquellos que no forman películas o solo forman películas blandas. El tratamiento no se describe como renovable.

20 La publicación de patente U.S. Nº 2008/00260026 describe un recubrimiento "removible" que comprende un polímero soluble en agua (que se secará para formar una película) y al menos un agente antimicrobiano. La composición se describe como biocida y/o biostática. Se describen alcoholes polivinílicos solos o copolimerizados con olefinas. El peróxido y los peroxiácidos se describen como agentes activos, entre muchos otros agentes activos descritos. El recubrimiento no está declarado como renovable y puede o no ser biocida.

25 La publicación de patente U. S. 2009/0155451 describe un sistema de recubrimiento antimicrobiano, que comprende una composición que forma una película y un agente antimicrobiano. La composición formadora de película comprende un polímero e incluye una cantidad eficaz de un agente antimicrobiano disperso dentro del polímero. El polímero puede ser un polímero de acrílico, uretano o PVA; el agente activo se selecciona entre monoésteres de ácidos grasos, monoésteres de ácidos grasos, un compuesto que contiene iones de metales de transición, un compuesto de amonio cuaternario, una biguanida o combinaciones de los mismos. Los peróxidos se identifican solo como componentes opcionales de acción rápida que no proporcionan actividad durante largos períodos de tiempo, en comparación con el agente antimicrobiano. El recubrimiento no es renovable.

35 La publicación de patente U.S. Nº 2009/0275906 describe un artículo absorbente con una capa de película delgada que incluye un agente activo. El peróxido es uno de los "agentes activos" descritos. La película delgada es polimérica y se coloca en capas sobre el artículo utilizando la deposición de LBL. PVP comprende una de las "capas", es decir, la segunda capa "neutra" que es un aceptor de enlace de hidrógeno. La "primera" capa incluye otros polímeros que son donantes de enlaces de hidrógeno. Las reivindicaciones se refieren al artículo absorbente, no a la película. No se menciona que el artículo absorbente pueda ser renovado o recargado con agente activo.

40 La publicación de patente U.S. Nº 2010/0009011 se refiere a una composición a base de poliuretano que contiene polímeros reticulados de monómeros N-vinílicos heterocíclicos (incluyendo PVP, 0,1-100% en peso). La composición se utiliza para hacer esponjas u otros objetos que liberan desinfectantes a lo largo del tiempo. El peróxido de hidrógeno (3-70% en peso) es uno de los desinfectantes potenciales. La publicación se refiere a artículos a base de espuma y no a recubrimientos. La actividad desinfectante no es renovable.

45 El documento WO 2006/135620 se refiere a un complejo de PVP/peróxido de hidrógeno usado para formar un gel que se usa para desodorizar el aire y las superficies. El agente activo también podría ser un compuesto de peroxohidrato. El complejo se basa en la liberación de gas para desodorizar el aire y las superficies. Puede usarse como solución, sólido, gel o contenido dentro de un dispositivo.

Los documentos WO 91/07184, WO 2006/076344, US 5.008.106 y US 5.130.124 se refieren a formulaciones estabilizadas de peróxido de hidrógeno y PVP que pueden formar película y tener propiedades biocidas. Ninguno de estos documentos menciona que las películas pueden ser renovadas o recargadas con agente activo.

50 El documento WO 2004/075944 describe un recubrimiento de superficie de PVP que comprende peróxido de hidrógeno después de la exposición a peróxido de hidrógeno que comprende un medio acuoso. Los niveles de peróxido de hidrógeno en la superficie disminuyen rápidamente con el almacenamiento.

55 De manera similar, el documento US 3.480.557 describe películas de PVP transparentes y un método para preparar películas de PVP, que están cargadas con peróxido de hidrógeno. No se describe la recarga o renovación de las películas. La bibliografía muestra que, si bien ha habido mucha actividad en el desarrollo de textiles antimicrobianos, esponjas absorbentes, tejidos y otros artículos, no se ha desarrollado ninguna tecnología de superficie reactiva actual que haya demostrado su eficacia suficiente para descontaminar las confrontaciones químicas o biológicas internas o externas en una escala mayor o estándar, en particular los que se encuentran con agentes químicos y biológicos de guerra. No se dispone de tecnologías actuales para uso militar de campo como recubrimiento reactivo.

La mayor parte de la actividad ha rodeado el desarrollo de superficies y artículos reactivos descartables que deben limpiarse y descontaminarse completamente, o removerse, eliminarse y reemplazarse después de la contaminación. No se ha demostrado que las tecnologías actuales sean renovables con una simple reaplicación de los agentes activos.

5 Se ha invertido un gran esfuerzo en la creación de superficies reactivas para uso comercial y militar en gran escala con un progreso limitado. La mayoría de las tecnologías en desarrollo se enfrentan a una variedad de confrontaciones de rendimiento, pero lo más notable es lo siguiente:

10 • Capacidad limitada: se ha demostrado que muchas tecnologías son biostáticas (solo previenen el crecimiento) en condiciones ideales. Muchos sistemas actuales requieren una cantidad de tiempo (días) prolongada antes de poder lidiar completamente con un nivel realista de contaminación. Idealmente, una superficie reactiva proporcionaría un nivel muy alto de actividad contra bacterias, virus y hongos, e incluso sería difícil matar las esporas. Además, el sistema ideal también reduciría las amenazas de los agentes químicos de guerra u otros productos químicos tóxicos.

15 • Las tecnologías biostáticas de contaminación cruzada solo protegen la superficie a la que se aplican. Este enfoque deja el contaminante disponible para transferir a cualquier superficie o entidad que entre en contacto. El sistema ideal inactivaría el contaminante biológico o químico asegurando una superficie segura entre la limpieza.

20 • El ensuciamiento de un problema bien conocido para recubrimientos reactivos es el ensuciamiento de la superficie ya sea por las condiciones ambientales o por el residuo del contaminante que se ha neutralizado. Los agentes activos disponibles en una superficie limpia pueden cubrirse fácilmente con capas de suciedad/polvos simples o pueden quedar cubiertos con residuos de productos biológicos o químicos descontaminados. Un sistema ideal sería resistente a una reducción en el rendimiento resultante de estas cargas orgánicas.

• Aplicaciones prácticas y de uso múltiple, muchas de las tecnologías actuales están diseñadas para aplicaciones específicas en condiciones ideales y, por lo tanto, tienen una viabilidad limitada.

25 Por lo tanto, existe la necesidad de una tecnología de superficie reactiva que brinde actividad biocida y descontaminación química incluso frente a la acumulación de carga orgánica, que sea eficaz contra una amplia variedad de contaminantes y que pueda aplicarse a una amplia variedad de superficies en ambientes interiores y exteriores tradicionales. No existe un consenso actual sobre los requisitos de rendimiento para recubrimientos de superficie reactivos. Un sistema ideal sería aplicable a mercados comerciales (incluidos médicos) y militares, seguros de usar y manipular, eficaces contra una amplia variedad de contaminantes, aplicables y fácilmente integrados en una amplia variedad de superficies porosas y no porosas, eficaces bajo acumulación de carga orgánica, y renovable o recargable por reaplicación del agente activo. Además, un sistema útil sería estable y tendría una vida útil más prolongada y sería flexible en su aplicación, dando al usuario la opción de activar la película de varias formas utilizando diferentes formas del agente activo.

35 Se ha desarrollado una nueva tecnología que comprende una superficie reactiva diseñada para trabajar en conjunto con los sistemas y procesos de descontaminación actuales para lograr una mayor eficacia, o como un producto independiente para tratar los niveles de agente residuales o bajos. Esta tecnología satisface sorprendentemente la necesidad de la rápida restauración de equipos, vehículos, interiores de edificios y refugios, y funciones de apoyo esenciales, como instalaciones militares de campo, hospitales, instalaciones de fabricación y otras instalaciones expuestas a confrontaciones químicas y biológicas.

40 Una ventaja clave de esta tecnología se alinea con ciertos requisitos militares para mantener las operaciones de combate a través de 1) la capacidad de devolver rápidamente las fuerzas a la plena efectividad operativa; 2) restaurar equipos y vehículos a un estado utilizable rápidamente; y 3) reducir la carga logística de las operaciones de descontaminación.

45 Esta invención se refiere al suministro de una composición de recubrimiento de superficie reactiva que puede incorporarse en o sobre una superficie o material como parte del proceso de fabricación o aplicarse a un material existente en cualquier momento durante su vida útil. Las superficies a las que se puede aplicar esta composición de recubrimiento de superficie reactiva son ilimitadas. Esta composición de recubrimiento de superficie reactiva ha demostrado ser eficaz cuando se aplica tanto a superficies duras no porosas como a superficies porosas.

50 Las composiciones de superficie reactiva proporcionadas por los métodos de acuerdo con la invención comprenden principalmente un polímero higroscópico o una mezcla de polímeros (en lo sucesivo, el polímero) y un agente activo. La capacidad de modificar las propiedades físicas de las composiciones de superficie reactivas para adaptarlas para diversos fines es una ventaja inesperada y clara de la invención.

55 El polímero seleccionado para usar en las composiciones puede tener y preferiblemente tiene un efecto sinérgico con un agente activo, tal como peróxido de hidrógeno. Este efecto sinérgico se demuestra como un aumento en la actividad de descontaminación biocida o química que es mayor que el alcanzado con el polímero o el agente activo cuando se usa solo. Es importante destacar que, al mezclarse con el agente activo o exponerse al mismo, el polímero seleccionado no reduce ni limita la cantidad de agente activo disponible para la aplicación ni su eficacia. De acuerdo con los métodos y usos de la invención, el polímero comprende polivinilpirrolidona (PVP), y el agente activo

es peróxido de hidrógeno.

La divulgación proporciona una superficie reactiva que se puede recargar o activar a través de cualquier proceso que proporcione la adición del agente activo a la superficie, en forma de líquido, gas o vapor. La cantidad de agente activo aplicado se puede variar para lograr diferentes niveles de actividad superficial para adaptar la funcionalidad a la tarea deseada.

Es un objeto de la divulgación proporcionar una composición reactiva que comprende un polímero higroscópico y un agente activo, para su incorporación en artículos o aplicación a superficies duras, que proporciona actividad de descontaminación/neutralización biocida y química contra una gran variedad de contaminantes biológicos y químicos en un corto período de tiempo, incluidos los agentes biológicos y químicos de guerra.

Otro objeto de la divulgación es proporcionar una composición reactiva que tenga actividad residual y mantenga su actividad de descontaminación/neutralización química y biocida bajo carga orgánica y dilución.

Otro objeto de la divulgación es proporcionar una composición reactiva que se pueda recargar o renovar con un agente activo durante el uso, sin la necesidad de remover, eliminar y reemplazar la composición reactiva.

Otro objeto más de la divulgación es proporcionar una composición reactiva que sea segura de manejar y ambientalmente segura y que pueda aplicarse a superficies porosas y no porosas por igual.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

Se ha desarrollado un recubrimiento reactivo que tiene propiedades de neutralización/descontaminación biocidas y químicas que se mantienen, incluso bajo una carga orgánica. El recubrimiento proporcionado por los métodos de acuerdo con la invención es renovable o recargable al agregar cantidades adicionales del componente activo al recubrimiento después del uso o exposición prolongada a contaminantes ambientales, incluidos los agentes biológicos y químicos de guerra.

En una realización, la divulgación se refiere a una composición reactiva que comprende un polímero higroscópico y un material activo mezclado o incorporado al polímero. El agente activo puede mezclarse con el polímero en una solución y secarse hasta obtener una película, o el polímero puede aplicarse como una película y luego cargarse con el agente activo. La composición reactiva puede aplicarse a una superficie o incorporarse a un artículo durante la fabricación.

En una realización, la invención se refiere a un método para proporcionar un recubrimiento reactivo a una superficie que comprende las etapas de aplicar un polímero higroscópico a una superficie de un objeto, secar el polímero para formar una película y luego exponer la película a una carga de agente activo vaporizado. La exposición de la película se realiza con al menos aproximadamente 400 ppm de peróxido de hidrógeno vaporizado durante un tiempo de aproximadamente 30 minutos. El polímero comprende polivinilpirrolidona.

En otra realización, la invención se refiere a un método para proporcionar un recubrimiento reactivo a una superficie, en donde el agente activo se combina con un polímero en solución y la mezcla de polímero/agente activo se aplica a una superficie, seguido de secado en una película reactiva y recarga del recubrimiento exponiendo la superficie a cantidades adicionales de peróxido de hidrógeno.

Las propiedades biocidas y de descontaminación de los recubrimientos reactivos de la divulgación son renovables o recargables al exponer la superficie o el artículo a cantidades adicionales del agente activo. No es necesario retirar o descartar la superficie de recubrimiento reactivo original.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 refleja el porcentaje de oxidante alcanzado en la solución cuando una solución al 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mezcla con el 1% o el 10% de PVP que tiene varios pesos moleculares (10-1300 K).

FIG. 2 refleja la reducción logarítmica promedio en un estudio de eliminación temporal para la combinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PVP de la FIG. 1 utilizando ATCC 6538 de S. aureus.

FIG. 3 refleja el porcentaje de oxidante alcanzado en una película cuando el 10% y el 20% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mezclan con un 10% de PVP (10K, 58K, 360K y 1300K) y se dejan secar al aire hasta formar una película.

FIG. 4 refleja la reducción logarítmica promedio de los recubrimientos reactivos de la invención inoculados con ATCC 6538 de S. aureus.

FIG. 5 refleja la concentración de peróxido de hidrógeno (como % de oxidante) en películas de PVP reticuladas (de diversos pesos moleculares), en donde la película se activa usando peróxido de hidrógeno vaporoso (VHP) a 250 ppm de VHP durante noventa minutos en comparación con las películas de PVP sin exposición a VHP.

FIG. 6 refleja la inactivación (reducción logarítmica) a lo largo del tiempo de las células de ATCC 6538 de S. aureus

en contacto con las películas de PVP tratadas con VHP, las películas secas de PVP-HP (de la solución) y las películas de PVP (no activas).

FIG. 7 refleja reducciones logarítmicas de ATCC 6538 de *S. aureus* para películas de PVP de 58K expuestas a VHP.

5 FIG. 8 refleja la reducción logarítmica de las esporas de ATCC 19659 de *B. subtilis* para películas de PVP de 58K expuestas a VHP.

FIG. 9 refleja la concentración de peróxido de hidrógeno ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) de películas de PVP reticuladas y no reticuladas con o sin exposición a un ciclo de VHP de 400 ppm durante 30 minutos.

FIG. 10 refleja reducciones logarítmicas de ATCC 6538 de *S. aureus* en una película reticulada de PVP de 1300K expuesta a VHP.

10 FIG. 11 refleja la inactivación (reducción logarítmica) de varias cargas de esporas de ATCC 19659 de *B. subtilis* por contacto con películas reticuladas de PVP de 1300K expuestas y no expuestas a VHP.

FIG. 12 refleja la inactivación (reducción logarítmica) de las esporas de *B. anthracis* (cepa Ames) por contacto con PVP de 1300K reticulado y expuesto a VHP, utilizando una película de PVP no expuesta como control.

15 FIG. 13 refleja los niveles de oxidante medidos ( $\text{mg H}_2\text{O}_2/\text{cm}^2$ ) de una superficie de PVP reticulada (3 sustratos diferentes) después de la exposición a VHP.

FIG. 14 refleja la inactivación (reducción logarítmica) de ATCC 6538 de *S. aureus* por contacto con PVP incorporada en paneles de aluminio pintados de CARC mediante reticulación, seguida de exposición a VHP para obtener un rendimiento de peróxido de  $0,53 \text{ mg}/\text{cm}^2$ .

20 FIG. 15 refleja la inactivación (reducción logarítmica) de las esporas de ATCC 19659 de *B. subtilis* por contacto con PVP incorporado en paneles de aluminio pintados de CARC mediante reticulación, seguida de exposición a VHP para un rendimiento de peróxido de  $0,53 \text{ mg}/\text{cm}^2$ .

FIG. 16 refleja la inactivación (reducción logarítmica) de las esporas de *B. anthracis* (cepa de Ames) mediante PVP reticulada en una toallita de tela y sustratos de CARC expuestos a VHP.

25 FIG. 17 refleja las concentraciones de peróxido de varias películas de PVP de 1300 K: no reticuladas, reticuladas y combinadas con niveles variables de LDPE después de la exposición a VHP.

FIG. 18 refleja imágenes compuestas de películas de mezcla maestra de LDPE/PVP 80/20 teñidas con el método de Gram y no teñidas.

FIG. 19 refleja los niveles de peróxido de hidrógeno ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) en PVP reticulado de 1300 K en diversas superficies después de la exposición a VHP.

30 FIG. 20 refleja la inactivación (reducción logarítmica) tanto de las esporas de ATCC 19659 de *B. subtilis* como de ATCC 6538 de *S. aureus* por películas de PVP reticuladas, uno, cuatro y siete días después de la exposición a VHP.

FIG. 21 refleja la estabilidad y la regeneración de peróxido de hidrógeno en películas de PVP reticuladas de 1300 K después de la exposición a 400 ppm, ciclos de descontaminación de VHP de 30 minutos en el momento cero y tiempo de regeneración cero.

35 FIG. 22 refleja la reactividad (reducción logarítmica) de películas reticuladas de PVP de 1300K en los días 1, 2, 4, 7 y 14 después del tratamiento con VHP utilizando ATCC 6538 de *S. aureus*.

FIG. 23 refleja la reactividad (reducción logarítmica) de películas reticuladas de PVP de 1300K en los días 1, 2, 4, 7 y 14 después del tratamiento con VHP utilizando esporas de ATCC 19659 de *B. subtilis*.

40 FIG. 24 refleja niveles de concentración de peróxido de hidrógeno ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) de películas no reticuladas de PVP de 1300 K después de una exposición prolongada y alta a VHP.

FIG. 25 refleja niveles de concentración de peróxido de hidrógeno ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) de 60/40 películas de LPPE/PVP después de la exposición a VHP o remojo en peróxido de hidrógeno líquido al 7%.

FIG. 26 refleja que la carga orgánica no tiene impacto en la reactividad de la superficie de la invención contra ATCC 6538 de *S. aureus*.

45 FIG. 27 refleja el oxidante disponible (expresado como porcentaje de peso de peróxido de hidrógeno) en un 40%, películas de PVP de 58K que utilizan magnesio y peróxido de calcio como agentes activos de película.

FIG. 28 refleja las reducciones logarítmicas promedio de ATCC 6538 de *S. aureus* por contacto con el control de PVP de 58K y las películas que tienen agentes activos de peróxido de calcio y magnesio.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere a un método para proporcionar un recubrimiento de superficie reactivo recargable que tiene propiedades biocidas (incluyendo propiedades esporicidas) y de neutralización química o descontaminación a una superficie de un artículo y al uso de la composición reactiva como un recubrimiento de superficie reactivo recargable que tiene propiedades de neutralización o descontaminación biocidas y químicas.
- Para los fines de la invención, se definen los siguientes términos:
- “Agente activo” significa una sustancia química u otro material que tiene la capacidad de destruir los organismos vivos o de neutralizar o contaminar los contaminantes químicos o biológicos. De acuerdo con la invención, el “agente activo” es peróxido de hidrógeno.
- 10 “Biocida” significa capaz de destruir organismos vivos.
- “Bactericida” significa capaz de destruir bacterias vivas.
- “Neutralización química” o “descontaminación química” significa hacer que un contaminante químico sea neutro e inofensivo para seres humanos o animales.
- “Germicida” significa un agente que mata gérmenes, especialmente microbios patógenos.
- 15 “Polímero higroscópico” significa un polímero que es capaz de absorber moléculas de agua o humedad del ambiente. De acuerdo con la invención, el “polímero higroscópico” comprende polivinilpirrolidona.
- “Microbio” significa un organismo microscópico vivo, como una bacteria, protozoos, hongos o virus.
- “Microbicida” o “microcida” significa que puede destruir microbios vivos.
- 20 “Agente de guerra” significa una sustancia, química o biológica, cuyas propiedades tóxicas o causantes de enfermedades se usan como armas.
- Para los fines de esta invención, “biocida”, “microbicida”, “microcida”, “germicida” y “bactericida” se usan indistintamente.
- Para los fines de esta invención, la “descontaminación” química y la neutralización se usan indistintamente.
- Para los fines de esta invención, “renovable” o “recargable” se usan indistintamente.
- 25 Para los fines de esta invención, los pesos moleculares grandes se expresan como abreviaturas del peso en kilo Dalton (KDa) y se designan como “K” cuando corresponda.
- Las composiciones reactivas proporcionadas por los métodos de acuerdo con la invención comprenden un polímero higroscópico combinado con un agente activo, en donde el polímero comprende polivinilpirrolidona y el agente activo comprende peróxido de hidrógeno.
- 30 Polímeros
- El polímero higroscópico útil en la invención comprende polivinilpirrolidona (PVP). Los polímeros higroscópicos adicionales según la divulgación incluyen polietileno de baja densidad (LDPE) y polietilenglicol (PEG).
- 35 La invención se describe principalmente en términos de PVP, porque ya se ha combinado con éxito con peróxido de hidrógeno líquido para crear productos comercialmente viables, como tiras para blanquear los dientes. En el pasado, también se ha utilizado como un extensor de plasma sanguíneo que demuestra su seguridad. La PVP puede existir tanto en forma líquida como sólida, dependiendo de cómo se procese, lo que lleva a una variedad de opciones de aplicación. Es por estas razones que el polímero usado en la invención comprende polivinilpirrolidona.
- La PVP existe y está disponible en una amplia variedad de pesos moleculares. Los polímeros de PVP útiles varían en peso molecular desde aproximadamente 10K hasta aproximadamente 1300K.
- 40 El polietileno de baja densidad (LDPE) también es un polímero higroscópico que, en principio, puede ser útil. Los polímeros de LDPE útiles varían en peso molecular (longitud de cadena) desde aproximadamente 1000 hasta aproximadamente 130.000.
- Los polímeros higroscópicos útiles en la invención se pueden usar individualmente o en mezclas con otros polímeros. Por ejemplo, una mezcla de PVP y LDPE puede ser útil en principio. Típicamente, el polímero higroscópico se asocia con el agente activo, mientras que otros polímeros, incluso polímeros no higroscópicos, pueden utilizarse en una mezcla para lograr diversas características, siempre que no limiten las propiedades de descontaminación biocida o química del agente activo.
- 45

Si bien no desea estar limitado por la teoría, se propone que los resultados inesperados logrados por las combinaciones de la invención pueden deberse a un efecto sinérgico del o de los polímeros con los agentes activos. El efecto puede ser debido al peso y/o concentración del polímero o concentración activa, o ambos.

#### Agentes activos

5 Otros activos útiles que son generalmente útiles, pero no de acuerdo con la invención incluyen Cloramina-T (tosilcloramida o N-clorotosilamida, sal sódica, una sulfonamida N-clorada y N-desprotonada usada como biocida y un desinfectante suave); y DCICA (ácido dicloroisocianúrico) y sus sales. Algunos de estos activos también pueden usarse como agentes aditivos para una composición reactiva a base de peróxido.

10 El peróxido como activador para una superficie reactiva tiene ventajas prácticas. El peróxido es un producto a nivel mundial, por lo que la disponibilidad local está asegurada en la mayoría de las regiones. El peróxido en concentraciones por debajo del 8% se puede enviar por tierra, agua y aire sin restricciones. El peróxido es un componente común en muchos descontaminantes que está siendo considerado por el Departamento de Defensa en este momento. Actualmente existe tecnología para suministrar peróxido en forma de vapor y líquido. Como tal, un enfoque de la invención está en el uso de peróxido como un activo.

15 El peróxido de hidrógeno se utiliza como agente activo de acuerdo con la invención, ya que se combina fácilmente con una variedad de polímeros. También es conocido como un agente antimicrobiano y descontaminante. Además, los productos de descomposición inerte del peróxido de hidrógeno son el agua y el oxígeno, eliminando así cualquier peligro de toxicidad a largo plazo. Los peróxidos de calcio y magnesio también pueden ser fuentes de peróxido útiles, ya que tienen una buena estabilidad a largo plazo en términos de oxidante total, pero no están de acuerdo con la invención. Los peróxidos de calcio y magnesio son menos preferidos si la calidad de la película es un problema debido al gran volumen de sólidos requerido. También pueden tomar más tiempo que una solución de peróxido de hidrógeno para proporcionar efectos biocidas o de descontaminación.

20 La cantidad total de polímero (ya sea un solo polímero higroscópico, mezclas de polímeros higroscópicos o uno o más polímeros higroscópicos combinados con uno o más polímeros no higroscópicos) presentes en la composición proporcionada por los métodos de acuerdo con la invención puede variar y va del 1 al 99% en peso, en base al peso total de la composición reactiva.

La cantidad de peróxido de hidrógeno u otros activos presentes en la o las composiciones proporcionadas por los métodos de acuerdo con la invención puede variar y varía del 1 al 10% en peso, dependiendo de la forma de peróxido utilizada, es decir, aplicada como una solución o, si está en forma sólida, en una superficie seca.

30 Si bien las composiciones son bastante útiles con los agentes activos de peróxido, opcionalmente, otros aditivos activos pueden incluirse principalmente en cantidades de al menos aproximadamente el 1% en peso, en base al peso total de la composición de acuerdo con la divulgación. Los aditivos activos útiles incluyen cloramina T, DCICA, ácido peracético (PAA), cloro, carbonato de sodio y peróxidos sólidos, como el peróxido de calcio y magnesio y el percarbonato o perborato de sodio.

35 Las composiciones pueden incluir otros aditivos para afectar el procesamiento y/o el rendimiento o las propiedades físicas de la composición o película resultante. A modo de ejemplo, los aditivos que pueden incorporarse incluyen glicol o PEG (polietilenglicoles) para hacer la superficie más flexible, y acetato de vinilo para disminuir la solubilidad y aumentar la resistencia. Otros aditivos útiles serán evidentes para un experto en la técnica.

40 Las composiciones reactivas se preparan y/o se hacen "activas" de acuerdo con la invención en una de dos formas. Un enfoque es incorporar el polímero activo y el polímero higroscópico en una solución mediante la simple mezcla y aplicación de la mezcla a un sustrato, objeto o superficie. Otro enfoque es un proceso de dos etapas en el que el polímero higroscópico se integra en un sustrato o en una superficie y el agente activo se aplica luego a través de una aplicación vaporosa que concentra efectivamente el agente activo en la superficie permitiendo mejores interacciones con los contaminantes. También permite al usuario adaptar la cantidad de activo disponible en la superficie para la aplicación en particular.

45 Las composiciones se pueden aplicar a las superficies de varias maneras. La aplicación podría ser, a modo de ejemplo, la aplicación a una superficie utilizando un cepillo, rodillo, rociador o, de cualquier forma, que se apliquen materiales de recubrimiento, infusión o absorción sobre/en sustratos de tela.

50 Las composiciones proporcionadas por los métodos de acuerdo con la invención ofrecen ventajas significativas sobre los recubrimientos antibacterianos tradicionales. En particular, las composiciones proporcionan un rendimiento mejorado con respecto a las tecnologías tradicionales, al combinar componentes sinérgicamente para proporcionar una eficacia superior a la disponible de un solo componente solo. La invención proporciona una actividad biocida de amplio espectro, que incluye eficacia bactericida, viricida y esporicida. Las composiciones proporcionadas por los métodos de acuerdo con la invención también proporcionan una oportunidad para la neutralización de agentes químicos o toxinas, sin crear peligros adicionales. Las composiciones son particularmente para aplicaciones donde pueden encontrarse agentes químicos y biológicos de guerra.

55

Significativamente, las composiciones reactivas proporcionadas por los métodos de acuerdo con la invención funcionan bien bajo carga orgánica. Las pruebas indican que la eficacia de la superficie no se ve afectada por determinadas cargas orgánicas.

- 5 Las composiciones pueden activarse una vez, usarse y luego desecharse después de su vida útil. Sin embargo, una ventaja significativa y única es que el recubrimiento aplicado originalmente no necesita ser removido, eliminado o reemplazado después de una vida "útil". Las composiciones se pueden renovar o recargar cuando sea necesario, o a intervalos regulares, para garantizar su eficacia y uso continuo. Además, la concentración del agente activo en la superficie se puede controlar durante el proceso de renovación, brindando la oportunidad de adaptar la superficie para responder a diferentes confrontaciones o modificar el tiempo entre la renovación o la recarga del agente activo.
- 10 Debido a que la superficie formada por las composiciones proporcionadas por los métodos de acuerdo con la invención es higroscópica, las superficies reactivas formadas por las composiciones atraen a los organismos hacia la superficie para un mayor contacto y, por lo tanto, una mayor eficacia. Sin embargo, dependiendo del polímero seleccionado para su uso, la superficie no tiene que ser higroscópica, aunque se prefieren los polímeros higroscópicos.
- 15 Las composiciones proporcionadas por los métodos de acuerdo con la invención funcionan para mejorar los procesos de descontaminación probados y abordar muchas de las deficiencias de los procedimientos de descontaminación actuales, tales como:
- Variabilidad del operario de limpieza.
  - Eficacia en todas las superficies de difícil acceso.
- 20 • La protección de eficacia duradera permanece en su lugar después del proceso de limpieza/descontaminación
- La química es segura y ecológica para usar.

25 Modificaciones de la propiedad física. Se puede optimizar una variedad de propiedades físicas de los recubrimientos de superficie reactivos proporcionados por los métodos de acuerdo con la invención para su uso en una serie de aplicaciones diferentes. Propiedades tales como la solubilidad, la calidad, la flexibilidad y la adherencia a los sustratos determinan la utilidad de las composiciones de la invención en cualquier aplicación particular. Una superficie lisa y una distribución uniforme de los componentes en toda la superficie es una propiedad de calidad de película importante que debe tenerse en cuenta.

30 Las propiedades de la superficie pueden verse afectadas por el método de preparación de la superficie, incluido el moldeado, el recubrimiento y la extrusión. Además, se pueden usar técnicas de estratificación o interposición que usan múltiples capas de diferentes tipos de polímeros, para lograr las propiedades deseadas, como entendería un experto en la técnica.

35 Otros enfoques utilizados para afectar la calidad de la superficie incluían la preparación de componentes en una solución disolvente, como el metanol, para mejorar las propiedades de humectación de la superficie. Variar las concentraciones de cada polímero necesario para recubrir una superficie también es importante para asegurar que se logre una película o recubrimiento utilizable. Por ejemplo, si se usa muy poca PVP, un residuo en polvo cubriría las superficies, pero no se crearía una película. Del mismo modo, con las mezclas de polímeros, tales como PVP/LDPE, las limitaciones en la concentración de PVP se establecieron en función de la cantidad de orificios o desgarres que se produjeron durante el procesamiento.

40 Las mezclas de PVP/LDPE se pueden ajustar para impactar sobre la calidad de la película creada. La variación del nivel de cada componente de la mezcla puede afectar la textura de la superficie de la película, el grosor y otras características que definen la calidad de la película.

45 La solubilidad puede jugar un papel importante de dos maneras dependiendo de la aplicación de uso final. La PVP tiene una alta afinidad por el agua y es altamente soluble en la mayoría de los disolventes. Esta alta solubilidad lo hace ideal si los recubrimientos reactivos se usan en aplicaciones removibles, como una aplicación donde se necesita un recubrimiento removible transparente que contenga propiedades de descontaminación. Los aspectos de examen de dicha aplicación incluyen parabrisas, luces o superficies interiores que se lavan con mayor frecuencia. La solubilidad juega un papel importante en la adaptación de composiciones reactivas para uso a corto plazo.

50 La PVP también se puede reticular en una película insoluble en agua a través de un proceso UV o químico. La PVP reticulada conserva todas las propiedades de la PVP sin ser soluble. Una versión no soluble en agua de las composiciones de la invención permite su uso en muchas aplicaciones. La PVP reticulada se hincha al exponerse al agua. Esto puede presentar algunas inconsistencias táctiles y visuales en comparación con otros complejos de polímeros que conservan sus propiedades independientemente de la exposición al líquido. Sin embargo, esta propiedad de absorción se puede utilizar para capturar agentes químicos de guerra e indicar las áreas donde se ha producido la exposición. El cambio en la propiedad de la superficie también se puede usar para resaltar áreas de

55 descontaminación y reducir los procedimientos de descontaminación de una superficie completa a un área

designada.

5 La incorporación de PVP en otras sustancias poliméricas, al tiempo que conserva sus propiedades deseadas, es una forma de limitar la solubilidad de la PVP. La coextrusión de PVP con LDPE es un ejemplo de tal enfoque. Otro enfoque simple sería agregar PVP a otros recubrimientos comercializados. Siempre que el PVP sea accesible para su activación por un líquido o un activo vaporoso, este enfoque es factible. Las aplicaciones para las versiones no solubles en agua incluyen recubrimientos para tiendas de campaña y áreas de alto contacto donde la autodescontaminación sería esencial.

10 La flexibilidad es una propiedad que juega un papel importante en la aptitud para el uso de los recubrimientos. Las composiciones reactivas proporcionadas por la invención pueden usarse con superficies flexibles, tales como tejidos, y sobre superficies duras. Si las películas son quebradizas, pueden agrietarse, lo que crea una superficie irregular o una superficie inadecuada para su uso. La flexibilidad de la película se puede optimizar utilizando aditivos conocidos, como la glicerina, para reducir la fragilidad.

15 La adhesión e incorporación a un sustrato es una propiedad importante. Las composiciones proporcionadas por la invención pueden aplicarse a superficies ya recubiertas sin desprendimiento o agrietamiento del recubrimiento base. En muchas aplicaciones, es deseable tener una película que no se pueda quitar fácilmente con un fregado. Las composiciones proporcionadas por la invención han demostrado ser eficaces cuando se aplican a una gran variedad de sustratos y superficies.

#### Uso/aplicaciones

20 La invención se presta para su incorporación en una superficie como un recubrimiento permanente renovable/recargable permanente o en un dispositivo de uso único para una protección a corto plazo, como un uniforme, bata, sábana u otro tejido, se adhiere sobre almohadillas para su aplicación en superficies críticas de alto contacto. La composición proporcionada por la invención es eficaz cuando se aplica a superficies porosas y no porosas. Por consiguiente, las composiciones proporcionadas por los métodos de acuerdo con la invención pueden incorporarse en una amplia variedad de sustratos para crear materiales reactivos duraderos o pueden aplicarse a una amplia variedad de superficies existentes.

30 Se demuestra una amplia gama de usos para las composiciones proporcionadas por los métodos de acuerdo con la invención, además de las aplicaciones militares analizadas en el presente documento. Estos van desde la aplicación de composiciones reactivas hasta sustratos, telas, objetos y superficies duras ya recubiertos, hasta la formación de películas y láminas de plástico para usar como superficies reactivas. Una superficie reactiva segura y efectiva encontraría aplicaciones en productos/mercados, como el cuidado de la salud, para superficies duraderas, paredes, pisos, herrajes, perillas y manijas, barras de empuje, rieles de cama, cubiertas para superficies de alto contacto y artículos descartables. Los recubrimientos reactivos proporcionados por los métodos de acuerdo con la divulgación también pueden usarse como parte de un sistema de filtración para eliminar y neutralizar contaminantes químicos o biológicos de una corriente de aire. Los productos de consumo como artículos de cuidado personal, juguetes, superficies de cocina, áreas públicas de alto contacto, perillas, placas de empuje, manijas y materiales de empaque también son aplicaciones viables.

La invención se describe con más detalle mediante los ejemplos expuestos en el presente documento.

#### Metodología utilizada en los ejemplos

40 Debido a que la evaluación de superficies reactivas es un campo en desarrollo y no se dispone de métodos de prueba estandarizados, fue necesario identificar y evaluar los métodos de prueba actualmente en uso y desarrollar métodos de aplicación específicos cuando sea necesario. Los métodos utilizados se describen en general a continuación. En la medida en que cualquier ejemplo particular use una metodología diferente, se describe dentro del ejemplo.

45 Ingrediente activo. La cantidad de ingrediente activo en combinación con el polímero se evaluó antes de cualquier prueba de eficacia. Dado que las químicas oxidativas se seleccionaron para el desarrollo de la tecnología, la mayoría de las evaluaciones se realizaron utilizando una titulación de tiosulfato de sodio en combinación con yodato de potasio como método preferido. Esta técnica se utilizó para medir la cantidad de agente activo en soluciones al evaluar tecnologías candidatas, así como evaluar la concentración de agentes activos en superficies. Las modificaciones fueron adaptadas para analizar muestras sólidas.

50 Evaluación de las propiedades físicas. Las propiedades físicas se evaluaron utilizando tanto observaciones cualitativas como métodos cuantitativos, según corresponda. En algunos casos, las observaciones simples se consideraron adecuadas para diferenciar entre los componentes potenciales en las áreas de acabado superficial, flexibilidad y porosidad. La microscopía se usó para evaluar dónde se encontraba una partícula en un sustrato y cuán uniformemente se distribuyó. La espectroscopía IR se usó para identificar el peróxido de hidrógeno positivamente como el oxidante presente en la superficie de los recubrimientos de la invención. También se realizaron pruebas utilizando IR cercano junto con el ángulo de incidencia para tratar de dilucidar el nivel de penetración de peróxido de hidrógeno en los recubrimientos. Se usaron pruebas de nitrógeno para verificar la

composición de PVP en mezclas de películas. Las muestras se extrajeron de varios lugares en cualquier muestra de película y se analizaron para determinar si había una cantidad constante de la concentración de PVP prevista.

#### Métodos de ensayo de eficacia química

Las pruebas de eficacia química se completaron utilizando simulantes de agentes químicos.

5 Los agentes químicos útiles como simulantes incluyen:

CEPS (sulfuro de 2-cloroetilfenilo), DBS (sulfuro de dibutilo) y tioanisol para HD (mostaza nitrogenada)

DEMPT (fosfonotioato de dietilmetilo) para VX (un agente químico hecho por el hombre como un agente nervioso y considerado uno de los agentes químicos de guerra más tóxicos)

10 El uso de simulantes para predecir el resultado para las pruebas con agentes reales es bien conocido, y se han desarrollado varios modelos de correlación que ayudan a predecir el resultado de las pruebas con agentes reales. Si bien ningún simulante es 100% predictivo de los resultados de las pruebas de agentes en vivo, los resultados sirvieron para diferenciar entre tecnologías prometedoras y aquellas que no proporcionaron valor.

15 Se utilizan tres tipos generales de pruebas para evaluar la eficacia química: pruebas de solución con simulantes, pruebas de superficie con simulantes y resonancia magnética nuclear de alta resolución con rotación en ángulo mágico (HRMAS NMR) con agentes vivos.

Debido a que las reacciones sólido-sólido son lentas, los polímeros y los agentes activos se probaron en solución a bajas concentraciones. Estos modelos líquidos permitieron la separación de candidatos de descontaminación prometedores antes de que se dedicara un tiempo considerable y el desarrollo del proceso a la prueba de superficies relevantes. Se realizaron pruebas de simulación química en superficies reactivas que tienen áreas de superficie de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. La superficie reactiva se colocó en un vial de vidrio de 10 mL y se manchó con 1 µL de un agente químico de guerra como se indica arriba. Se permitió que el sistema reaccionara durante el tiempo asignado para el simulante en particular. Los tiempos de reacción se basaron en correlaciones previamente establecidas entre simulantes y agentes vivos y dependían del agente diana. Después del período de reacción, las superficies se extrajeron en isooctano. Luego se transfirió un volumen fijo de isooctano a un vial que contenía una solución de enfriamiento para detener todas las interacciones. El análisis se realizó en un par de cromatógrafos de gases con un espectrómetro de masas (GCMS) para evaluar la concentración del simulante de guerra extraído de la superficie reactiva. Se prepararon estándares externos a concentraciones reactivas del 100%, 50% y 25%. Todos los resultados se informaron como porcentaje de reducción del agente/simulante original.

30 HRMAS RMN. La prueba del agente vivo se realizó en un sustrato de tela al que se aplicaron los polímeros de la invención. Las muestras de tela se colocaron en una cámara de VHP y se expusieron a 400 ppm de VHP durante 30 minutos para su activación. A menos que se indique lo contrario en los ejemplos, toda la activación de VHP ocurrió a 400 ppm durante 30 minutos.

35 Las muestras de película tratada se analizaron para asegurar que se había logrado la activación apropiada. Para una exposición de 1 g/m<sup>2</sup> o 0,1 mg/cm<sup>2</sup>, se cortó un cuadrado de 1 cm<sup>2</sup> del sustrato dentro de las 6 horas de la activación de VHP. También se analizaron muestras no tratadas (no VHP) para servir como control de prueba. Luego, el cuadrado se enrolla en un cilindro y se coloca en un rotor HRMAS (recipiente de muestra). Se preparó una solución diluida al 1% del agente en isooctano (2,2,5-trimetilpentano) en peso. Usando la concentración de peso a volumen, se pipeteó un volumen equivalente a 0,1 mg del agente sobre la muestra de película. Se hizo un esfuerzo para distribuir el disolvente lo más uniformemente posible sobre la superficie de la película. Se dejó evaporar el disolvente durante 5 minutos, pero todavía se observó algo en el espectro de RMN. Las muestras se analizaron periódicamente por RMN hasta 24 horas después del enriquecimiento. Para HD, se controló <sup>13</sup>C, para VX y GD (soman, un agente nervioso), se controló <sup>31</sup>P.

#### Métodos de ensayo de eficacia microbiológica

45 Las pruebas microbiológicas se completaron utilizando sustitutos de B. anthracis aceptados. La prueba de eficacia microbiológica se realizó utilizando el protocolo derivado de la designación estándar ASTM E 2197-02: método de prueba de soporte de disco cuantitativo estándar para determinar las actividades bactericidas, viricidas, fungicidas, micobactericidas y esporicidas de los germicidas químicos líquidos.

50 Las esporas de ATCC 19659 de B. subtilis se eligieron como sustitutas de las esporas de B. anthracis, como lo demuestran los estudios de correlación previos y de la bibliografía que demostraron que las esporas de B. subtilis son más difíciles de desactivar que las esporas de B. anthracis. En nuestra prueba de eficacia, se seleccionó una confrontación de 10<sup>5</sup> CFU y se lo envió a un área circular en el sustrato de prueba de aproximadamente un tercio de un centímetro de diámetro o 0,085 cm<sup>2</sup>. Esto es equivalente a un exceso de 10<sup>10</sup> CFU/m<sup>2</sup>, que supera la confrontación de inicio del nivel objetivo de 10<sup>8</sup> CFU/m<sup>2</sup> establecido para los sistemas JSSED/JPID (Descontaminación de equipos sensibles al servicio conjunto/Descontaminación del interior de la plataforma conjunta). También se utilizaron otras confrontaciones.

55

Para desafiar los recubrimientos reactivos potenciales, una parte del material candidato se inoculó con una suspensión de esporas de ATCC 19659 de *B. subtilis*. Después de la inoculación, se incubaron el inóculo líquido y el material, lo que permitió que el recubrimiento desactivara la exposición de esporas. Una vez transcurrido un tiempo de incubación establecido, la reacción se detuvo mediante la acción química y física de inundar la muestra del cupón y el material de recubrimiento reactivo con un medio de crecimiento neutralizante.

Una vez enfriada, la mezcla de reacción, que consiste en el recubrimiento reactivo, la estimulación de esporas y el medio de crecimiento neutralizante se sometió a tratamiento en un baño de agua de limpieza ultrasónica para facilitar la liberación de la estimulación de esporas de los materiales de recubrimiento reactivos en los medios de crecimiento neutralizantes. Después de la sonicación, los medios de crecimiento se evaluaron para determinar las esporas sobrevivientes mediante procedimientos microbiológicos estándar, es decir, la dilución del medio de crecimiento y las unidades formadoras de colonias (CFU) que se enumeran.

Los datos de dilución de CFU resultantes se utilizaron para estimar la densidad de esporas de LOG<sub>10</sub> en el material en el momento en que se detuvo la reacción. Al evaluar un solo material, se probaron varios tiempos de incubación secuencial, para permitir un análisis de la densidad de esporas de LOG<sub>10</sub> en función del tiempo. La velocidad a la que el recubrimiento candidato inactivó la exposición de esporas, deducida de la caída en la densidad de esporas de LOG<sub>10</sub>, se utilizó para comparar la eficacia de varios materiales candidatos.

Se evaluó la capacidad de los materiales de recubrimiento reactivo para inactivar las estimulaciones de esporas de *B. anthracis* (Sterne) y *B. anthracis* (Ames) de una manera similar a la descrita para evaluar la inactivación de la estimulación de sustitución, esporas de ATCC 19659 de *B. subtilis*, supra. Se hicieron modificaciones menores al protocolo en la medida necesaria para cumplir con los procedimientos de seguridad requeridos para los agentes biológicos vivos.

Métodos de activación/Incorporación de agente activo. Los materiales de recubrimiento se activaron utilizando uno de los tres métodos: activación/exposición de VHP de la superficie del polímero, incorporación activa directamente en el polímero antes del secado o aplicaciones líquidas del agente activo a una superficie de polímero seca. El ciclo de exposición típico para las muestras fue de 30 minutos a 400 ppm de peróxido de hidrógeno en una cámara de peróxido de hidrógeno vaporoso (VHP). La aplicación de peróxido de hidrógeno en forma líquida también se probó con película premoldeada. Las muestras de película premoldeadas se prepararon y cortaron al tamaño deseado y luego se expusieron a soluciones de peróxido de hidrógeno líquido en concentraciones del 1-7% durante varios períodos de tiempo. Las muestras se dejaron secar al aire y se analizaron para determinar el porcentaje de oxidante, es decir, peróxido de hidrógeno. Otras muestras se prepararon agregando peróxido de hidrógeno líquido u otro activo a PVP primero, seguido de fundición.

#### Preparación de la muestra

La PVP se puede incorporar a las películas en una amplia variedad de formas para adaptar su rendimiento. Esta flexibilidad hizo posible explorar una gama de aplicaciones. Mediante el uso de diversos aditivos y métodos de fabricación, se produjo una amplia variedad de películas para realizar pruebas.

Se utilizaron varios métodos de producción de película para lograr ciertas propiedades deseadas. Cada una de las técnicas abordó una aplicación particular para la tecnología inventiva y proporcionó un beneficio específico en la creación de una superficie reactiva.

Fundición. La forma más simple de producción de películas fue la fundición. Este enfoque básico produjo películas al agregar un volumen fijo de la solución de polímero a una superficie con un área conocida. Recipientes plásticos de pesaje pequeños, tapones de frascos de GC, viales de vidrio y paneles de CARC se utilizaron como plantillas de superficie. La película producida tendía a ser muy uniforme, creando excelentes superficies para las pruebas. El método de fundición también permitió la preparación de un gran número de muestras muy rápidamente. Una técnica similar utilizó una barra Meyer para controlar el grosor de las películas creadas en grandes láminas de vidrio y Viton.

Las preparaciones de la tecnología PVP-HP en agua tendían a tener una alta tensión superficial, lo que causaría rebordes en lugar de extenderse sobre una superficie al intentar producir películas. Se añadió metanol a las soluciones para reducir la tensión superficial para la producción de películas, que fue clave para crear un espesor uniforme en las películas y reducir el tiempo de secado.

Dado que las interacciones de sólido-sólido son mucho más lentas que las reacciones de líquido-líquido, se hizo un esfuerzo por crear una superficie con el área máxima para la incorporación "activa" para aumentar la reactividad. Un método disponible para crear polímeros de alta área de superficie es el electro-hilado. Se hicieron muestras de PVP nano-hilado y se recolectaron en un soporte de tela de nylon, lo que permitió que las fibras se manipularan sin colapsar su estructura. Los problemas surgieron debido a la alta solubilidad en agua de PVP, que la hizo muy sensible a la humedad en esta forma y, por lo tanto, incapaz de retener las propiedades durante las pruebas de aplicación activa. Aun así, esta técnica se considera viable cuando se usa en combinación con otros polímeros o aditivos o reticulación para proporcionar la estructura y propiedades deseadas del polímero para la incorporación activa.

5 Reticulación a una superficie. La PVP es un polímero muy soluble, no solo en agua sino en una amplia variedad de disolventes. No todas las aplicaciones se benefician de un sistema soluble. Se investigaron dos enfoques para reducir la solubilidad de la PVP. Una técnica era reticular el polímero, creando una forma insoluble en una superficie dada. La reticulación es un proceso mediante el cual las cadenas de polímeros se unen químicamente para formar una red polimérica. La PVP se puede reticular para hacer una superficie no soluble en una variedad de formas conocidas por los expertos en la técnica, incluida la exposición a una longitud de onda específica de la luz UV o mediante el uso de agentes reticulantes químicos, es decir, iniciadores. El uso de agentes reticulantes químicos habría requerido la evaluación de múltiples productos químicos y agregado otra variable a la prueba. Como tal, se usó un túnel de luz UV para reticular la PVP, que puede ampliarse fácilmente para la producción.

10 La cámara UV estaba equipada con cuatro bombillas UV de 24 vatios, cada una de 30 cm de largo. Las lámparas estaban a una altura de 5 cm por encima de la superficie de las muestras. Estas lámparas emitían rayos UV A, B, C y V con el intervalo de interés particular para la reticulación de 250-260 nm (UVC). Las mediciones de intensidad de luz se tomaron antes de cada exposición de lotes desde 114-190 mJ/min. Se determinó que las condiciones óptimas de polímero para la reticulación eran del 10% p/p de 360K PVP con un tiempo de exposición UV de 2 horas con las condiciones UV indicadas anteriormente. Se añadió una cantidad catalítica de peróxido de hidrógeno (20 mM) para iniciar la reacción. El método generó películas reproducibles con >95% de la superficie reticulada.

15 El porcentaje de reticulación de las muestras se determinó sobre una base de peso. El porcentaje de reticulación (o porcentaje de gel) fue una comparación de la cantidad de PVP insoluble (reticulada) con el peso de PVP agregado a la superficie. Después de la exposición a los rayos UV, algunas muestras se colocaron en vasos con 100 ml de agua desionizada (DI) y se dejaron remojar durante 24-72 horas. Esto permitió que la PVP no reticulada entrara en solución mientras la parte reticulada permanecía en contacto. El polímero reticulado restante se capturó por filtración y se secó a 50°C durante la noche. Se midió el peso del polímero no soluble en agua. Porcentaje de reticulación (% de gel) = peso del polímero no soluble/peso del polímero aplicado x 100%.

20 Integración de sustratos. Otra forma de reducir la solubilidad de la PVP era integrarla en un sustrato que la protegiera del agua de la superficie y, al mismo tiempo, hacerla disponible para absorber el peróxido y proporcionar eficacia en la superficie. Se probó la combinación de PVP con polietileno de baja densidad (LDPE), creando un sustrato por extrusión. El objetivo era crear una matriz de los dos materiales que proporcionara un equilibrio de usabilidad y durabilidad y proporcionara agua, al mismo tiempo que estuviera disponible para absorber el peróxido y proporcionar eficacia en la superficie.

25 Extrusión. La extrusión es un proceso bien establecido para convertir plásticos en materiales utilizables. Se probaron varios métodos de extrusión diferentes. La PVP tiene una temperatura de degradación inferior a la de su punto de fusión. Esto significa que la PVP no es adecuada para la extrusión por sí sola, por lo que debe combinarse con un polímero que proporcione las propiedades deseadas. Se eligió LDPE para combinar con PVP debido a su disponibilidad, excelentes propiedades de extrusión a una temperatura por debajo de la temperatura de degradación de PVP y sus características poliméricas bien definidas.

30 La extrusión de las muestras se realizó en una extrusora de mesa donde todos los materiales se mezclaron y luego se colocaron en una extrusora de doble tornillo. Los materiales se dejaron recircular durante un tiempo y luego se extruyeron en una película de 1 pulgada de ancho. Se produjeron muestras más grandes utilizando una máquina piloto en escala de laboratorio capaz de producir películas de 4 pulgadas de ancho. PVP y LDPE se introdujeron en las máquinas de dos maneras. Un método fue mezclar previamente los ingredientes secos y alimentar la mezcla en la extrusora. Esto produjo resultados variables debido a la separación de tamaño del LDPE y PVP en la tolva de alimentación. Otro método fue crear una "mezcla maestra" antes de alimentar la extrusora. La mezcla maestra se realizó mezclando la PVP y el LDPE en una extrusora separada que fomentó la mezcla. Esto obligó a la creación de un material pelletizado que tenía una composición consistente. La prueba de los pellets de mezcla maestra antes de la extrusión confirmó que el proceso de mezcla maestra fue eficaz para distribuir uniformemente la PVP en el LDPE.

35 Una evaluación de tres pesos moleculares de PVP, es decir, 58K, 360K y 1300K, mostró que los 1300K tenían la distribución más uniforme en el sustrato. (Para los propósitos de estos ejemplos, los pesos moleculares grandes se expresan como abreviaturas del peso del kilo Dalton (KDa) y se designan como "K"). Además, la cantidad de PVP que podría incorporarse también se evaluó al 10, 20, 30 y 40%. La incorporación del 40% se usó para la producción de la mezcla maestra, pero no fue adecuada para la extrusión sola, ya que hubo un desgarro significativo. La mezcla del 30% de PVP proporcionó condiciones de superficie menos que ideales.

40 En algunos ejemplos, se añadió polietilenglicol (PEG) a la mezcla de LDPE/PVP para mejorar sus propiedades físicas, notablemente la flexibilidad. El PEG es un polímero no tóxico, soluble en agua, similar a la PVP. También tiene un punto de fusión más bajo, similar al de LDPE, y sin la degradación experimentada con la PVP. La incorporación de PEG estaba destinada a mejorar la suavidad y elasticidad de las películas al tiempo que reduce el punto de fusión del sistema para minimizar la degradación de la PVP. Debido a la solubilidad de PEG y PVP en agua, la concentración de PEG se limitó a aproximadamente el 2%.

Efecto del peso del polímero

Finalmente, algunas propiedades físicas de la tecnología pueden modificarse mediante la selección del peso molecular del polímero. Para los fines de la invención, se evaluaron cuatro pesos moleculares medios de PVP. Los pesos moleculares medios seleccionados fueron 10K, 58K, 360K y 1300K. Ningún peso molecular medio único siempre se desempeñó mejor. Diferentes pesos moleculares demostraron ser óptimos para diversas aplicaciones. Las películas que utilizaban polímeros de peso molecular más bajo creaban superficies mate que se solubilizaban fácilmente. Los pesos moleculares más altos eran más adecuados para la reticulación por luz UV.

### Ejemplo comparativo A

Los productos comerciales disponibles (COTS) que pretendían generar peróxido de hidrógeno en las superficies se probaron para determinar su eficacia y se pueden comparar con las composiciones de la invención.

Se identificaron tres pinturas COTS diferentes que pretendían crear peróxido en las superficies en presencia de agua y luz ultravioleta (UV). Los productos probados eran de e-Paint® e incluían E-Paint® SN-1, E-Paint® ZO (ambos a base de disolventes) y E-Paint®-2000 (a base de agua). Estos productos fueron diseñados para su aplicación a los fondos de embarcaciones para prevenir el ensuciamiento por organismos biológicos.

Los productos se aplicaron a los cupones según lo especificado por el fabricante y se probaron en las condiciones recomendadas. Las superficies recubiertas con las tres pinturas se evaluaron para determinar la concentración de peróxido de hidrógeno generado durante un período de tiempo específico. Esto fue seguido por pruebas de eficacia contra un agente biológico sustituto y un agente químico simulante. La prueba también se completó utilizando diferentes niveles de humedad superficial y exposición a la luz UV en un intento por maximizar el contenido de peróxido de hidrógeno.

Si bien los productos pueden ser funcionales para los fines previstos, no se identificaron condiciones o métodos que demostraran que estos productos en particular proporcionan el nivel de reactividad necesario para su uso como un agente químico o agente descontaminante de superficies biológicas. Los resultados de las pruebas indicaron constantemente que el nivel de oxidante de la superficie generado por estos productos COTS era demasiado bajo para ser de cualquier valor como superficie reactiva. Una consideración crítica es que estos productos están diseñados para funcionar de manera muy lenta y constante durante un largo período de uso. Por lo tanto, aunque es posible que muestren cierta eficacia en exceso, no cumplieron con los requisitos de tiempo de reacción deseados para una eficacia inmediata.

Cuando se aplicaron a cupones con dos capas para lograr el grosor recomendado por el fabricante y se colocaron en 10 ml de agua DI (desionizada) y se colocaron para exposición a luz UV o sin luz UV durante 72 horas, se titularon alícuotas de la solución acuosa para determinar el nivel de peróxido de hidrógeno. Los resultados mostraron una producción mínima de peróxido de hidrógeno ( $<0,0013$ ) con un resultado ligeramente mayor cuando se usa luz UV.

El simulante HD sulfuro de dibutilo (DBS) se utilizó para probar la eficacia de la descontaminación, a pesar de los bajos niveles de peróxido evaluados. Se aplicaron dos capas de pintura a los depesores de madera para cumplir con el grosor recomendado por el fabricante. Los cupones de cada pintura fueron manchados con 1,5  $\mu$ L de una solución de 50% de DBS y 5% de dodecano en alcohol isopropílico y agua (al 0% y 2,5%). Las muestras se analizaron utilizando luz UV o sin luz UV. La solución se dejó reaccionar con la superficie durante 10 minutos antes de que la muestra se transfiriera a un tubo de ensayo que contenía 10 ml de alcohol isopropílico para la extracción de DBS y los compuestos relacionados. A los 15 minutos (cinco minutos de extracción), una muestra de la solución de extracción se transfirió a un vial y se analizó mediante GCMS utilizando el método apropiado.

Las dos pinturas a base de disolventes parecían proporcionar una mejor eficacia que la pintura a base de agua en términos de porcentaje de descontaminación; sin embargo, no había manera de diferenciar entre la absorción de DBS en la superficie y una reacción. Los resultados parecían ser una indicación de que el simulante fue absorbido y sostenido por la superficie de la pintura. En teoría, no se podría generar peróxido de hidrógeno en un sistema sin la presencia de agua. Sin embargo, no hubo diferenciación entre la eficacia de las muestras con y sin agua, por lo que se llegó a la conclusión de que había poco o ningún valor en la generación del peróxido de hidrógeno.

Las correlaciones anteriores entre la DBS simulante y la HD indican que, si no se logra el 100% de descontaminación de la DBS, como en el caso de este ejemplo, no se descontaminará más del 50% de la HD. Por lo tanto, los resultados de esta prueba indicaron que incluso con agua y luz UV, los sistemas no proporcionaron el nivel de peróxido de superficie requerido para la eficacia ni ninguna neutralización significativa de la DBS simulante de HD.

Se realizó un estudio microbiológico en los dos materiales (2000 y SN-1) para determinar si los productos podrían funcionar en esta área. Se realizaron una serie de estudios de eficacia bactericida en el tiempo utilizando una estimulación de ATCC 6538 de *S. aureus*.

Ninguna de las pinturas demostró una reducción de LOG de células en la suspensión en los marcos de tiempo utilizados (30, 60 y 90 minutos). Se observaron ambas pinturas como secuestrantes del peróxido que generaban. Debe observarse que la actividad bactericida puede depender en gran medida de la cinética de interacción entre la

superficie de la pintura y las células de *S. aureus* y, por lo tanto, la evaluación podría estar sesgada hacia una actividad escasa o nula. Aun así, los resultados revelaron que las pinturas no tenían capacidades de rendimiento en relación con las de las composiciones de la invención, a saber, la inactivación moderadamente rápida de una confrontación biológica elevada.

**5 Ejemplo comparativo B**

También se evaluó una mezcla seca de peróxido y PVP, comúnmente conocida como peroxidona. Este material se encuentra más comúnmente en un gel para uso en productos como blanqueadores de dientes.

Se realizaron pruebas para determinar cómo se comparaba la peroxidona con las composiciones de la invención. Se evaluaron dos versiones de peroxidona, la peroxidona 30 y la peroxidona 90, que difieren en el peso molecular. Cuando se probaron como una solución y se compararon con las soluciones de PVP-HP de la invención, estos materiales comerciales mostraron un nivel mucho más bajo de peróxido de hidrógeno que las muestras de las composiciones de la invención. Esta menor concentración de peróxido es probablemente la razón de la actividad bactericida significativamente menor de las soluciones comerciales de peroxidona.

La peroxidona 30 y la peroxidona 90 se prepararon como soluciones al 5% y al 10% (peso/peso) y se evaluó el contenido de peróxido de hidrógeno por titulación. Se logró una concentración de hasta el 2% de peróxido de hidrógeno (en peso). Las pruebas con agentes vivos de HD con soluciones de peróxido de hidrógeno indicaron que se necesita un 5% para que este agente activo sea efectivo solo. Debido a problemas de viscosidad, las concentraciones de peroxidona no se pudieron aumentar y, por lo tanto, limitan la concentración activa que podría lograrse con este material.

La peroxidona 30 y la peroxidona 90 se evaluaron como germicidas líquidos (10 ml preparados en agua destilada a concentraciones de 1,0%, 5,0% y 10,0% peso/volumen) para determinar la eficacia estafilocócica comparando la supervivencia de una parte de cultivo de bacterias líquido (ATCC 6538 de *S. aureus*) expuesto al líquido durante un período de tiempo con una parte de bacterias que no han sido expuestas al líquido. La diferencia de LOG entre las dos muestras se usó como una métrica de comparación.

La evaluación microbiológica corroboró el análisis químico. No se encontró que las soluciones acuosas de peroxidona fueran bactericidas en los marcos de tiempo probados (15, 30 y 60 minutos).

Estos análisis comparativos de productos disponibles comercialmente demostraron que, a pesar de su capacidad para generar peróxido de hidrógeno, la concentración de peróxido de hidrógeno era insuficiente para lograr la eficacia de la descontaminación química o la actividad biocida con la rapidez y la integridad de las presentes composiciones de la invención.

**Ejemplo 1 - Contenido de oxidante y eficacia de PVP/peróxido de hidrógeno en solución**

Muchos materiales degradan significativamente el peróxido de hidrógeno (HP) cuando se mezclan en solución. El primer paso, por lo tanto, para determinar si se puede usar PVP con HP fue crear mezclas de diferentes concentraciones y pesos moleculares de componentes y medir el impacto en la concentración de peróxido.

Se evaluaron cuatro pesos moleculares de PVP en dos concentraciones, 1% y 10%. Los pesos moleculares de la PVP fueron 10K, 58K, 360K y 1300K. La concentración de peróxido de hidrógeno utilizada fue del 1%, 5% y 10%. Las soluciones se midieron para determinar el oxidante total y los resultados se analizaron para detectar tendencias que indicarían que el peróxido de hidrógeno se estaba degradando, en lugar de formar complejos con el polímero de PVP. Las concentraciones de peróxido de hidrógeno resultantes se muestran en la Figura 1 y en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Efecto de la adición de PVP a HP

Peso molecular	Concentración	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 1%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 5%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 10%
<b>Control</b>	Solo agua	1,0%	5,1%	10,2%
<b>10K de PVP</b>	PVP al 1%	1,0%	5,0%	10,1%
	PVP al 5%	1,0%	4,8%	9,7%
	PVP al 10%	0,9%	4,6%	9,1%
<b>58K de PVP</b>	PVP al 1%	1,0%	5,0%	10,1%

	PVP al 5%	1,0%	4,8%	9,7%
	PVP al 10%	0,9%	4,6%	9,1%
<b>360K de PVP</b>	PVP al 1%	1,0%	5,0%	10,1%
	PVP al 5%	1,0%	4,8%	9,7%
	PVP al 10%	0,9%	4,6%	9,2%
<b>1.300K de PVP</b>	1% PVP	1,0%	5,0%	10,0%
	5% PVP	1,0%	4,9%	9,7%
	10% PVP	0,9%	4,6%	9,1%

Los datos muestran que al mezclarse la PVP líquida de pesos moleculares variables con el HP líquido en concentraciones variables, el impacto en el oxidante disponible fue insignificante. La capacidad de medir el oxidante total se redujo en la misma cantidad que la presencia de PVP, es decir, el 10% de PVP causó una reducción del 10% en la concentración de oxidante medida, lo que indica que se produjo una degradación mínima o nula del agente activo (Figura 1). Esto es válido para concentraciones de peróxido de hidrógeno del 1 al 10% sobre los cuatro pesos moleculares de PVP analizados (véase la Tabla 1).

Métodos de evaluación biológica. Para este ejemplo, se realizaron estudios de tiempo de exterminio para evaluar la eficacia microbiológica de varias fórmulas. Para las formas de realización de la solución, se realizaron pruebas de estimulación microbiológica utilizando ATCC 6538 de *S. aureus*. La suspensión del organismo se diluyó una vez a una concentración de  $1 \times 10^8$  en el regulador de Butterfield. Se pipetearon 100  $\mu$ L de la suspensión en 9,9 ml de cada fórmula de prueba y se mezclaron. Se retiraron muestras de 100  $\mu$ L de esta solución en momentos específicos y se neutralizaron mediante la adición de 9,9 ml de caldo LAT con catalasa al 1%. Los tubos de organismos neutralizados se diluyeron en serie y se vertieron en placas. Las placas se incubaron a 37°C, o según lo requerido por el organismo que se estaba probando. Después de 1 a 2 días de incubación, las placas se retiraron y se contaron los resultados de registro según el método interno de recuento de placas aeróbicas (MCM 200.05).

Se evaluaron cuatro pesos moleculares de PVP (descritos anteriormente) a dos concentraciones, 1% y 10%. La concentración de peróxido de hidrógeno fue del 10% en las cuatro soluciones y se usó un 10% de peróxido de hidrógeno como control. 10 mL de cada solución mostrada en la Figura 2 se evaluaron para determinar la actividad biocida estimulándolos con un cultivo en suspensión regulada de ATCC 6538 de *S. aureus* transferido desde medios sólidos. La reacción se detuvo a los 15, 30 y 60 segundos con caldo LAT (caldo con un suplemento de solectina e interpolación (1% v/v de catalasa)) y posteriormente se analizó respecto de las CFU. Cada solución/punto temporal se probó tres veces. La reducción de LOG media resultante para cada combinación de solución/tiempo se establece en la Figura 2.

Principalmente, los datos de la Figura 2 mostraron que las soluciones de PVP-HP son eficaces para inactivar una suspensión reguladora de células ATCC 6538 de *S. aureus*. Los datos también demostraron la relación entre la eficacia de una solución de PVP-HP y el peso molecular de la PVP en la solución. Cuando se indica la eficacia, como en las soluciones de PVP de 58K y 360K, también hubo una relación entre la eficacia y el porcentaje de inclusión de PVP en la solución. Al aumentar la concentración de PVP, se incrementó la eficacia de la solución, y un PVP de menor peso molecular es más eficaz que un PVP de mayor peso molecular. Los datos demostraron que las PVP de bajo peso molecular (10K o 58K) con peróxido de hidrógeno al 10% superaron las soluciones de peróxido de hidrógeno al 10% o de PVP solas cuando se probaron respecto de *S. aureus* en un estudio de tiempo de exterminio. El efecto también fue proporcional a la cantidad de PVP presente en la solución. Esto significa que un 1% de PVP con un 10% de peróxido de hidrógeno tuvo un efecto mayor en *S. aureus* que un 10% de peróxido de hidrógeno solo, pero un 10% de PVP con un 10% de peróxido de hidrógeno superó a ambas soluciones.

La comprensión del impacto del complejo PVP-HP sobre la eficacia bactericida permitió la transición de las pruebas del descontaminante en solución a la formación de películas y la producción de una superficie reactiva.

### Ejemplo 2 - Películas moldeadas de PVP y de peróxido de hidrógeno

Se prepararon películas (moldeadas) a partir de soluciones de peróxido de hidrógeno (10% y 20%) y PVP, dejando que se secaran 2 mL de cada una de las soluciones en el fondo de 4 viales de vidrio. Se utilizaron diversos pesos moleculares de PVP, incluidos 10K, 58K, 360K y 1300K. Cada concentración de peróxido de hidrógeno se usó con

cada peso molecular de la PVP. Los pesos iniciales y finales de los viales se utilizaron para calcular la concentración de oxidante de cada muestra.

Los resultados se muestran en la Figura 3. Las concentraciones de peróxido de hidrógeno en las películas aumentaron a medida que se secaban. Las concentraciones de peróxido de hidrógeno aumentaron hasta dos veces la concentración en solución. Este ejemplo demuestra que las películas de PVP se pueden hacer con un nivel muy alto de potencial de oxidación inherente. Los niveles de oxidante medidos fueron aproximadamente el doble de la concentración inicial. No parece haber diferencia en el potencial de oxidación en base al peso molecular de la PVP.

Pruebas microbiológicas. El procedimiento de prueba microbiológica para superficies usadas fue QCT2 modificado. El organismo por analizar se diluyó a una concentración de  $1 \times 10^7$  en el regulador de Butterfield. Luego se aplicaron 20  $\mu$ L del inóculo (ATCC 6538 de *S. aureus*) a cada superficie de prueba en el momento cero (t0). Las superficies pueden incluir tapones de frascos de GC invertidos, viales de vidrio, telas, superficies pintadas que utilizan un recubrimiento resistente a agentes químicos (CARC), comúnmente utilizado en equipos militares, o cualquier otra superficie con la invención aplicada. La superficie utilizada para este ejemplo fue una película creada en la parte inferior de viales de 4 dracmas. Después del tiempo de contacto apropiado, la superficie se neutralizó agregando 10 ml de caldo LAT con catalasa al 1%, o un volumen apropiado para cubrir la superficie de prueba. Las superficies con el neutralizador se agitaron brevemente, se sonicaron durante cinco minutos, se agitaron brevemente otra vez y se tomaron muestras. Las diluciones seriales se sembraron con agar apropiado para el organismo. Las placas se incubaron a 37°C, o según lo requerido por el organismo que se está probando. Después del período de incubación requerido (específico del organismo), las placas se contaron y se registraron según el método interno de recuento de placas aeróbicas (MCM 200.05).

Los resultados se muestran en la Figura 4 para una reducción promedio de LOG a los 5, 30 y 120 minutos para películas PVP de 10K y 58K hechas con soluciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 20%. El estudio microbiológico en las películas del Ejemplo 2 mostró que el peso molecular de la PVP, así como la concentración de peróxido de hidrógeno tuvieron un impacto en las pruebas microbiológicas. Para estas muestras, se produjo una reducción de seis log (eliminación completa) de *S. aureus* en 100-120 minutos.

### Ejemplo 3 - Peróxido de hidrógeno vaporizado (VHP)

Un método alternativo para aplicar el peróxido de hidrógeno a la película es la exposición al peróxido de hidrógeno vaporoso (VHP). Después de recopilar datos en el Ejemplo 2, que mostró que secar una solución de PVP-HP en una película daba como resultado una concentración del peróxido y la actividad antimicrobiana, el objetivo del siguiente experimento fue determinar el potencial oxidante de la PVP en películas moldeadas después de la exposición a un ciclo de VHP. Se determinó que las soluciones de PVP (sin solución de peróxido) podrían complejarse eficazmente con peróxido de hidrógeno usando VHP. Con el uso de este método, el peróxido de hidrógeno estaba fácilmente disponible en la superficie. La concentración puede variar según el tiempo de exposición y/o la concentración de vapor de peróxido de hidrógeno.

Las películas se moldearon a partir de PVP al 10% de diversos pesos moleculares, preparadas en metanol. Se colocó un volumen fijo de 1,2 ml en un recipiente de plástico de pesaje y se dejó secar. Se recolectaron los pesos posteriores a la muestra para usarlos en los cálculos. Las películas se colocaron en una cámara de prueba de aluminio y se expusieron a 250 ppm de VHP durante 90 minutos. Las películas se titularon inmediatamente para determinar la concentración total de oxidante.

Los resultados se muestran en la Figura 5 y mostraron que se midieron concentraciones similares de oxidante en todas las muestras después de la exposición a un ciclo de VHP. Las muestras de control sin exposición a VHP no mostraron potencial oxidante.

A continuación, se determinó si el potencial oxidante medido (peróxido) en las películas se traducía en actividad biocida contra las bacterias.

Los cupones de película de PVP se prepararon secando una solución al 10% de 58K de PVP en agua o metanol y exponiendo la película a 400 ppm de VHP durante 30 minutos. Las películas de PVP-HP se prepararon curando una solución de PVP-HP y agua. Y se preparó una película de PVP sin inclusión de peróxido (un control). Las películas se expusieron a 20  $\mu$ l de un cultivo puro de una suspensión regulada de ATCC 6538 de *S. aureus*, una dilución del cultivo de 10 veces o una dilución del cultivo de 100 veces. El inóculo se añadió a t0, y los tiempos de contacto fueron 1, 2, 3, 4 y 5 horas (cultivo puro) o 6, 12, 18, 24 y 30 minutos para los cultivos diluidos. Se cubrieron todos los cupones para protegerlos del secado excesivo entre muestreos. Para neutralizar, los cupones se transfirieron a un vaso que contenía 10 mL de caldo LAT (1% v/v de catalasa), se agitaron brevemente, se sonicaron durante 5 minutos, se sometieron a vórtex otra vez durante 30 segundos y se tomaron muestras. Las diluciones se vertieron en placa con agar LAT y se incubaron durante 3 días a 37°C.

Los resultados se muestran en la Figura 6 y demostraron que las películas de PVP-HP moldeadas tratadas con peróxido de hidrógeno por dos métodos diferentes proporcionaron actividad biocida, mientras que las películas de PVP no tratadas con peróxido de hidrógeno no mostraron actividad microbiana.

Las pruebas microbiológicas de superficie (mQCT2) de 58K de PVP expuestas a muestras de VHP mostraron una reducción de 4 LOG (destrucción completa) contra *S. aureus* en 80 minutos, véase la Figura 7.

5 Los discos de películas de 58K de PVP secadas al 10% se expusieron a VHP y luego se pusieron a prueba con  $10^4$  CFU de esporas de *B. subtilis* 19659 administradas como una suspensión reguladora de 20  $\mu$ L. El inóculo se agregó a  $t_0$  y los tiempos de muestreo fueron 20, 40, 90, 150 y 300 minutos. Para neutralizar, los discos se transfirieron a tubos de cultivo de vidrio, se lavaron con 10 mL de caldo LAT (catalasa al 1% v/v), se sometieron a vórtex brevemente, se sonicaron durante 5 minutos, se volvieron a someter a vórtex brevemente y luego se tomaron muestras. Las diluciones se vertieron en placas con agar LAT y se incubaron durante 2 días a 37°C.

10 Los resultados se muestran en la Figura 8. Se produjo una eliminación de 4 logs de *B. Subtilis* (eliminación completa) en aproximadamente 5 horas o 300 minutos.

Inesperadamente, estos resultados establecieron que el tiempo de exterminio alcanzado para *S. aureus* anterior fue mucho más corto que para cualquier otra superficie/recubrimiento reactivo conocido. La eficacia esporicida de la invención alcanzada también fue bastante significativa y rara vez se cita en informes sobre superficies reactivas.

15 Ambos ejemplos 2 y 3, arriba, confirmaron que el peróxido de hidrógeno en las películas de PVP proporcionaba actividad antimicrobiana, mientras que las películas de PVP no tratadas con peróxido de hidrógeno no mostraron actividad antimicrobiana.

#### Ejemplo 4 - Efecto de la reticulación

20 Para proporcionar una superficie insoluble, el PVC se reticuló. Como se mencionó anteriormente, esto se puede lograr de muchas maneras, incluso con el uso de iniciadores y luz UV. Para este ejemplo, el método utilizado fue la luz UV; de particular interés fue UVC en el intervalo de 250-260 nm. Se indicó PVP con un alto peso molecular, 360K-1300K, en la bibliografía para producir las mejores propiedades reticuladas. Las pruebas confirmaron esto.

25 Se prepararon soluciones de un PVP al 10% (p/p) 1.300.000 K (1300K) mw con 20-50 mM de peróxido de hidrógeno agregado para catalizar la reacción de reticulación. Esta solución se aplicó a las superficies para la reticulación por volumen. Los ejemplos de superficies fueron: tabique recubierto de teflón de tapones de frascos de GC, paños y telas, superficies pintadas, incluido el CARC militar y el vidrio. El aparato UV tenía cuatro luces UV de 24W montadas en paralelo. La distancia desde las luces hasta la base en la que se colocan las muestras era de 5 cm. La densidad de energía en el intervalo de UVC era  $>100$  mJ/min, y el tiempo de exposición fue de dos horas.

30 El porcentaje de reticulación de las muestras se determinó sobre una base de peso. La PVP reticulada se hinchará cuando se exponga al agua, pero no se disolverá. Por lo tanto, las muestras se colocaron en agua durante 24-72 horas después de producirse la reticulación. Esto permitió que la PVP no reticulada entrara en solución mientras que la porción reticulada permanecía intacta. La muestra se filtró luego para capturar solo la porción reticulada, y se secó a 50°C durante 24 horas para eliminar toda la humedad. La diferencia en el peso del PVP utilizado para hacer la muestra y el peso del PVP reticulado proporcionaron una medida del porcentaje de PVP que se reticuló. Esto se denomina porcentaje de gel o porcentaje de reticulación en la bibliografía.

35 La captación de peróxido de hidrógeno por exposición al vapor (activación de la superficie, expresada como mg/cm<sup>2</sup>) fue la misma para muestras reticuladas o no reticuladas. Véase la Figura 9.

40 Las películas se moldearon en tapones de vial de Viton GC invertidos con un área de  $\sim 1,3$  cm<sup>2</sup>. Las muestras se prepararon con las siguientes composiciones: PVP reticulada de 1300K expuesta a VHP 400 ppm 30 minutos; PVP reticulada de 1300K; PVP no reticulada de 1300K expuesta a VHP 400 ppm 30 minutos; y PVP no reticulada de 1300K. Las muestras se expusieron a  $10^5$  CFU de ATCC 6538 de *S. aureus* suministradas como suspensión regulada.

45 La actividad se evaluó de dos maneras: 1) se añadió inóculo líquido a  $t_0$ , los tiempos de contacto fueron 10, 20, 40, 80 y 160 minutos, y 2) se agregó inóculo líquido a  $t_0$  y los tiempos de contacto fueron cada 2.5 minutos de 40 a 87.5 minutos. Para neutralizar, las muestras se transfirieron a tubos de cultivo de vidrio llenos con 10 mL de caldo LAT (1% v/v de catalasa), se sometieron a vórtex brevemente, se sonicaron durante 5 minutos, se sometieron a vórtex brevemente otra vez y luego se tomaron muestras. Las diluciones se vertieron en placas con agar LAT y se incubaron durante 1 día a 37°C y 1 día a 30°C.

50 Los resultados se muestran en la Figura 10. La película reticulada demostró ser eficaz con un rendimiento equivalente (en esta escala de tiempo) a un control no reticulado. Se predijo que la película de PVP insoluble reticulada de 1300K expuesta a VHP inactivaría la exposición en 80,34 minutos. Se predijo que la película de PVP no reticulada expuesta a VHP alcanzaría la destrucción completa en 77,12 minutos. En la práctica, esta prueba no mostró diferencias entre los dos tipos de superficies (reticuladas y no reticuladas) y su capacidad para reaccionar e inactivar ATCC 6538 de *S. aureus*. El tiempo de eliminación alcanzado para *S. aureus* es mucho más corto que cualquier otra superficie/recubrimiento reactivo conocidos.

55 **Ejemplo 5 - Actividad de películas de PVP-HP reticuladas contra esporas**

Para determinar si las películas de PVP-HP conservan sus características biocidas a lo largo del tiempo, las películas de PVP reticuladas de 1300 K se expusieron a VHP y luego se evaluó su actividad esporicida.

5 Se realizó una QCT2 modificada, confrontando a 1300K de PVP reticulada expuesta a VHP con  $10^{6,0}$ ,  $10^{5,5}$ ,  $10^{5,0}$ ,  $10^{4,5}$  y  $10^{4,0}$  CFU de esporas de *B. subtilis* 19659 suministradas como 20  $\mu$ L de suspensión reguladora. Las películas se prepararon en cápsulas de vial de Viton GC invertidas y se midieron en un área de  $\sim 1,3$  cm<sup>2</sup>. La actividad se evaluó de dos maneras: 1) el inóculo se agregó a  $t_0$  y los tiempos de contacto fueron 20, 40, 90, 150 y 300 minutos y 2) el inóculo se agregó a  $t_0$  y los tiempos de contacto fueron 15, 30 y 45 minutos y cada hora desde 1 a 12 horas. Para neutralizar, los tapones se transfirieron a tubos de cultivo de vidrio llenos con 10 mL de caldo LAT (1% v/v de catalasa) de una jeringa, se sometieron a vórtex brevemente, se sonicaron durante 5 minutos, se volvieron a someter a vórtex brevemente y luego se tomaron muestras. Las diluciones se vertieron en placa con agar LAT y se incubaron durante 2 días a 30°C.

15 Los resultados (Figura 11) mostraron que los cinco niveles de exposición de esporas, analizados en dos ocasiones diferentes, se inactivaron entre 6 y 7 horas, con un tiempo de activación promedio estimado de 6 horas y 40 minutos (según lo evaluado por GlnaFIT, una herramienta gratuita útil para evaluar curvas de supervivencia microbiana no log lineales). Estos datos indicaron que la PVP reticulada tratada con VHP es muy activa como esporicida.

**Ejemplo 6 - Actividad de PVP-HP reticulada contra especies relevantes militares y sanitarias formadoras de esporas y no esporas**

Debido al éxito logrado con *S. aureus* y *B. subtilis*, se probaron diversos organismos microbiológicos contra la película de PVP de 1300 K reticulada con UV con un tiempo de exposición de 30 minutos a 400 ppm de VHP.

20 La PVP reticulada de 1300K se expuso a VHP y luego se estimuló con 20  $\mu$ L de varios inóculos dirigidos a  $10^5$  CFU. Las especies formadoras de esporas se resuspendieron y se diluyeron en regulador. Los organismos vegetativos se resuspendieron y se diluyeron en regulador de peptona al 0,1%. Las películas se prepararon en cápsulas de viales de Viton GC invertidas y se midieron en un área de  $\sim 1,3$  cm<sup>2</sup>. El inóculo se añadió a  $t_0$ . Los tiempos de contacto fueron de 30, 60 y 90 minutos para los organismos vegetativos y de 3, 6 y 9 horas para los organismos formadores de esporas. Para neutralizar, los tapones se transfirieron a tubos de cultivo de vidrio llenos con 10 ml de caldo LAT (catalasa al 1% v/v), se sometieron a vórtex brevemente, se sonicaron durante 5 minutos, se sometieron a vórtex otra vez brevemente y luego se tomaron muestras. Las diluciones se vertieron en placas con agar LAT, SDA o RCM, según corresponda, y se incubaron durante 2 días a 37°C o 30°C según corresponda.

30 Los datos establecidos en la Tabla 2 a continuación muestran los organismos analizados y los resultados obtenidos. Los datos demostraron que PVP reticulada de 1300K proporcionaban una excelente capacidad de amplio espectro contra las especies vegetativas (no formadoras de esporas) y formadoras de esporas. La mayor reducción logarítmica no siempre estuvo en el tiempo de contacto más largo porque varios organismos perdieron viabilidad durante el transcurso del experimento, que en la tabla aparecen como valores de reducción LOG que disminuyen con el tiempo.

35 Tabla 2: Eficacia de amplio espectro de PVP reticulada de 1300K expuesta a peróxido de hidrógeno vaporoso

OD	Organismo (Vegetative)	%Red	LRed	%Red	Log R	%Red	LogR
		30 min.		60 min.		90 min.	
0.992	<i>S. choleraesius</i> 10708	99,9993*	5,13*	99,9980	4,71	99,9993	5,18
0.998	<i>A. baumannii</i> 19606	99,9992*	5,11*	99,9989	4,96	99,9974	4,58
1.030	<i>K. pneumophila</i> 4352	99,9990*	5*	99,9979	4,67	99,9979	4,69
1.050	<i>P. aeruginosa</i> 9027	99,9981*	4,73	99,9953	4,33	99,9833	3,78
0.000	<i>B. cepacia</i> 35254	99,9820	3,74	93,0664	1,16	<99	<2
1.050	<i>K. oxytoca</i> 8724	99,9816	3,73	99,9690	3,51	99,9245	3,12
1.017	<i>L. monocytogenes</i> 35152	<99	<2	99,9988*	4,93	99,9987	4,89
1.081	ESBL <i>E. coli</i> BAA 196	<99	<2	99,9984*	4,79*	99,9981	4,72
1.011	<i>Y. enterocolitica</i> 9601	99,9740	3,59	99,9982*	4,74*	99,9976	4,61
1.050	<i>E. coli</i> 0157:H7	<99	<2	99,9992	5,09	99,9998*	5,75*
1.090	Ca <i>MRSA</i> USA 300	99	<2	99,9938	4,21	99,9993*	5,13*

xxxx	<i>S. aureus</i> 6538	<99	<2	<99	<2	99,9990*	5*
0.983	<i>MRSa</i> 33591	99,5359	2,33	99,6154	2,42	99,9985*	4,82*
1.060	<i>VISA CV</i> 482	<99	<2	99,4661	2,27	99,9808*	3,72*
1.060	<i>C. albicans</i> 10231	90,2446	1,01	99,9271	3,14	99,9713*	3,54*
OD	ORGANISMO (formador de esporas)	3 horas		6 horas		9 horas	
0.066	<i>B. cereus</i> 14579	99,9981*	4,71*	99,7688	2,64	99,9951	4,31
0.014	<i>B. sphericus</i> 14577	99,9945*	4,26*	99,9713	3,54	99,9693	3,51
0.080	<i>S. chartarum</i> 16275	99,8194*	2,74*	99,0894	2,04	98,3928	1,79
0.022	<i>A. niger</i> 16404	99,5626*	2,36*	98,9817	1,99	97,4302	1,59
0.640	<i>B. megaterium</i> 14581	<99	?2	99,9975*	4,6*	99,9939	4,21
0.300	<i>C. difficile</i>	99,9607	3,41	99,9920*	4,1*	99,9446	3,26
0.247	<i>G. stearothermophilus</i> 7953	<99	<2	99,9842*	3,8*	99,8153	2,73
xxxx	<i>B. subtilis</i> 19659	<99	<2	99,9224	3,11	99,9985*	4,8*
* indica exterminio completo en este punto temporal % Red = % de reducción LogR = reducción logarítmica							

#### Ejemplo 7 Eficacia contra el agente biológico de guerra en vivo

5 Las superficies duraderas de PVP-HP con actividad antimicrobiana demostraron ser efectivas contra una variedad de bacterias que no forman esporas y que forman esporas. En este ejemplo, la película de PVP-HP fue expuesta al agente biológico de guerra en vivo *Bacillus anthracis* (cepa Ames).

10 Las películas expuestas o no expuestas a VHP se expusieron a  $10^5$  CFU de *B. anthracis* (cepa de Ames) como 20  $\mu$ L de suspensión reguladora. Las películas se prepararon en cápsulas de vial de Viton GC invertidas y se midieron en un área de  $\sim 1,3$  cm<sup>2</sup>. El inóculo se añadió a to. Los tiempos de contacto fueron 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360 y 420 minutos. Para neutralizar, los cupones se transfirieron a tubos de cultivo de vidrio llenos con 10 ml de caldo LAT (1% v/v de catalasa), se sometieron a vórtex brevemente, se sonicaron durante 5 minutos, se volvieron a someter a vórtex brevemente de nuevo y luego se tomaron muestras.

Los resultados reflejados en la Figura 12 mostraron que las esporas del agente biológico de guerra vivo *B. anthracis* (cepa de Ames) fueron una confrontación menos estricta que las esporas de *B. subtilis* ATCC 19589 en sustitución. PVP de 1300K inactivó completamente  $10^5$  esporas de *B. anthracis* (Ames) en 2 y 3/4 horas.

#### 15 Ejemplo 8 - Potencial oxidante de PVP reticulado en superficies militares después de la exposición a VHP

Se desarrolló una metodología para reticular PVP directamente sobre superficies militares relevantes. Las películas de PVP reticuladas insolubles en superficies militares demostraron ser biológicamente activas, con un potencial de oxidación consistente con los valores observados previamente con películas de laboratorio (Ejemplo 4).

20 Se llevó a cabo un estudio sobre PVP reticulada de 1300K en una variedad de superficies para evaluar la consistencia del potencial oxidante en una variedad de superficies. Las películas se crearon utilizando 1300K PVP y el método de reticulación UV descrito anteriormente (Ejemplo 4). Las muestras se expusieron a 400 ppm de VHP durante 30 minutos. Los tapones GC y los paneles de CARC se expusieron en un lado. Las toallitas de poliéster se pincharon y se expusieron a VHP en ambos lados. El nivel de oxidante se determinó utilizando una titulación de tiosulfato. Las toallitas tenían el doble del área de superficie expuesta al VHP y esto se tuvo en cuenta en el cálculo del área de superficie.

25 Los resultados que se muestran en la Figura 13 reflejan que el potencial de oxidante después de la exposición a un ciclo de VHP es consistente en todas las superficies militares relevantes probadas. La mayoría de las exposiciones de PVP a VHP dieron como resultado 0,4-0,6 mg/cm<sup>2</sup> de peróxido de hidrógeno.

#### Ejemplo 9 - Eficacia de las películas de PVP/HP incorporadas en una superficie militar a través de

**reticulación**

Se demostró que las películas de PVP-HP reticuladas son un recubrimiento insoluble en agua que proporciona una alta eficacia de descontaminación contra una variedad de confrontaciones microbianas formadoras de esporas y no formadoras de esporas, incluido el agente biológico de guerra vivo *B. anthracis* (cepa Ames) (Ejemplo 7). Se desarrolló una metodología para reticular PVP directamente sobre superficies. En este ejemplo, se evaluó la capacidad de PVP reticulada sobre la superficie de un panel de aluminio pintado con CARC (recubrimiento resistente a agentes químicos) para inactivar ATCC 6538 de *S. aureus*.

La PVP reticulada de 1300K se preparó en paneles de aluminio pintados de CARC y se expuso a VHP. Los paneles fueron expuestos a  $10^5$  CFU de ATCC 6538 de *S. aureus* suministrados como 20  $\mu$ L de suspensión. Las películas miden  $\sim 19,6$  cm<sup>2</sup> de área. Cada cupón se colocó en una taza estéril de 250 ml y se añadió inóculo a  $t_0$ . Los tiempos de contacto fueron 7, 15, 24, 34, 45, 57, 70 y 84 minutos. Para neutralizar, cada cupón se lavó con 20 mL de caldo LAT (catalasa al 1% v/v). La taza que contenía el cupón y el neutralizador se agitó brevemente y se cubrió con parafilm. Las tazas cubiertas se sonicaron durante cinco minutos, se sometieron a vórtex brevemente y luego se tomaron muestras. Las tazas que no pudieron ser sonicadas inmediatamente se mantuvieron a 4°C. Las diluciones se colocaron en placa con agar LAT y se incubaron durante 2 días a 37°C.

La Figura 14 refleja los datos obtenidos. La inactivación completa de  $10^5$  ATCC 6538 de *S. aureus* se observó antes de 60 minutos de contacto con la película de PVP incorporada en el panel pintado con CARC, que es 20 minutos más corta que la inactivación lograda con el recubrimiento en los tapones de los viales de GC. Estos datos proporcionan una sólida evidencia de la capacidad de incorporación directa de PVP en superficies militares relevantes mediante reticulación.

**Ejemplo 10 - Eficacia contra esporas de *B. subtilis* de PVP reticuladas en una superficie de CARC.**

En este ejemplo, se evaluó la capacidad de PVP reticulada sobre la superficie de los paneles de aluminio pintados de CARC para inactivar las esporas de ATCC 19659 de *B. subtilis*. La PVP reticulada de 1300K se preparó sobre paneles de aluminio pintados con CARC y se expuso al VHP. Luego, los paneles se expusieron a  $10^5$  CFU de esporas de ATCC 19659 de *B. subtilis* suministradas como 20  $\mu$ L de suspensión. Las películas miden  $\sim 19,6$  cm<sup>2</sup> de área. Cada cupón se colocó en una taza estéril de 250 ml y se añadió inóculo a  $t_0$ . Los tiempos de contacto fueron 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos. Para neutralizar, cada cupón se lavó en su taza con 20 mL de caldo LAT (catalasa al 1%). La taza que contenía el cupón y el neutralizador se agitó brevemente y se cubrió con parafilm. Las tazas cubiertas se sonicaron durante cinco minutos, se sometieron a vórtex brevemente y luego se tomaron muestras. Las tazas que no pudieron ser sonicadas inmediatamente se mantuvieron a 4°C. Las diluciones se colocaron en placa con agar LAT y se incubaron durante 2 días a 37°C.

Los resultados alcanzados se muestran en la Figura 15. Según los datos, se predice que la inactivación de  $10^5$  esporas de ATCC 19659 de *B. subtilis* ocurrirá alrededor de 7 horas y media, que es 1 hora y media más de lo previsto para el mismo recubrimiento preparado en viales de GC de  $\sim 1,3$  cm<sup>2</sup>. Estos datos proporcionaron evidencia adicional de que la incorporación directa de PVP a superficies militares relevantes a través de la reticulación proporcionaría actividad microbicida.

**Ejemplo 11 - Eficacia contra *B. anthracis* (Ames) de PVP reticulada en una superficie de CARC.**

Siguiendo con el ejemplo 7 anterior, este ejemplo evaluó la capacidad de dos combinaciones de película/sustrato para inactivar las esporas del agente biológico de guerra vivo *Bacillus anthracis* (Ames). Se evaluó la PVP reticulada sobre la superficie de los paneles de aluminio pintados de CARC y la PVP reticulada sobre la superficie de un sustrato de toallita.

PVP reticuladas de 1300K en paneles de CARC o sustrato de limpieza, y expuestas o no expuestas a VHP se expusieron a  $10^5$  CFU de *B. anthracis* (cepa Ames) como 20  $\mu$ L de suspensión reguladora. El inóculo se añadió a  $t_0$ . Los tiempos de contacto fueron 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360 y 420 minutos. Para neutralizar, los cupones se transfirieron a tubos de cultivo de vidrio llenos con 10 ml de caldo LAT (catalasa al 1% v/v), se agitaron brevemente, se sonicaron durante 6 minutos, se sometieron a vórtex brevemente de nuevo y luego se tomaron muestras.

Los resultados se muestran en la Figura 16. Los datos indican que la inactivación completa de  $10^5$  CFU de las esporas de *B. anthracis* (cepa Ames) requirió menos de 90 minutos. Como se vio en la evaluación de la PVP reticulada en los tapones de los viales de GC (Ejemplo 7), las esporas de *B. anthracis* (cepa Ames) demostraron ser una confrontación mucho menos rigurosa que las esporas de ATCC 19659 de *B. subtilis*, proporcionando de nuevo pruebas sólidas de la tenacidad de la incorporación directa de PVP en superficies militares mediante reticulación.

**Ejemplos 12-13 - Películas extrudidas LDPE/PVP**

El objetivo de los Ejemplos 12-13, a continuación, era evaluar la idoneidad y durabilidad de las películas extrudidas de LDPE/PVP y probar su capacidad para absorber el peróxido. Se establece una comparación de la absorción de peróxido de películas de extrusión seleccionadas con PVP reticulada.

**Ejemplo 12 - Comparación de diferentes películas extrudidas**

Se realizó una comparación entre tres métodos de producción diferentes para la formación de películas de LDPE/PVP por extrusión. Las películas de una pulgada se prepararon en un sistema en escala de laboratorio. Las tiras de cuatro pulgadas de ancho se prepararon en equipos de escala piloto. Un conjunto de muestras se preparó mezclando en seco ambos componentes. Las muestras del lote maestro se prepararon a partir de una premezcla de LDPE/PVP 60/40 granulado.

Se realizó una comparación con los niveles de oxidación alcanzados con otros sistemas no solubles. En este ejemplo, el sistema reticulado se utilizó para la comparación. Estudios adicionales mostraron que el peso molecular de la PVP utilizada para la extrusión no cambió las propiedades de absorción.

Las películas de PVP se prepararon como se describió anteriormente y se expusieron a un ciclo de descontaminación de VHP de 400 ppm y 30 minutos. Se expuso un lado de las películas de PVP reticuladas y no reticuladas. Las películas de LDPE/PVP se expusieron a VHP en dos lados. El oxidante total se determinó mediante titulación. Todos los valores de concentración se reportan en base al área de superficie.

Los resultados se muestran en la Figura 17 y muestran que el sistema LDPE/PVP tenía un potencial oxidante total mucho más bajo que los sistemas de solo PVP. Los valores no se normalizaron para tener en cuenta la diferencia en la concentración de PVP, ya que la evaluación fue para los sistemas no solubles en su forma diseñada. También se vio que el proceso por el cual se prepararon las películas tuvo poco efecto sobre la cantidad de peróxido de hidrógeno absorbido a través de este proceso. A pesar de que los valores para el oxidante total eran bajos, las muestras se analizaron para determinar la actividad antimicrobiana como se establece en el Ejemplo 13.

**Ejemplo 13 - Tinción de Gram y examen microscópico de películas de PVP/LDPE.**

Se exploró la dispersión de la PVP en la película de LDPE para intentar descubrir las razones por las que no se logró una excelente actividad bactericida con estas muestras.

Una sección de la película de mezcla maestra LDPE/PVP 80/20 se tiñó inundando con cristal violeta durante 1 minuto, seguido de un suave enjuague con agua DI, inundando con yodo de Gram durante 1 minuto, seguido de un suave enjuague con agua DI, la adición gota a gota de agente de limpieza seguido por un suave enjuague con agua DI, la inundación con cristal violeta seguido por un suave enjuague con agua DI, y finalmente se transfiere a papel bilioso. La película teñida y el control sin teñir se vieron usando un microscopio invertido NIKON Ti-Eclipse usando iluminación de campo luminoso y usando iluminación de fluorescencia de campo amplio con conjuntos de filtros de emisión/excitación TEXAS RED y FITC. Las imágenes fueron capturadas utilizando elementos Nikon. Las imágenes de campo luminoso fueron tomadas con 2 ms de exposición. Se tomaron imágenes de fluorescencia con 80 ms de exposición. Las imágenes de bajo aumento fueron capturadas usando la cámara de un teléfono Droid 2 a través de un microscopio estereó.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18. Los complejos de PVP y yodo se usan a menudo como una preparación antimicrobiana. La tinción de la película prototipo con yodo de Gram indicó la dispersión de PVP en la película y, en consecuencia, reveló que la mayoría de la PVP estaba enterrada en la película y no estaba disponible para la tinción. Se pensó que la PVP tampoco estaba disponible para la captación de VHP y para el contacto con esporas y bacterias.

El yodo de Gram también tiene una fuerte fluorescencia bajo TEXAS RED ex/em, pero no bajo FITC ex/em. El propio PVP se autofluorescencia en FITC, de modo que todo el PVP se pueda ver en la muestra. Combinando estas dos señales, es posible que el contenido total de PVP de la película y la porción del contenido disponible para la superficie de la película puedan determinarse y proporcionar una herramienta valiosa para la optimización de la película.

**Ejemplo 14 - Evaluación de tipos de superficie**

Una superficie reactiva puede activarse de dos maneras. Una forma es incorporar simultáneamente el activador y el receptor en la superficie. El otro es un proceso de dos etapas en el que el receptor se integra en la superficie y luego se aplica el activador. Ambos enfoques fueron evaluados. Se lograron mejores resultados utilizando el segundo método, donde el activador se agregó como una etapa secundaria, ya que este concentró efectivamente el agente activo en la superficie para permitir mejores interacciones con los contaminantes.

Las películas (tapones de GC y paneles de CARC) de PVP reticulada de 1300K se expusieron a un ciclo de descontaminación de VHP de 400 ppm y 30 minutos y se titularon para determinar la concentración total de oxidante (peróxido). Las toallitas de poliéster (con 1300K PVP reticulado) se pincharon y se expusieron en ambos lados a VHP de la misma manera. El cálculo de la concentración se informa en mg/cm<sup>2</sup> para tener en cuenta la diferencia en las áreas de exposición.

La Figura 19 muestra que, independientemente del tipo de superficie, la absorción del peróxido de hidrógeno por la PVP reticulada fue bastante uniforme. En promedio, una exposición de la PVP a VHP dio como resultado una

concentración de 0,4-0,6 mg/cm<sup>2</sup> de peróxido de hidrógeno.

#### Ejemplo 15 – Vida útil

Para evaluar la vida útil de las películas de PVP-HP reticuladas, se evaluaron las actividades esporicidas y microcidas de las películas de PVP reticuladas de 1300 K expuestas a VHP entre un día y una semana antes de ser desafiadas.

La PVP reticulada de 1300K expuesta a VHP se estimuló con 10<sup>5</sup> CFU de las esporas ATCC 6538 y ATCC 19659 de *B. subtilis* de *S. aureus*, ambas suministradas como 20 µL de suspensión reguladora. Las películas se prepararon en tapones de vial de viton GC invertidas y se midieron con un área de ~1,3 cm<sup>2</sup>. Se prepararon suficientes tapones para ejecutar 3 iteraciones de la prueba. Los tapones se expusieron a VHP un día antes de la primera prueba, y las pruebas comenzaron 1,4 y 7 días después de la exposición a VHP. En todos los casos, el inóculo se añadió a to, los tiempos de contacto fueron 20, 40, 90, 180 y 360 minutos. Para neutralizar, los tapones se transfirieron a tubos de cultivo de vidrio llenos con 10 mL de caldo LAT (catalasa al 1% v/v), se sometieron a vórtex brevemente, se sonicaron durante 5 minutos, se volvieron a someter a vórtex brevemente nuevamente y luego se tomaron muestras. Las diluciones se vertieron en placa con agar LAT y se incubaron durante 2 días a 37°C.

Los resultados en la Figura 20 mostraron que, en el lapso de una semana, la actividad esporicida de todas las películas solo disminuyó ligeramente, a pesar de perder más de la mitad de su contenido de peróxido. Esto indica que se puede perder una buena cantidad de peróxido de la superficie del recubrimiento de PVP mientras permanece eficaz contra los microorganismos.

#### Ejemplo 16 - Capacidad de regeneración y eficacia

Se realizaron estudios para observar las capacidades de regeneración y la eficacia microbiológica asociada con el agente activo, en este caso, el peróxido de hidrógeno. Se expusieron muestras de PVP reticuladas de 1300K en tapones de viales de GC recubiertos con teflón a 400 ppm de VHP durante 30 minutos. Los valores típicos para el peróxido de hidrógeno después de la exposición a un ciclo de 400 ppm durante 30 minutos son 0,4-0,6 mg/cm<sup>2</sup>. La Figura 21 muestra la tasa de descomposición del peróxido de hidrógeno durante los primeros 7 días. Después de 7 días, las películas se expusieron nuevamente a 400 ppm de VHP durante 30 minutos, agregando 0,5 mg/cm<sup>2</sup> adicionales de peróxido a los 0,3 mg/cm<sup>2</sup> que aún permanecen después de 7 días. Las muestras continuaron siendo monitoreadas durante dos semanas y media adicionales. Las muestras se almacenaron expuestas al aire en un cajón de laboratorio. La cantidad de oxidante total se midió por titulación con tiosulfato en los tiempos identificados en la Figura 21. Cada valor reportado fue el promedio de cinco tapones.

Los resultados muestran que la tasa de descomposición del peróxido de hidrógeno es la misma después de la segunda exposición a VHP que después de la primera exposición. Esto indica la capacidad de regenerar la superficie al volver a exponerse a VHP, sin afectar el perfil activo.

Las pruebas microbiológicas también se realizaron junto con la tasa de descomposición del agente activo. Las pruebas se realizaron tanto con *S. aureus* (ver Figura 22) como con *B. subtilis* (ver Figura 23). Mientras que la concentración activa disminuyó durante las semanas monitoreadas, esto tuvo poco efecto en el tiempo para lograr la destrucción completa, es decir, una reducción de 5 o 6 log de los organismos analizados. Incluso a una concentración de peróxido de hidrógeno de 0,03 mg/cm<sup>2</sup>, el tiempo requerido para matar las esporas de *B. subtilis* fue de 13 horas. Este es un tiempo de reacción significativamente menor que los días requeridos para otras superficies reactivas.

#### Ejemplo 17 - Incremento de la saturación de VHP

Se lograron resultados consistentes con el ciclo de descontaminación VHP de 400 ppm y 30 minutos. Aun así, se pensó que había espacio para aumentar la concentración inicial del oxidante en la superficie. Se usaron dos pruebas para probar y determinar la concentración máxima de hidrógeno que el recubrimiento podría sostener. Una prueba examinó el uso del ciclo de 400 ppm con un mayor tiempo de exposición; la otra prueba consideró aumentar la concentración de exposición de VHP a 1000 ppm.

Las películas no reticuladas se prepararon utilizando PVP de 1300K en tapones de viales de GC. Las películas se expusieron luego a un ciclo de descontaminación VHP de 400 ppm o 1000 ppm durante 2, 4 o 6 horas. Todas las películas se expusieron a la fase de acondicionamiento y luego se recuperaron después del tiempo apropiado de descontaminación. Las películas se midieron para determinar el oxidante total utilizando una titulación de tiosulfato. Todos los valores fueron reportados por área de superficie de exposición.

La Figura 24 muestra los niveles de capacidad de peróxido de películas de PVP de 1300K después de una exposición prolongada y alta a VHP. Los niveles de peróxido de hidrógeno continuaron aumentando a un ritmo constante para los niveles de 400 ppm y 1000 ppm durante las 6 horas completas. Parecía que incluso en una fase de descontaminación de 6 horas a 1000 ppm, las películas de PVP aún podían absorber más peróxido. Este resultado indica la posibilidad de que se carguen niveles significativamente más altos de peróxido en el sistema y se podría utilizar para modificar el nivel de peróxido para diferentes aplicaciones de la tecnología. El nivel de carga

ofrece la posibilidad de que el nivel de activación de las superficies se adapte a diferentes amenazas, incluidos ciertos agentes químicos. Si bien la eficacia química no se detectó en el trabajo de RMN al nivel de 0,5 mg/cm<sup>2</sup>, las concentraciones más altas de peróxido pueden ofrecer mejores resultados.

#### **Ejemplo 18 - Activación a través de peróxido de hidrógeno líquido**

5 Se realizaron pruebas para evaluar el impacto de la activación de las películas por exposición a peróxido de hidrógeno vaporoso o líquido. Una aplicación líquida proporcionaría una solución para la descontaminación o activación por puntos rociando en lugar de sellar un área completa para la exposición a VHP y podría resultar en un nivel de activación más rápido y más alto. Puede haber compensaciones, como la mano de obra requerida para la aplicación, la seguridad y la capacidad de alcanzar todas las superficies. Aun así, la capacidad de utilizar uno o  
10 ambos métodos de activación brindaría flexibilidad al usuario para satisfacer mejor sus necesidades inmediatas.

Las películas de LDPE/PVP se seleccionaron para comparar los dos métodos de activación, ya que tenían la menor absorción de peróxido de hidrógeno para los ciclos de VHP y no mostraban los mismos problemas de hinchamiento o solubilidad observados cuando los líquidos se aplicaban a películas de PVP reticuladas o no reticuladas.

15 Las muestras de película de LDPE/PVP se expusieron a un ciclo de descontaminación VHP de 400 ppm a 30 minutos o se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno al 7% durante 1,5 o 10 minutos, luego se enjuagaron con agua milli-Q y se dejaron secar antes de las pruebas. La concentración de peróxido de hidrógeno se calculó por unidad de área y se probó utilizando un método de titulación del tiosulfato de oxidante total.

20 La Figura 25 muestra los resultados de las pruebas logradas. Los resultados indican que una inmersión de 1 minuto de la película 60LDPE/40PVP proporcionó un nivel de peróxido de hidrógeno cercano al de las muestras expuestas a VHP. Además, el tiempo adicional a los 5 y 10 minutos proporciona niveles crecientes de peróxido de hidrógeno, siendo las muestras de 10 minutos equivalentes a los niveles observados en la PVP reticulada después de la exposición a un ciclo típico de VHP. Tener en cuenta que las concentraciones más bajas de PVP incorporadas en LDPE dieron valores más bajos de absorción de peróxido (datos no mostrados).

25 Este ejemplo muestra que tanto el peróxido líquido como el VHP son técnicas de activación viables para la tecnología de la invención. Si bien la aplicación de líquido pareció proporcionar inicialmente un nivel más alto de activo en el recubrimiento, también se pueden lograr resultados similares al alterar el tiempo de exposición y la concentración del ciclo de VHP. La aplicación de un líquido a un recubrimiento a base de PVP, que no está reticulado o formulado de otra manera para limitar la solubilidad, daría lugar a la eliminación del recubrimiento y, por lo tanto, podría ser desventajoso. Además, la aplicación de una gran cantidad de líquido a las superficies de PVP  
30 reticuladas induce hinchazón, otro resultado indeseable. Aun así, ambas técnicas ofrecen flexibilidad para las opciones de activación para el usuario.

#### **Ejemplo 19 - Evaluación de seguridad**

35 La química de las composiciones de la invención tiene un buen perfil de seguridad. La PVP y el peróxido de hidrógeno son comúnmente conocidos por su uso en aplicaciones humanas y están muy bien caracterizados por un largo historial de uso. El peróxido de hidrógeno se usa comúnmente en una solución al 3% para la desinfección de heridas, pero tiene el potencial de generar lesiones cuando se usa en >10%. OSHA también tiene pautas para la exposición a los vapores de peróxido de hidrógeno, que incluyen un límite de exposición permisible para VHP de una parte por millón (promedio ponderado de tiempo de más de 8 horas). Por este motivo, se realizó una evaluación de seguridad para predecir la cantidad de VHP que podría encontrarse en una habitación típica si los recubrimientos de  
40 la invención se aplicaran a las paredes y techos y luego se activaran.

Se recubrió un portaobjetos de vidrio de 8 pulgadas x 8 pulgadas utilizando una solución de PVP de 1300 K al 10% en metanol y se dejó secar. El recubrimiento se activó luego por exposición a un ciclo de VHP de 400 ppm y 30 minutos y se colocó en una cámara con un volumen de ~20 litros. La concentración de peróxido de hidrógeno en el tamaño del espacio superior se midió utilizando un monitor Draeger a intervalos determinados. Estas  
45 concentraciones luego se convirtieron en una concentración hipotética para una sala de 18,8 pies x 14,8 pies x 9 pies en la que las cuatro paredes y el techo serían revestidos y activados. El cálculo se basó en "sin ventilación de la habitación" y, por lo tanto, presenta el caso conservador.

Los resultados se muestran en la Tabla 3. Los resultados proporcionaron una indicación temprana de que si se aplicara un sistema compuesto de PVP a las paredes de una habitación y si el nivel de activación con peróxido de hidrógeno era de 0,4-0,6 mg/cm<sup>2</sup>, la desgasificación de peróxido de hidrógeno en una habitación sin ventilación no sería excesivamente alto. Si bien este ejemplo es una aproximación, la adición de una ventilación aún menor en la habitación prevendría razonablemente la acumulación de vapores peligrosos.  
50

Tabla 3: Concentración de VHP ambiental de desgasificación a lo largo del tiempo

Tiempo de desgasificación	Concentración ambiente de VHP (ppm) (* = calculada)
2 horas	0,287
4 horas	0,430
24 horas	0,717
48 horas*	0,839*
72 horas (3 días)*	0,909*
96 horas (4 días)*	0,958*
120 horas (5 días)*	0,996*

Por consiguiente, se concluyó que una superficie reactiva activada de la presente invención se aplicó a las paredes de una habitación estándar, los niveles de VHP en la habitación no excederían el límite de OSHA.

#### 5 **Ejemplo 20 - Interacciones biológicas con la película reticulada de PVP con exposición a peróxido de hidrógeno vaporoso**

Las superficies de las películas de la invención son altamente higroscópicas. Cuando un organismo entró en contacto con la superficie, la humedad que rodeaba al organismo se puso en contacto con la superficie proporcionando dos resultados significativos. La primera fue que el organismo se puso en contacto cercano con el agente activo, mejorando así la eficacia de la superficie. En segundo lugar, la superficie se agitó esencialmente por el movimiento de agua dentro de la película, minimizando así el impacto de la humedad de los contaminantes de la superficie en el proceso.

Se realizó una comparación utilizando el tejido TRIOSYN. En el tejido recubierto con TRIOSYN, el agente activo se observó como partículas discretas de material unidas a las fibras del tejido de sustrato hidrófobo. Cuando se aplicó el inóculo, las células de *S. aureus* eran claramente visibles y tenían un movimiento de vibración normal en una única ubicación y ningún movimiento general hacia el ingrediente activo.

Dos observaciones significativas fueron evidentes. Primero, la superficie de la película era muy uniforme. Apareció por observación que el polímero estaba distribuido muy uniformemente y el agente activo, aunque no era visible, estaba distribuido uniforme y microscópicamente a través de la superficie de la película. En segundo lugar, hubo una cantidad extremadamente alta de movimiento de las células de *S. aureus* en la superficie de la película. El inóculo parecía estar fluyendo a una velocidad bastante alta a medida que la superficie absorbía la humedad y, junto con ella, las células.

Después de la inoculación, parecía que la superficie fluía como un río que lleva las células con un patrón de agitación. Si bien no desea estar limitado por la teoría, se postula que este movimiento de agitación, junto con la uniformidad del agente activo en la superficie, mejoró significativamente la eficacia del sistema y ayudó a lograr el aumento sinérgico de la eficacia al mismo tiempo que resiste la contaminación por carga orgánica.

#### **Ejemplo 21 - Efecto de la carga orgánica**

La preocupación por la contaminación de la superficie provocó una mirada al efecto de la carga orgánica en la reactividad de la superficie. El nivel elegido fueron 0,5 g/ml de BSA (albúmina de suero bovino). 20 µL de esta solución se aplicaron a una superficie de película activada y se dejaron secar para simular la acumulación de material orgánico en la superficie a lo largo del tiempo. Luego se probó la superficie de la misma manera que todas las demás superficies. Los datos de la Figura 26 muestran que este nivel de carga orgánica no tuvo impacto en la reactividad de la superficie contra *S. aureus* en comparación con la misma superficie activada sin carga orgánica.

#### **Ejemplo 22 - Pruebas de superficies relevantes**

En los ejemplos anteriores, las soluciones reactivas de PVP/HP se aplicaron a muchas superficies, a modo de ejemplo, pero no se limitaron a superficies relevantes para uso militar y sanitario, como materiales de tiendas de campaña, telas de uniformes y superficies pintadas (incluida la pintura de CARC (revestimiento resistente a agentes químicos) relevante para uso militar). Todas las superficies probadas se comportaron de manera similar en su aceptación del activador de peróxido de hidrógeno y en la eficacia microbiológica.

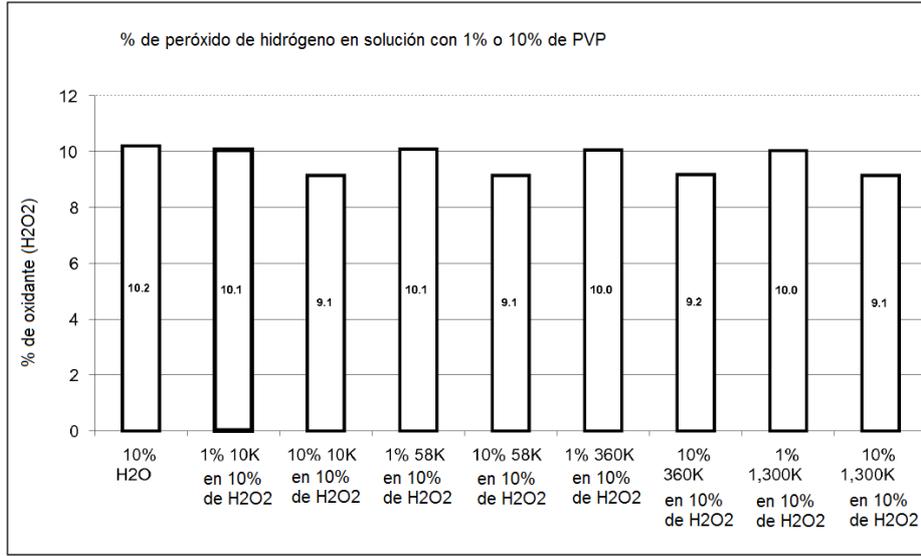
#### 40 **Ejemplo 23 (no de acuerdo con la invención) - polivinilpirrolidona (PVP) con peróxidos sólidos**

5 Los aditivos sólidos, por ejemplo, el peróxido de calcio y el peróxido de magnesio, se combinaron con soluciones de PVP de 58K y se usaron para hacer películas. Estas películas contienen aproximadamente un 3% de peróxido en peso. Véase la Figura 27. Pruebas microbiológicas con *S. aureus* aplicadas a la superficie lograron una reducción de cuatro registros en 300 minutos con peróxido de magnesio. El peróxido de calcio logró una reducción de dos registros en el mismo período de tiempo. Véase la Figura 28. El método de prueba microbiológica para estas muestras es idéntico a la prueba de superficie descrita anteriormente.

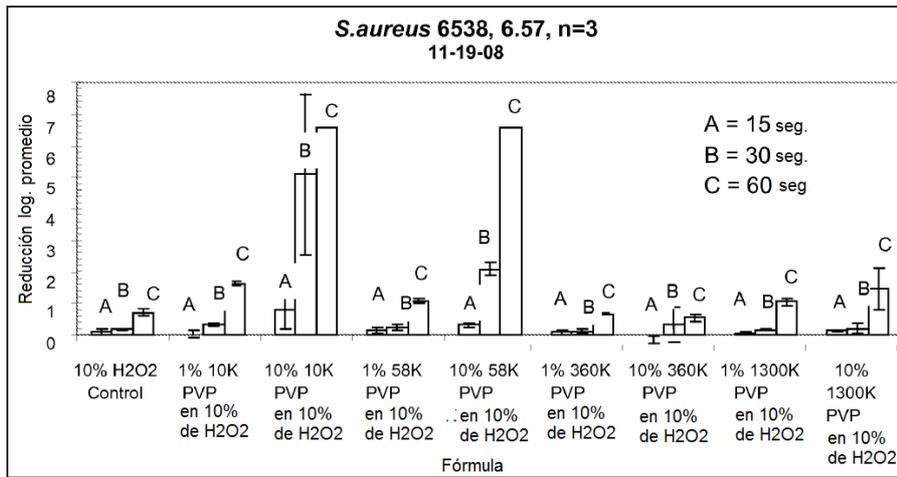
**REIVINDICACIONES**

1. Un método para proporcionar un recubrimiento reactivo que tiene propiedades de descontaminación química y biocida a una superficie de un artículo, que comprende las etapas de:
- a. aplicar un polímero higroscópico a la superficie del artículo;
- 5 b. procesar el polímero para formar una película; y
- c. exponer la película a al menos 400 ppm de peróxido de hidrógeno vaporizado durante un período de 30 minutos, en donde el polímero comprende polivinilpirrolidona.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, además, la etapa de reticulación de la película usando luz UV a densidades de energía de 6,000-12,000 mJ/cm<sup>2</sup>.
- 10 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la polivinilpirrolidona tiene un peso molecular de 10K, 58K, 360K, 1300K, o mezclas de los mismos.
4. Un método para proporcionar un recubrimiento reactivo que tiene propiedades de desactivación biocida y química a la superficie de un artículo, que comprende las etapas de:
- a. proporcionar un polímero presente en una cantidad que va del 1-99% en peso, en base al peso total de la composición reactiva;
- 15 b. mezclar el polímero con una solución acuosa de peróxido de hidrógeno presente en una cantidad que va del 1-10% en peso en base al peso total de la composición reactiva;
- c. aplicar la mezcla de polímero/peróxido de hidrógeno a la superficie del artículo; y
  - d. secar la mezcla para formar una película,
- 20 e. recargar el recubrimiento por exposición de la superficie a cantidades adicionales de peróxido de hidrógeno, en donde el polímero comprende polivinilpirrolidona, y en donde la composición reactiva comprende el polímero higroscópico y el peróxido de hidrógeno.
5. Uso de una composición reactiva, que consiste en:
- a. un polímero higroscópico que es polivinilpirrolidona que tiene un peso molecular de 10K, 58K, 360K o 1300K, presente en una cantidad del 1 al 99% en peso en base al peso total de la composición reactiva; y
- 25 b. un agente activo que es peróxido de hidrógeno presente en una cantidad del 1 al 10% en peso en base al peso total de la composición reactiva,
- como un recubrimiento de superficie reactiva recargable que tiene propiedades de neutralización o descontaminación biocidas y químicas.
- 30 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde las propiedades de neutralización o descontaminación biocidas y químicas incluyen actividad contra agentes biológicos y químicos de guerra.
7. Uso de peróxido de hidrógeno vaporizado para renovar o recargar las propiedades biocidas de un recubrimiento reactivo con propiedades de descontaminación biocidas y químicas obtenidas por el método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 en un ciclo de exposición de 30 minutos a 400 ppm de peróxido de hidrógeno.

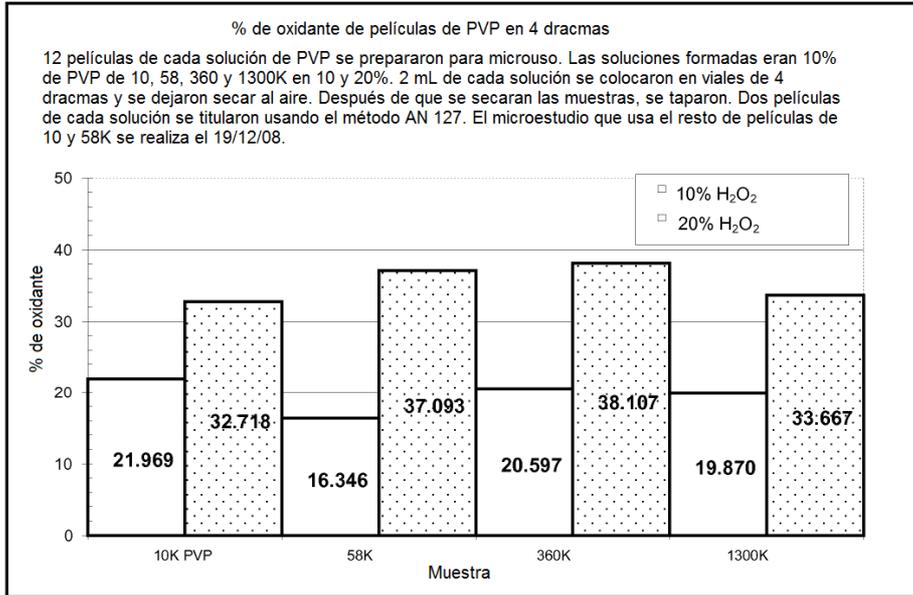
35



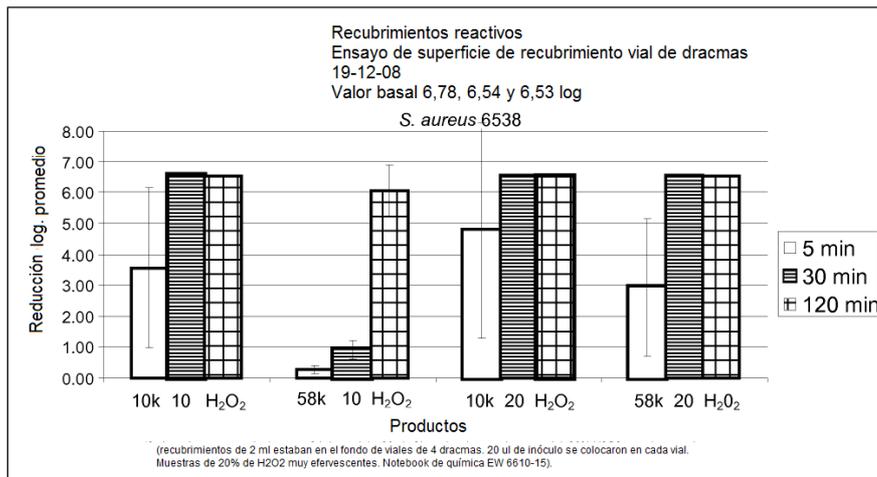
**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**



**FIG. 4**

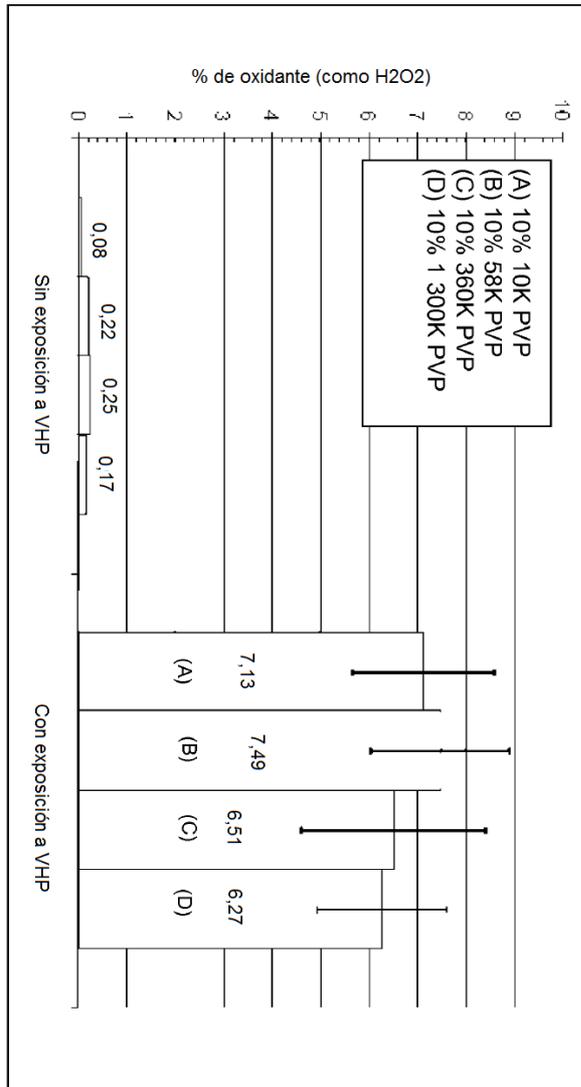
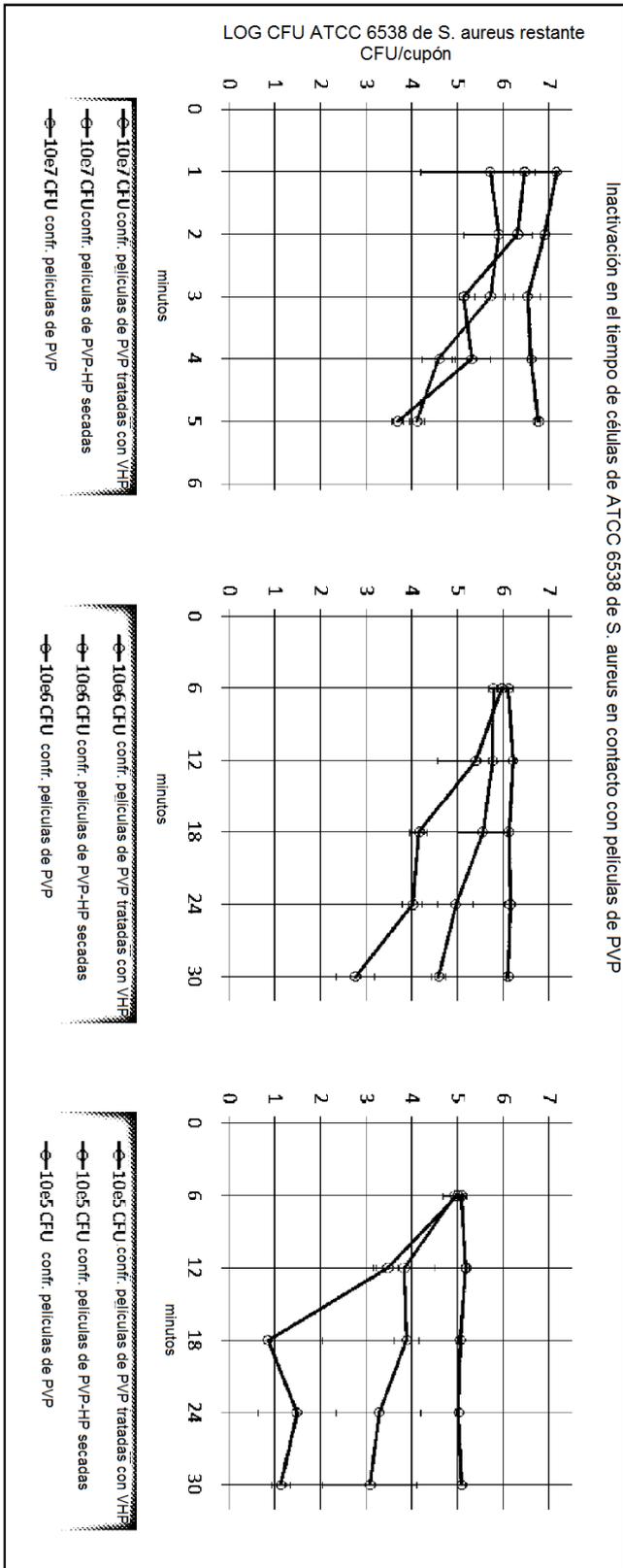


FIG. 5

FIG. 5



**FIG. 6**

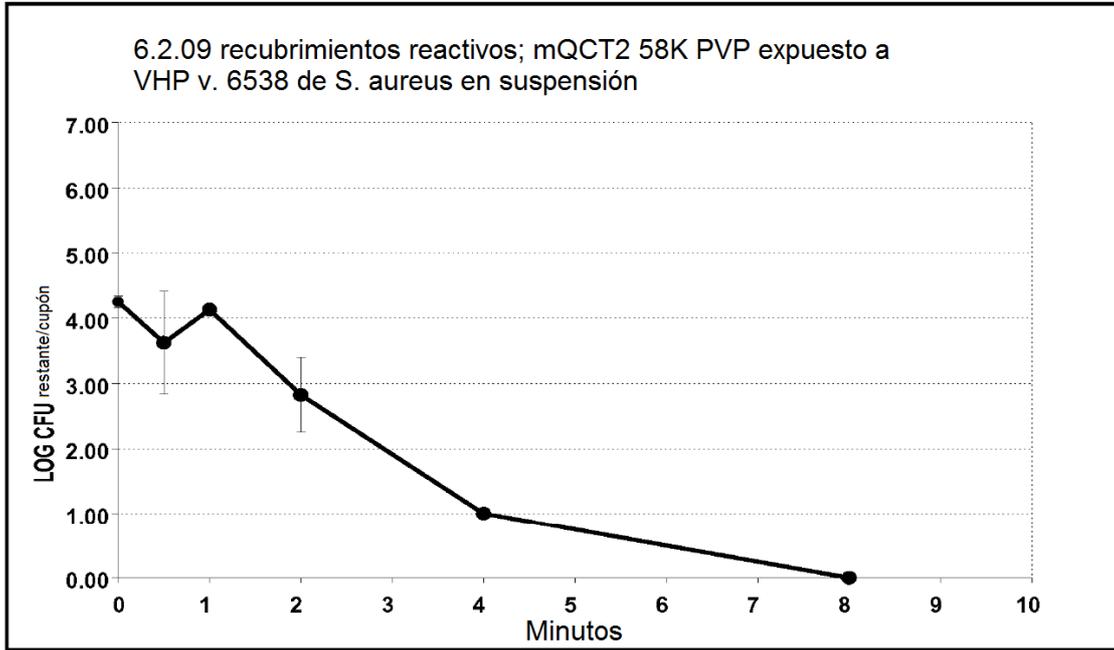


FIG. 7

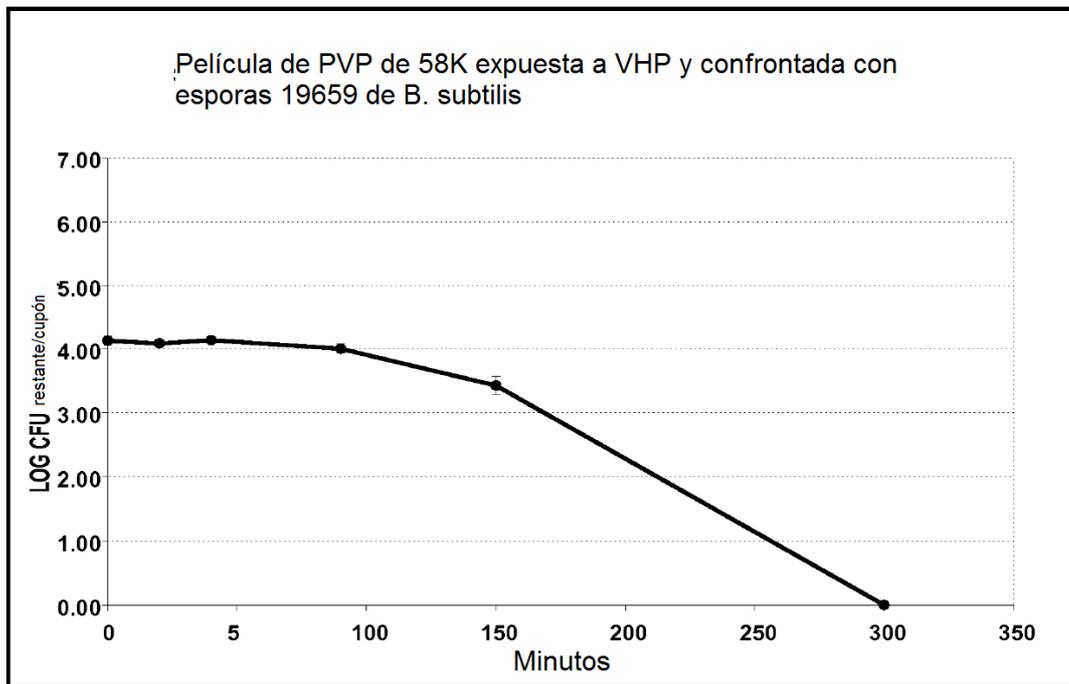


FIG. 8

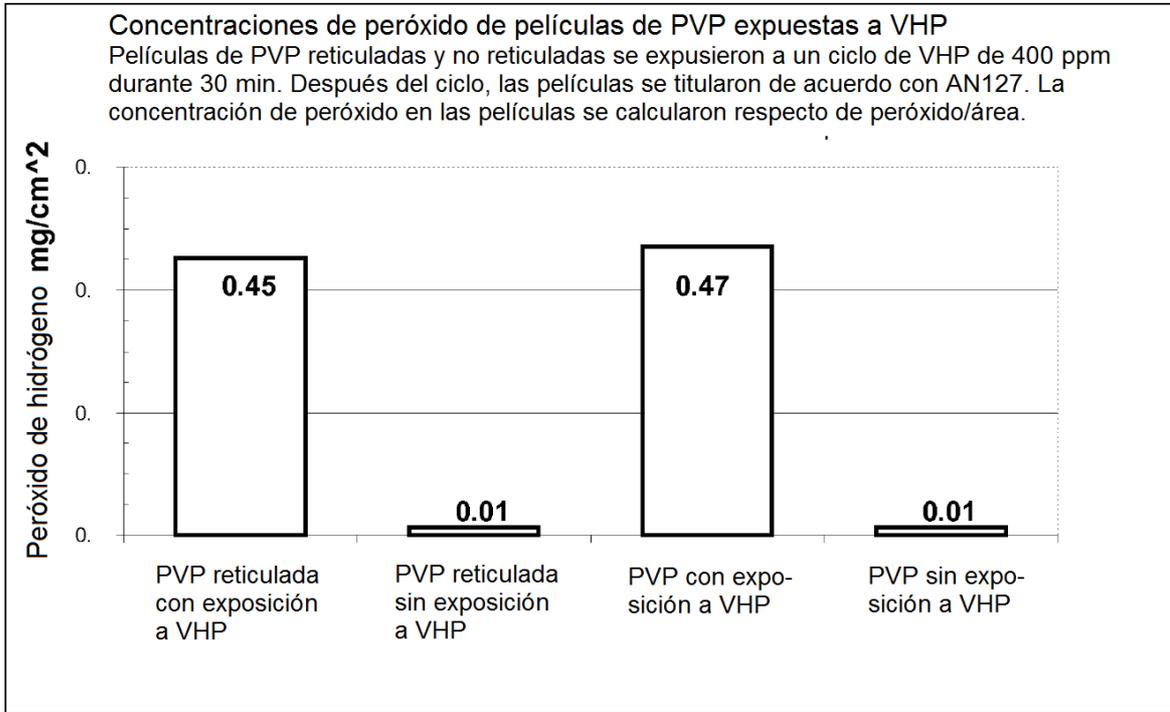


FIG. 9

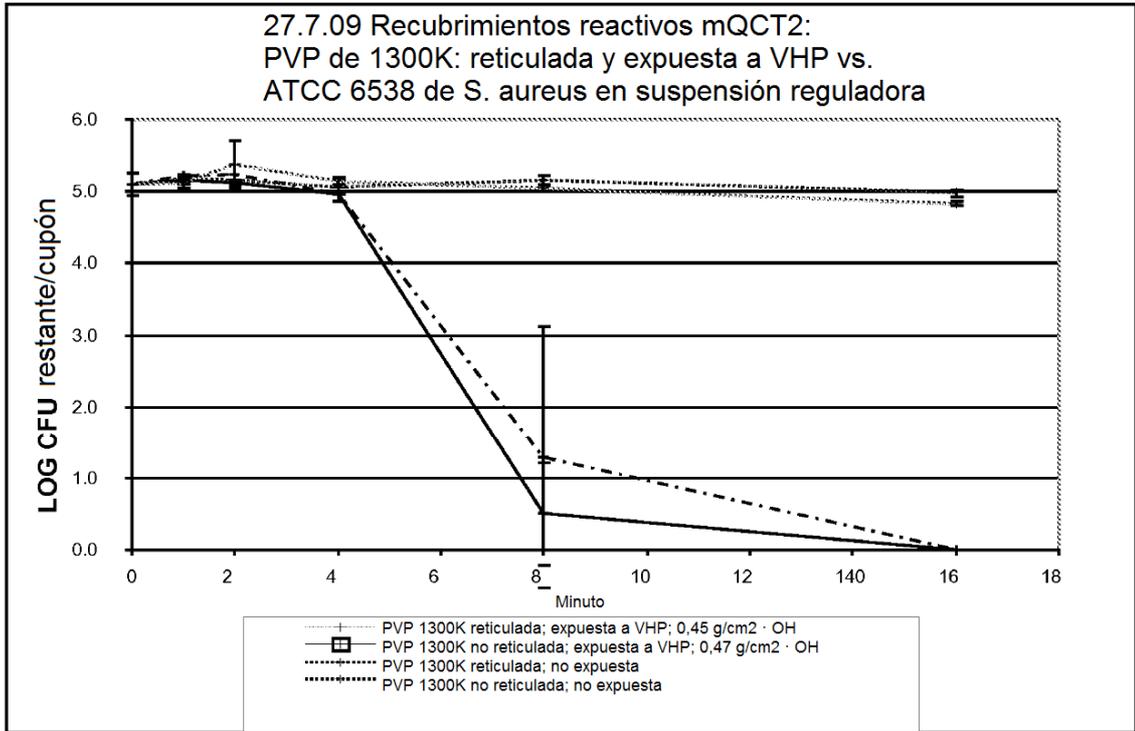


FIG. 10

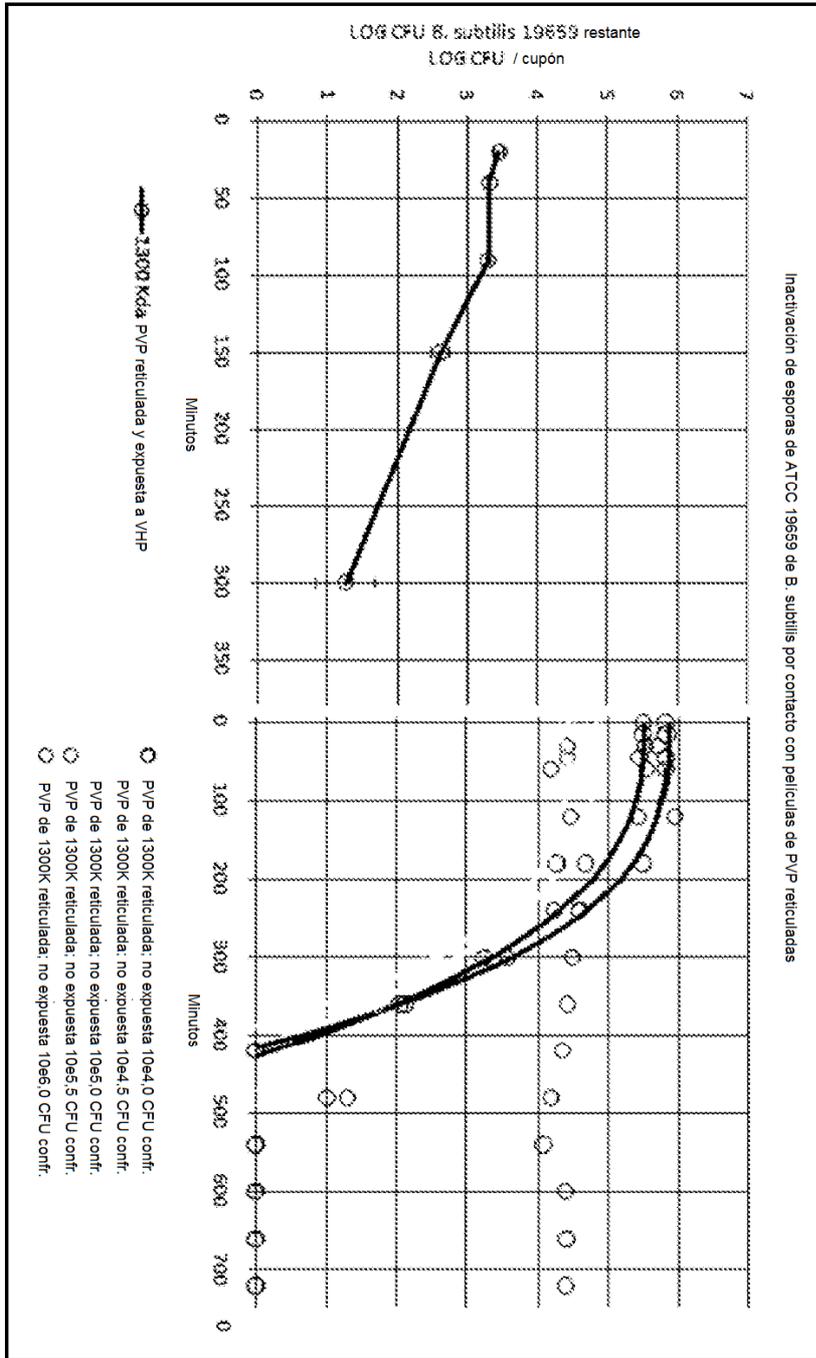


FIG. 11

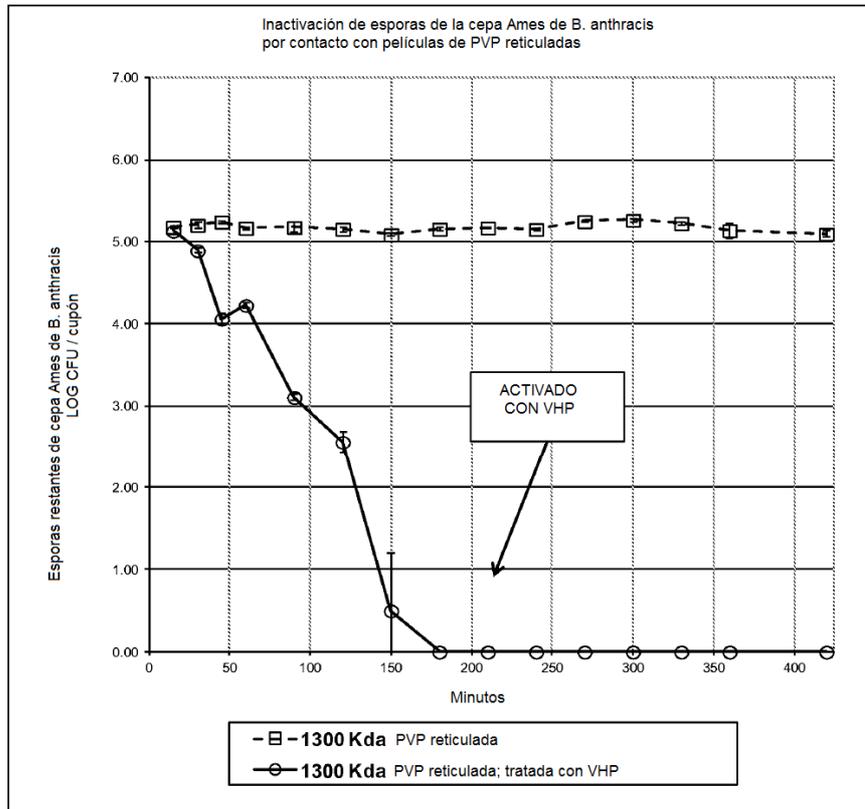


FIG. 12

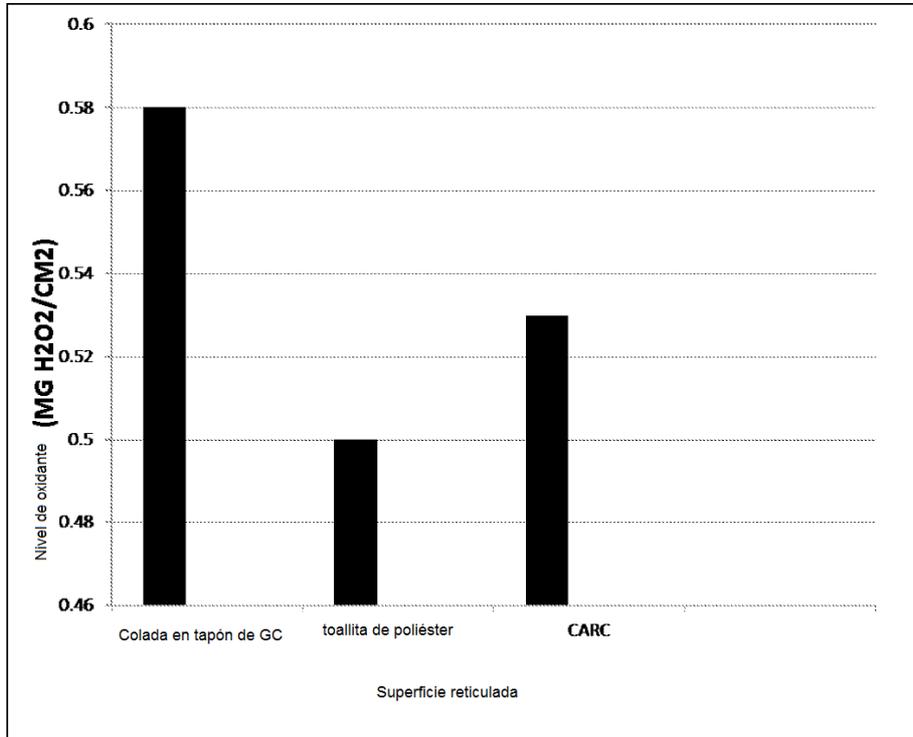


FIG. 13

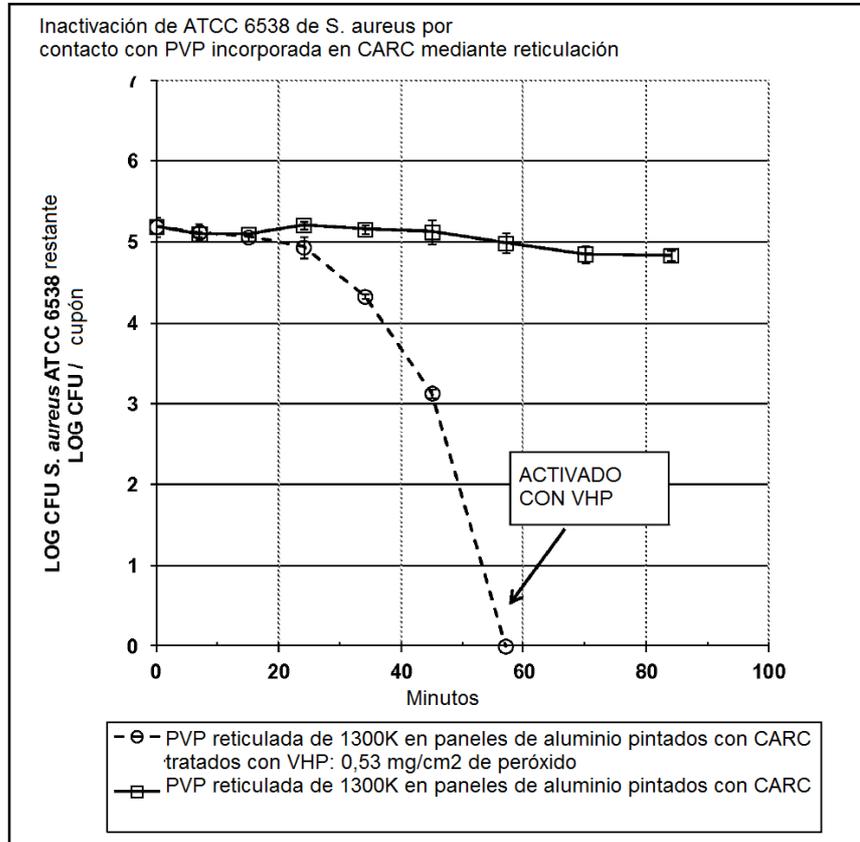


FIG. 14

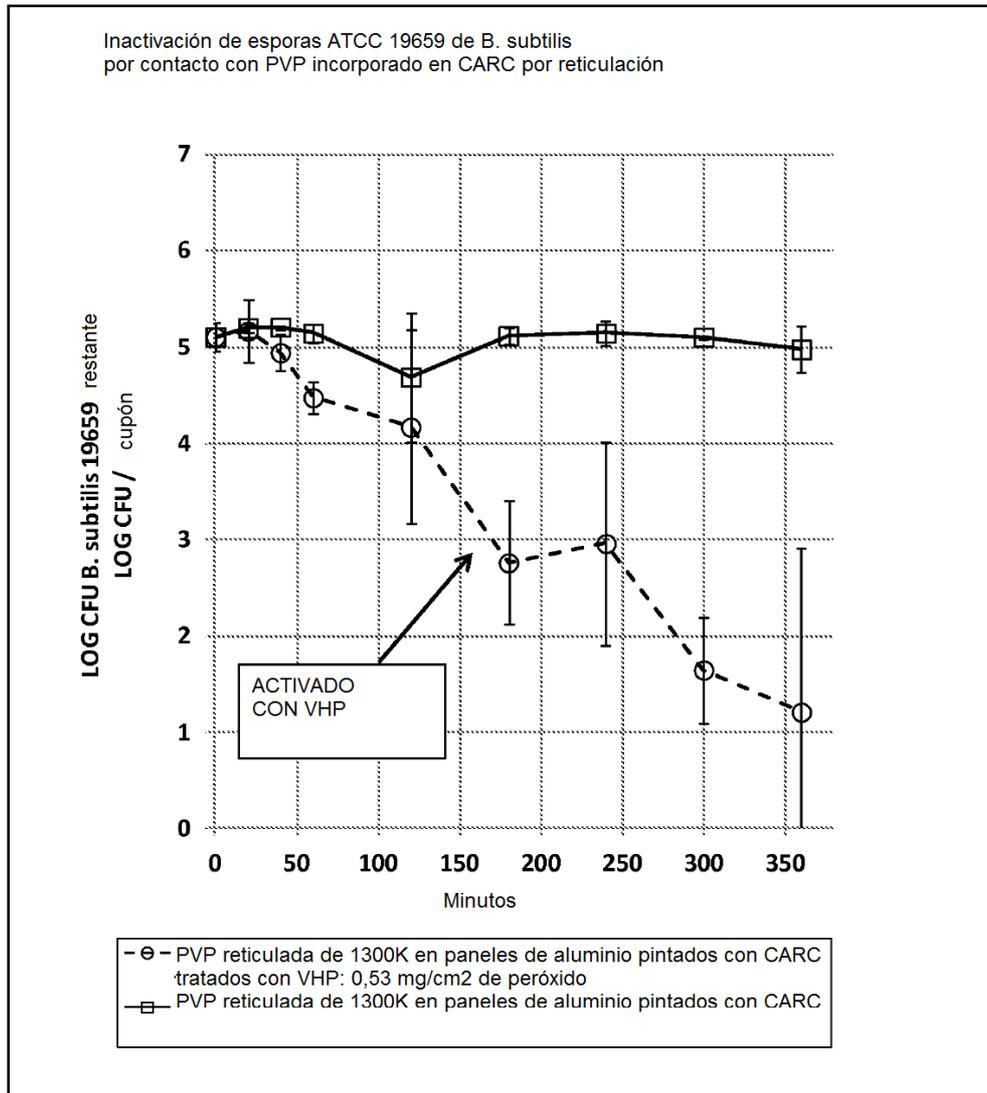
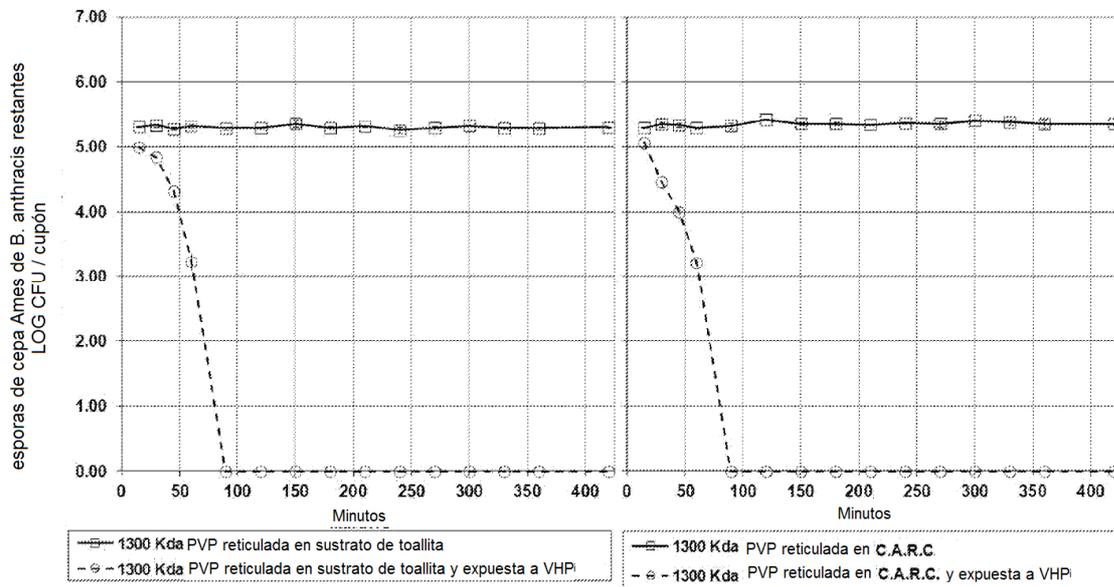


FIG. 15

Inactivación de esporas de cepa Ames de *B. anthracis*  
por contacto con PVP reticulada en CARC y sustrato de toallita



**FIG. 16**

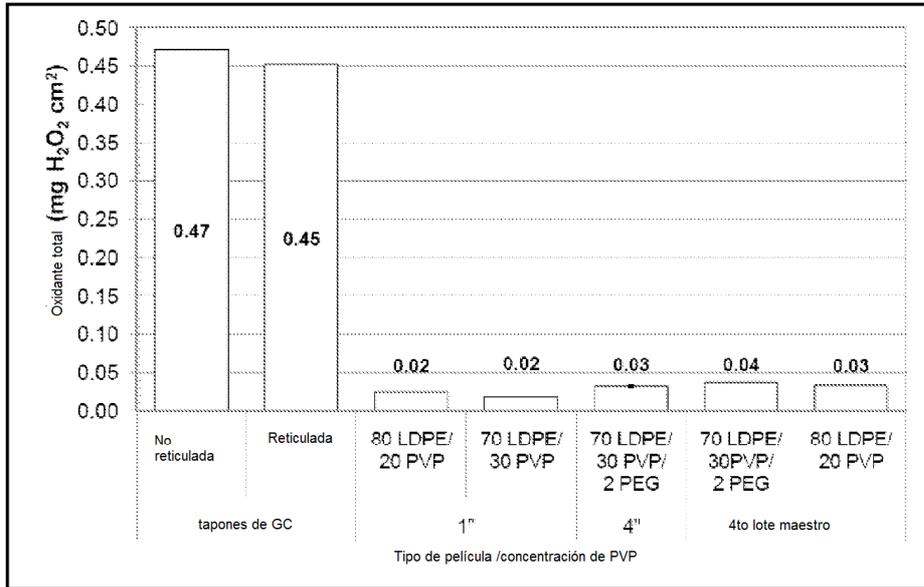
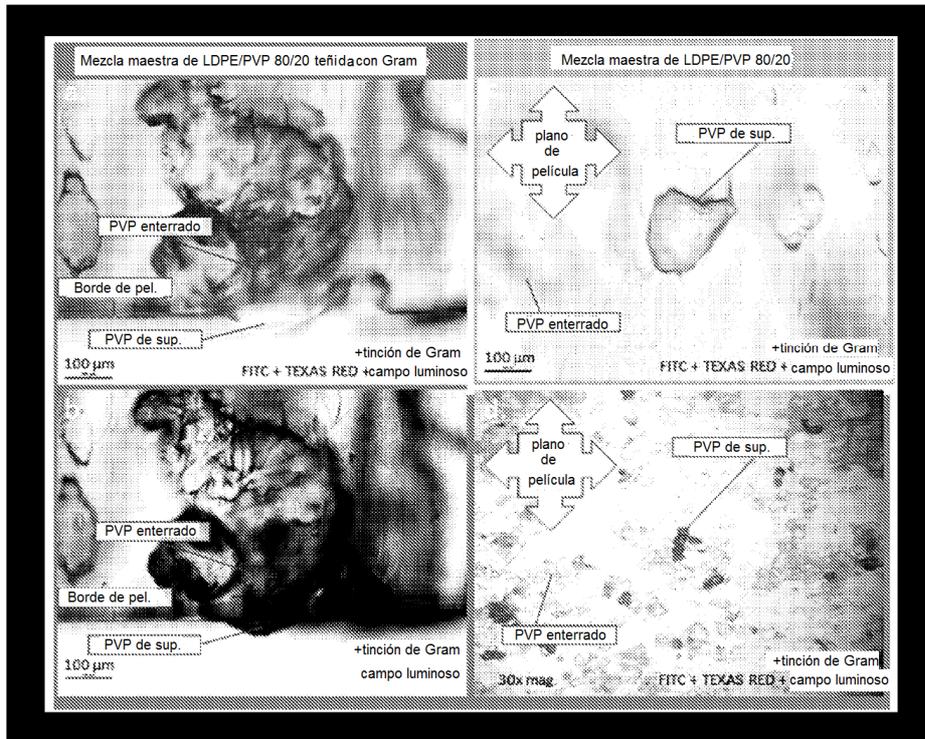


FIG. 17



a. Imagen compuesta de película de mezcla 80/20 de LDPE/PVP teñido con método Gram "mezcla maestra" (película). Vista del borde de la película, con un núcleo de PVP incluido parcialmente expuesto que se extiende más allá del borde de la película. Verde - fluorescencia FITC, rojo - fluorescencia TEXAS RED, ampliación 100x. b. Vista igual que (a), en iluminación de campo luminoso. Rosa / púrpura - tinción de Gram. 100x. c. Imagen compuesta de película sin tinción. Núcleo central "PVP de superficie" está sobre el plano de la película. Sombra verde es "PVP enterrado". Verde - fluorescencia FITC, rojo - fluorescencia TEXAS RED (faltante). Ampliación 100x. d. Película teñida con método Gram que caracteriza la distinción entre PVP de superficie disponible para tinción y PVP enterrado no disponible para tinción, y la disposición de estos dos tipos. Rosa / púrpura - tinción de Gram. Ampliación aprox. 30x.

FIG. 18

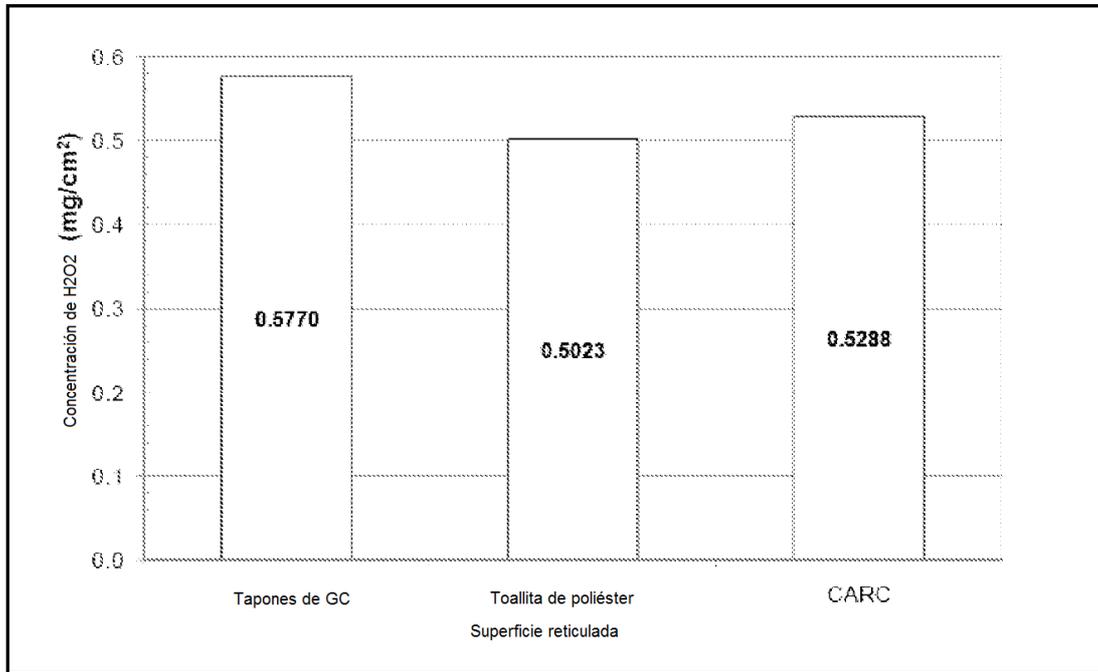


FIG. 19

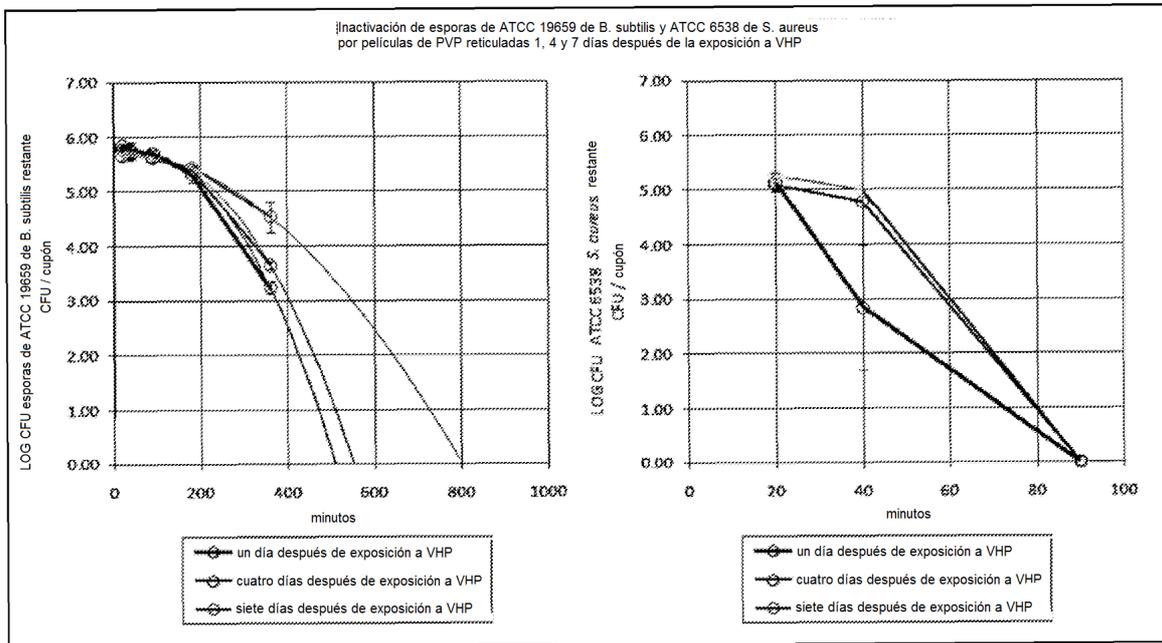


FIG. 20

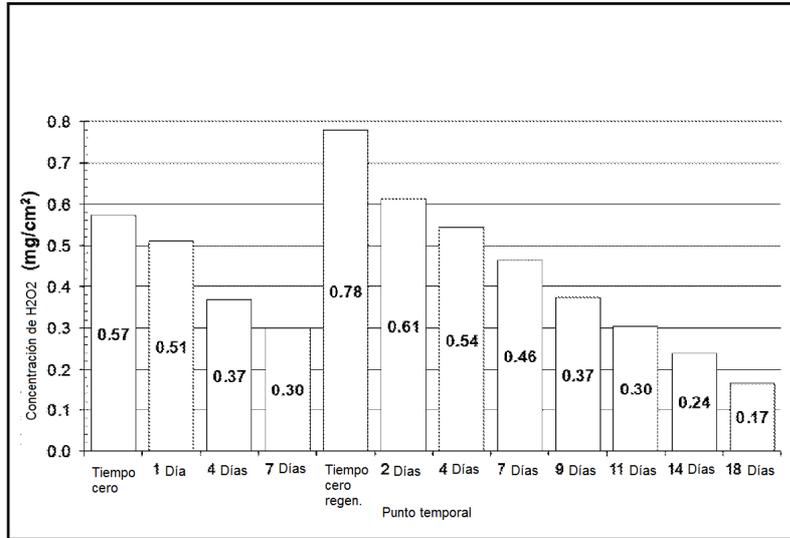


FIG. 21

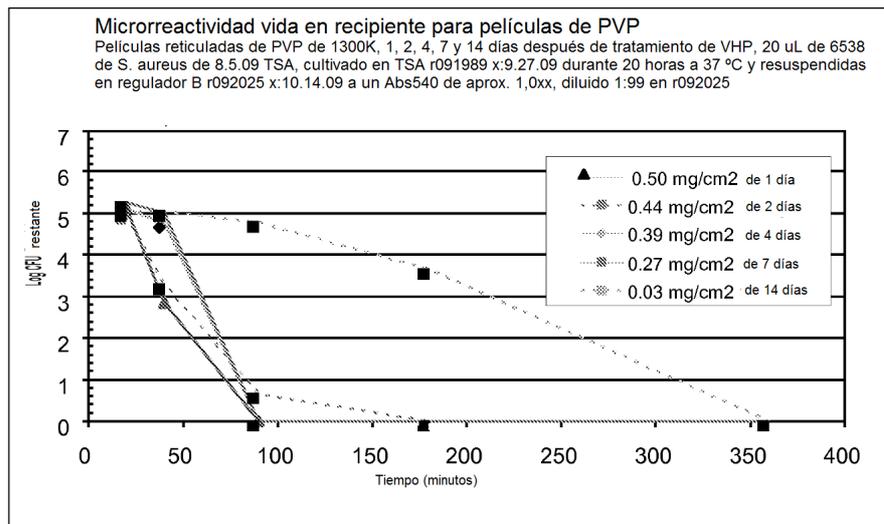
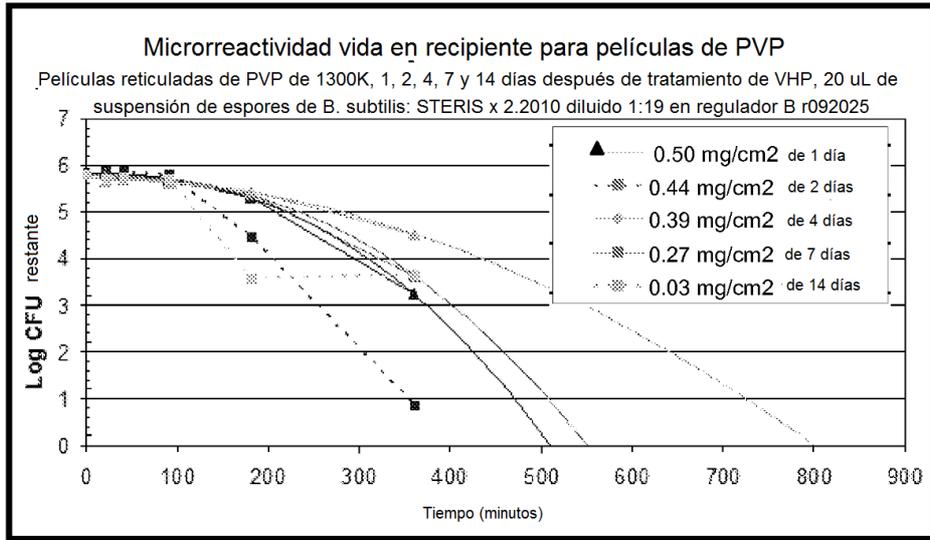
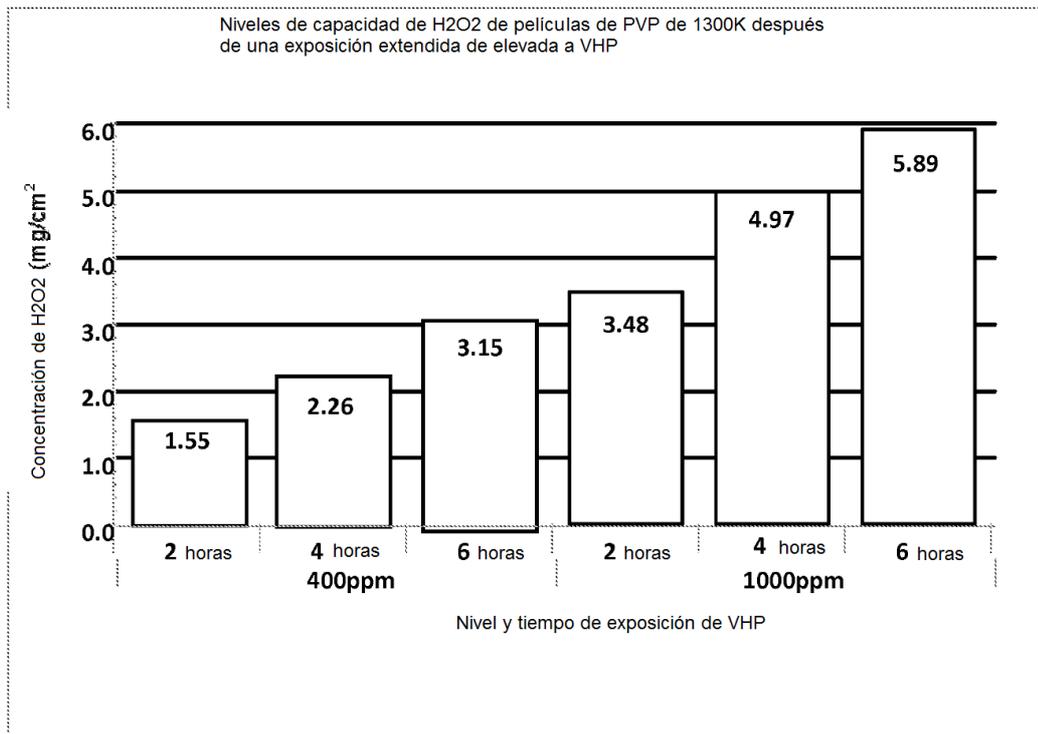


FIG. 22



**FIG. 23**



**FIG. 24**

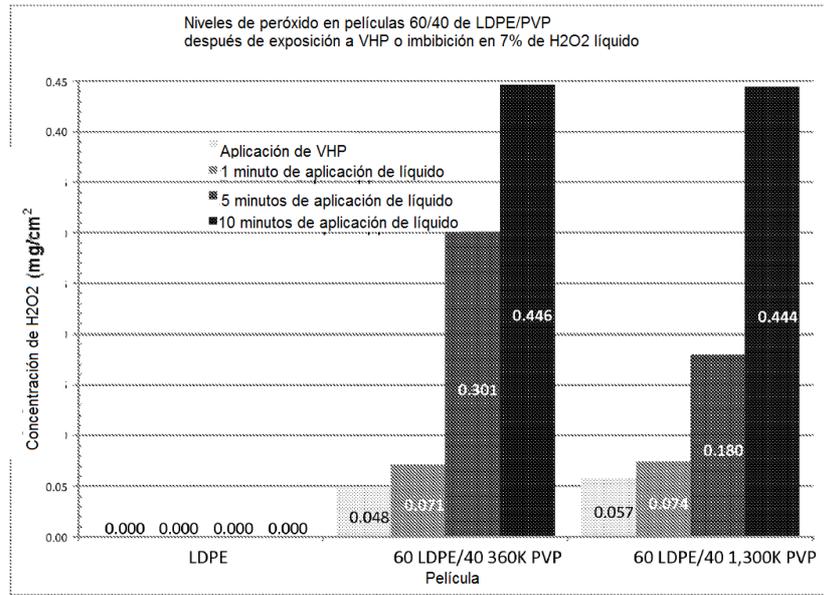


FIG. 25

Resultados microbiológicos  
 Recubrimientos reactivos expuestos a  
 VHP QCT II mod. 9/04/09  
 ATCC 6538 de S. aureus  
 N=3

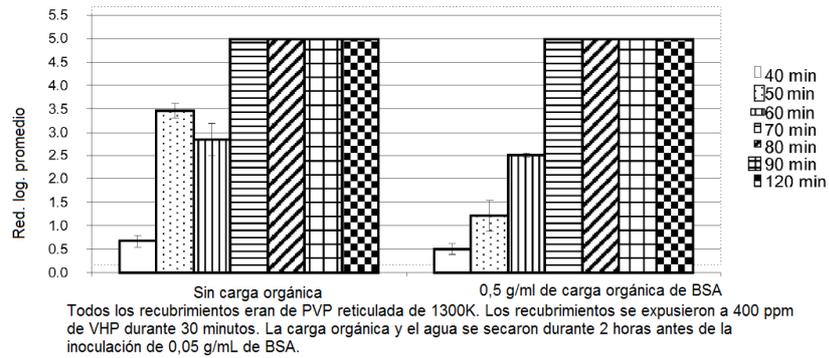


FIG. 26

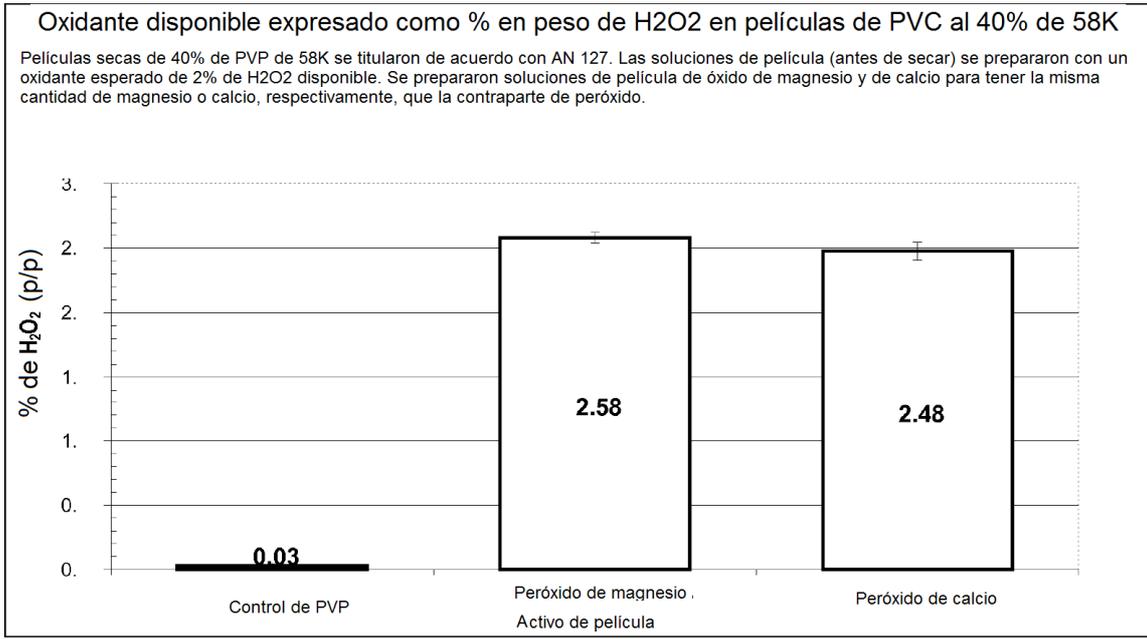
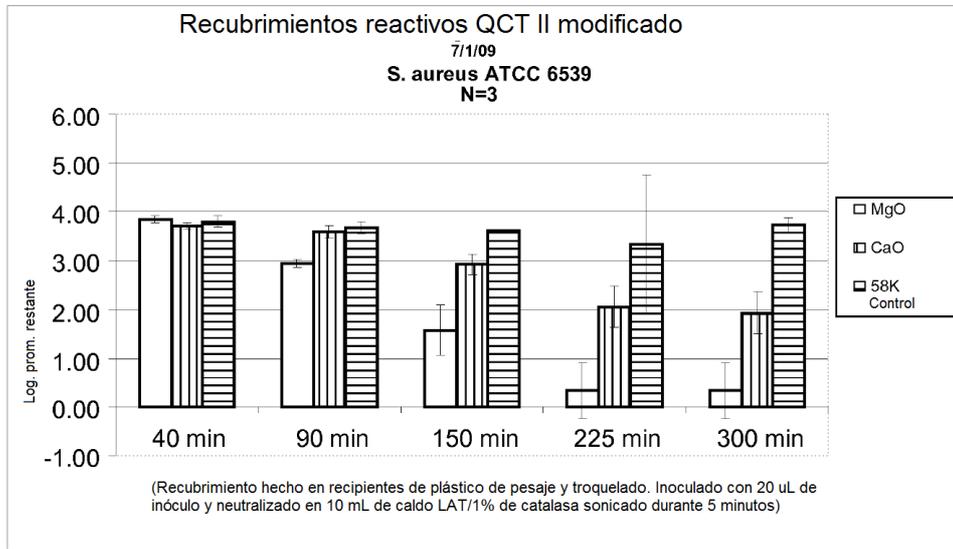


FIG. 27



**FIG. 28**