

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 403**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2014** **E 17200374 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** **EP 3335557**

54 Título: **Líquido de limpieza**

30 Prioridad:

02.09.2013 GB 201315573

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

27.10.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SCOONES, ROBERT

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 790 403 T3

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

DESCRIPCIÓN

Líquido de limpieza

5 Descripción de la invención

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

10 Las superficies a menudo entran en contacto con, proporcionan un ambiente y proporcionan un caldo de cultivo para patógenos potencialmente dañinos. Ejemplos no limitativos de superficies suelos pisos, tableros de mesas y tableros laterales de cocina, que tienen cualquier ángulo con respecto al nivel del suelo y son de cualquier forma, es decir, la referencia a superficies no está limitada a superficies planas. Un patógeno potencialmente dañino es cualquier organismo que pueda causar provoca. Ejemplos no limitativos de patógenos potencialmente dañinos incluyen bacterias, hongos, virus, alérgenos, mohos y levaduras.

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

25 Un entorno en el que es particularmente beneficioso limpiar superficies con agentes que actúan para mitigar y/o destruir patógenos potencialmente dañinos es un entorno veterinario, por ejemplo, en un quirófano veterinario.

Otro entorno en el que es particularmente beneficioso limpiar superficies con agentes que actúan para mitigar y/o destruir patógenos potencialmente dañinos es un entorno hospitalario, por ejemplo, en un quirófano hospitalario.

30 Otro entorno en el que es particularmente beneficioso limpiar superficies con agentes que actúan para mitigar y/o destruir patógenos potencialmente dañinos es en una instalación pública, por ejemplo, el suelo alrededor de una piscina.

35 Hay muchos otros entornos donde es particularmente beneficioso limpiar superficies con agentes que actúan para mitigar y/o destruir patógenos potencialmente dañinos incluyendo, pero no limitados a, limpieza general del hogar, lugares de hospitalidad, hoteles, hogares de ancianos, cruceros y equipos de procesamiento de alimentos industriales.

40 Las superficies en quirófanos veterinarios, hospitales, servicios públicos y otras áreas donde personas o animales pueden entrar en contacto con patógenos dañinos, deben limpiarse regularmente para evitar la acumulación de patógenos potencialmente dañinos. Los líquidos de limpieza usados para limpiar superficies incluyen soluciones de lejía, soluciones de líquido detergente, desinfectantes a base de alcohol y líquido desinfectante general. Un ejemplo no limitativo de un líquido desinfectante es Dettol™, como el vendido actualmente en el Reino Unido por Reckitt Benckiser™.

45 Al usar líquidos de limpieza, el líquido de limpieza a menudo se transfiere del almacenamiento, por ejemplo, un balde o un barreño, u otro recipiente, a una superficie potencialmente contaminada con uno o más patógenos.

50 En la limpieza de superficies y/o suministros de agua, en particular en la limpieza de superficies en hospitales, es preferible que el agente antipatógeno sea activo en presencia de materia orgánica durante varios minutos, por ejemplo, hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 y 90 minutos, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 horas, y todos los demás momentos intermedios. Es particularmente preferible que el agente antipatógeno sea activo durante por lo menos 60 minutos hasta 24 horas en un entorno hospitalario para que un limpiador pueda continuar usando una solución de limpieza que contenga un líquido de limpieza durante un período de tiempo adecuado, sin tener que reponer repetidamente la solución de limpieza, por ejemplo, porque la actividad del agente antipatógeno haya disminuido.

60 Las formulaciones de limpieza de suelos conocidas incluyen soluciones de lejía, que son efectivas para destruir los patógenos sobre las superficies. Sin embargo, la lejía puede ser dañina para los humanos y los animales por sí misma. Las soluciones de detergente líquido tienen una actividad antipatógena relativamente débil. Se usan desinfectantes a base de alcohol, pero el alcohol, que tiene actividad antipatógena, es relativamente volátil, por lo que se evapora y tiene un tiempo de actividad antipatógeno relativamente corto.

65 Es preferible que los líquidos de limpieza, específicamente los que se usan en un entorno hospitalario, tengan un tiempo de actividad antipatógeno relativamente largo (alrededor de 1 hora) para que, por ejemplo,

después de haber fregado un suelo, la actividad antipatógena continúe durante el tiempo suficiente para que los patógenos no tengan la posibilidad de asentarse y/o crecer entre los ciclos de limpieza. El líquido desinfectante, por ejemplo, Dettol™, es efectivo en su actividad antipatógena, pero muchos patógenos desarrollan resistencia a los desinfectantes de uso prolongado.

Los líquidos de limpieza también se usan en suministros de agua, por ejemplo, en piscinas, jacuzzis (por ejemplo, Jaccuzzis™) y spas donde las personas entran en contacto con el agua comunal. Los suministros de agua en las piscinas a menudo se tratan con cloración. Los suministros de agua en los jacuzzis a menudo se tratan mediante ozonización y/o mediante la introducción de halógenos, por ejemplo, bromo, en el suministro de agua.

En el caso de un patógeno particular, concretamente, *Cryptosporidium parvum*, la contaminación de la piscina y las aguas recreativas es un problema grave. Una vez que las aguas se contaminan, es fácil que el organismo se transmita a los humanos y la infección puede ocurrir desde tan solo 132 ooquistes (DuPont et al., (1995), The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers, 332(13): 855-859) El tratamiento actual de estas aguas con cloro es ineficaz para eliminar este organismo, ya que estudios anteriores han demostrado que el tratamiento con 4 ppm de cloro a pH 7 durante 25 horas no produjo una disminución en la viabilidad celular como se observa en el ensayo DAPI/PI, y solo una reducción del 40% en la viabilidad celular cuando se usa el ensayo de exquistación (Widmer, (2002), Molecular mechanisms of chemical inactivation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts, AWWA Research Foundation).

Hay una necesidad de un nuevo líquido de limpieza que pueda aplicarse a las superficies y usarse en el tratamiento del agua, que sea eficaz para mitigar los recuentos de patógenos y que tenga efectos secundarios dañinos limitados o nulos en humanos y animales. La WO2012/080918 describe composiciones antimicrobianas que comprenden un compuesto de amonio cuaternario y un biocida catiónico. La EP0457656 describe composiciones de limpieza y desinfección para uso doméstico. La US2012157540 describe formulaciones desinfectantes que contienen un agente activo antimicrobiano. La WO2006116778 describe un material profiláctico para su uso en refugios de animales para la protección de los animales. La JP2003206205 describe un método microbicida en un sistema de agua en una atmósfera reductora. La JP2001354505 describe un agente antiséptico, a prueba de moho y a prueba de algas. La JPH11240808 describe una composición estéril y antiséptica.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una composición, o una mezcla acuosa que comprende agua y una composición, contra una biopelícula, en donde la composición comprende:

cloruro de benzalconio,
cloruro de didecil dimetil amonio,
clorhidrato de polihexametilen biguanida,
bronopol,
p-cloro-m-cresol,
etanol, y
etilenglicol,

en donde el uso no está en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

Ventajosamente, la composición o mezcla acuosa es para su uso contra una biopelícula en un sistema de agua, preferiblemente en donde el sistema de agua es un sistema de agua recreativo.

Preferiblemente, en donde el agua usada en la mezcla acuosa es agua del grifo, agua potable, agua destilada, agua sucia, agua que contiene tierra, agua que contiene efluente, agua que contiene patógenos, agua que contiene desechos, aguas residuales y/o agua salobre. Más preferiblemente, en donde la composición tiene una proporción de agua en volumen a líquido de limpieza del 99% de agua al 1% de líquido de limpieza a del 1% de agua al 99% de líquido de limpieza, o cualquier valor intermedio.

Ventajosamente, en donde la composición tiene una proporción de agua en volumen a líquido de limpieza del 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% o 0,05% de agua a líquido de limpieza.

Preferiblemente, en donde la composición tiene una proporción de agua en volumen a líquido de limpieza del 99% de agua al 1% de líquido de limpieza.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una composición o mezcla acuosa que comprende agua y dicha composición para limpiar una superficie, dicha composición comprendiendo: cloruro de benzalconio, cloruro de didecil dimetil amonio, clorhidrato de polihexametilen biguanida, bronopol, y p-cloro-m-cresol, en donde el uso no está en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de dicha composición o una mezcla acuosa que comprende agua y dicha composición para desinfectar un suministro de agua.

5 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar una composición de acuerdo con cualquiera de los anteriores, que comprende:

proporcionar los componentes de acuerdo con cualquiera de los anteriores; y, mezclar los ingredientes en una mezcladora.

10 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una toallita para aplicación sobre la piel, la toallita comprendiendo dicha composición o una mezcla acuosa que comprende agua y dicha composición.

15 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona dicha composición o una mezcla acuosa que comprende agua y dicha composición para su uso en la desinfección de un área de la piel.

Composición A

20 A continuación se exponen algunos de los componentes de las composiciones de la presente invención, junto con sus fuentes.

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

Nombre comercializado	Nombre genérico	Número CAS	Composición A Cantidad (% en peso) pura	Cantidad (% en peso) en 1:19 v/v
Acticida BAC50M	Cloruro de benzalconio	63449-41-2	3	0.15
Acticida DDQ50	Cloruro de didecil dimetil amonio	7173-51-5	3	0.15
Acticida PHB20	Clorhidrato de Polihexametilen Biguanida	27083-27-8	3.3	0.165
Acticida L	Bronopol	52-51-7	0.9	0.045
Acticida PCMC	P-cloro-m-cresol	59-50-7	0.04	0.002
	Etanol	64-17-5	4.9	0.245
	Etilenglicol	107-21-1	1.0	0.05
	Agua		83.86	99.193

50 La composición A es una composición de acuerdo con una realización preferida de la presente invención. Se enumeran los nombres de los ingredientes, junto con su número CAS (Chemical Abstract Service). El número CAS se ha dado porque el registro CAS es una referencia estándar para las personas que buscan clasificar compuestos químicos que se conocen en la bibliografía científica. En todas las composiciones, la cantidad de cada ingrediente se proporciona en % en peso (también referido en esta especificación como % en p. o % p/p). La columna "cantidad... pura" muestra la composición pura. La columna "cantidad... en 1:19 v/v" muestra la cantidad de cada componente en una solución de composición neta/agua de 1:19 v/v. La indicación "v/v" indica que la proporción es en volumen.

Componentes de la composición A

60 El cloruro de benzalconio es una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio de varias longitudes de cadena de alquilo pares. El cloruro de benzalconio puede actuar, entre otras cosas, como biocida, surfactante catiónico y agente de transferencia de fase. Un ejemplo no limitativo de un tamaño de lote para la composición A es 10 kg.

65 El cloruro de didecil dimetilamonio es un compuesto que actúa, entre otras cosas, como antiséptico y/o desinfectante, es decir, como biocida.

El clorhidrato de polihexametilen biguanida es un polímero que actúa, entre otras cosas, como desinfectante y/o antiséptico, es decir, como biocida.

5 El bronopol es un compuesto que actúa, entre otras cosas, como un antimicrobiano, es decir, un biocida. El bronopol se usa comúnmente como conservante en productos de consumo, por ejemplo, en cosméticos.

El P-cloro-m-cresol (4-cloro-3-metilfenol) es un compuesto que actúa, entre otras cosas, como un antiséptico y un conservante, es decir, un biocida. El P-cloro-m-cresol se usa a menudo en el lavado de manos.

10 El etanol es un líquido incoloro que a menudo se usa como solvente.

15 El etilenglicol es un compuesto comúnmente usado en anticongelantes y como precursor de algunos polímeros. En otras realizaciones, el etilenglicol puede estar sustituido, en su totalidad o en parte, con otros alquilenglicoles, por ejemplo: propilenglicol, dietilenglicol, copolímeros de bloque de etileno y óxido de propileno (por ejemplo, diferentes tipos de Pluronic™ como los vendidos por BASF™), cualquier otro alquilenglicol formado de la combinación de óxidos de alquileo y/o cualquier combinación de alquilenglicoles.

Protocolo de fabricación para la composición A

20 Lo siguiente es un protocolo para formar un líquido de limpieza de acuerdo con la composición A mostrada anteriormente. Las cantidades de cada ingrediente usado en cada paso se muestran arriba, es decir, no se especifican en el siguiente método.

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

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

- 30 i. Seleccionar un recipiente de fabricación limpio, por ejemplo, un recipiente de mezcla de acero inoxidable con un eje de hélice.
ii. Asegurarse de que las entradas o salidas del recipiente de fabricación estén limpias.
iii) Medir todas las materias primas, como se requiera para la composición.
35 iv. Opcionalmente, añadir agua para la dilución final deseada.
v. Introducir los siguientes componentes, preferiblemente en orden: (1) Acticida PCMC; (2) Acticida L; (3) Acticida BAC 50; (4) Acticida DDQ 50; (5) Acticida PHB20, mezclar los componentes o de forma continua o después de cada introducción.
vi. Añadir por separado etanol, seguido de etilenglicol, mezclando continuamente a 25° C y 100 kPa, y hasta que todos los componentes se hayan disuelto.
40 vii. Opcionalmente, añadir agua adicional para diluir la mezcla al grado deseado.

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

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

50 Intervalos de la Composición A (ejemplo):

55

60

65

Nombre comercializado	Nombre genérico	Número CAS	Composición A Cantidad (% en peso) pura	Intervalos para Cantidad de composición A (% en peso) pura
Acticida BAC50M	Cloruro de benzalconio	63449-41-2	3	0.5-10
Acticida DDQ50	Cloruro de didecil dimetil	7173-51-5	3	0.5-10
Acticida PHB20	Clorhidrato de Polihexametilen Biguanida	27083-27-8	3.3	0.5-10
Acticida L	Bronopol	52-51-7	0.9	0.3-5
Acticida PCMC	P-cloro-m-cresol	59-50-7	0.04	0.01-0.1
	Etanol	64-17-5	4.9	3-10
	Etilenglicol	107-21-1	1.0	0.5-2.5
	Agua		83.86	52.40-94.69

La composición A, de acuerdo con la presente invención, cumple con el Reglamento (CE) 1907/2006 (REACH). En otras palabras, los ingredientes cumplen con la ley pertinente de la CE sobre seguridad en productos químicos usados en entornos domésticos.

En una realización alternativa, el etilenglicol puede reemplazarse por un alquilenglicol diferente, por ejemplo, mono propilenglicol. Otros ejemplos no limitativos de alquilenglicoles incluyen, pero no están limitados a, dietilenglicol, copolímeros de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno (por ejemplo, diferentes tipos de Pluronic™ como los vendidos por BASF™), cualquier otro alquilenglicol formado a partir de la combinación de óxidos de alquileo y/o cualquier combinación de alquilenglicoles.

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

En uso, las composiciones de limpieza de la presente invención se aplican a una superficie mediante un aplicador, por ejemplo, una mopa, una esponja, un paño, una toalla o un guante. En uso, las composiciones de limpieza de la presente invención se almacenan en un recipiente, por ejemplo, un cubo, para la aplicación mediante un aplicador. En una realización particularmente preferida, las composiciones de limpieza de la presente invención se almacenan en un barreño y se aplican a una superficie mediante un paño.

En un uso alternativo, las composiciones de limpieza de la presente invención se introducen en un suministro de agua, por ejemplo, un suministro de agua para usar en o para ser introducido en una piscina. El suministro de agua se pone en contacto con la composición de limpieza y luego se reintroduce en la piscina.

En un uso alternativo, las composiciones de limpieza de la presente invención se introducen en la piel de un usuario, por ejemplo, mediante una toallita o mediante pulverización.

Pruebas de desinfección de superficies

1. Una variedad de patógenos

Se llevaron a cabo realizaron una serie de pruebas en la composición A por D C Watson en Abbott Analytical, en New Ferry, Reino Unido, bajo un acuerdo de confidencialidad. Estas pruebas se realizaron bajo diferentes estándares europeos, usando una dilución 1:20 v/v de la versión 'pura' de la composición A con agua. Estos estándares europeos se denominan EN XX, donde XX es el número asignado a la prueba estándar por la Organización Europea de la Normalización pertinente. Las conclusiones de Abbott Analytical fueron las siguientes:

- 5
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
 - 30
 - 35
 - 40
 - 45
 - 50
 - 55
 - 60
- La composición A, cuando se diluye a 1:20 v/v, pasa los requisitos de la EN 1276 para actividad bactericida (*Pseudomonas aeruginosa* (NCIMB 10421), *Escherichia coli* (NCTC 10418), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Enterococcus hirae* (NCIMB 8192)) en 5 minutos a 20° C en condiciones de suciedad contra todos los organismos de referencia detallados.
 - La composición A, cuando se diluye a 1:20 v/v, pasa los requisitos de la EN 1276 para actividad bactericida (*Listeria monocytogenes* (NCTF 11994), *Salmonella typhimurium* (NCTC 74), *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (NCTC 12493)) en 5 minutos a 20° C en condiciones de suciedad contra todos los organismos de referencia detallados.
 - La composición A, cuando se diluye a 1:20 v/v, cumple los requisitos de la EN 13623 para la actividad bactericida (*Legionella pneumophila* (NCTC 12821)) en 60 minutos a 30° C contra *Legionella pneumophila*.
 - La composición A, cuando se diluye a 1:20 v/v, pasa los requisitos de la EN 1276 para actividad bactericida (*Streptococcus dysgalactiae* (NCIMB 702023), *Streptococcus uberis* (NCIMB 2038), *Streptococcus suis* (NCTC 10234), *Streptococcus equi* (NCTC 7912)) en 5 minutos a 20° C en condiciones de suciedad contra todos los organismos de referencia detallados.
 - La composición A, cuando se diluye a 1:20 v/v, pasa los requisitos de la EN 1650 para actividad fungicida (*Aspergillus fumigatus* (NCPF 7102)) en 15 minutos a 20° C en condiciones de suciedad contra el organismo de referencia detallado.
 - La composición A, cuando se diluye a 1:20 v/v, pasa los requisitos de la EN 13704 para actividad esporicida (*Clostridium difficile* (NCTC 11209)) en 60 minutos a 20° C en condiciones de suciedad contra el organismo de referencia detallado.
 - La composición A, cuando se diluye a 1:20 v/v, pasa los requisitos de la EN 13704 para actividad esporicida (*Bacillus subtilis* (NCIMB 8054), *Bacillus cereus* (ATCC 12826)) en 60 minutos a 20° C en condiciones de suciedad contra ambos organismos de referencia detallados.
 - La composición A, cuando se diluye a 1:20 v/v, cumple con los requisitos de la EN 1500 para el lavado higiénico de manos cuando se prueba bajo los procedimientos descritos anteriormente. Esto muestra que la composición es adecuada para mitigar la presencia de patógenos en las manos.

En resumen, se descubrió que la composición A tiene efectos antibacterianos, antifúngicos y antiesporicidas. También se descubrió que la composición A era adecuada para su uso como un desinfectante para manos.

2. seguridad

Además, Reading Scientific Services Ltd, Reading, Reino Unido, llevó a cabo una evaluación de seguridad de la composición A, bajo un acuerdo de confidencialidad. Reading Scientific Services Ltd concluyó que la composición A cumple con las Regulaciones cosméticas europeas y no debe provocar daños a la salud bajo un uso normal y razonablemente previsible.

3. Efecto contra MRSA y E. coli

Se llevaron a cabo pruebas adicionales sobre la efectividad de las composiciones de la presente invención, concretamente, la composición A detallada anteriormente.

Las pruebas fueron realizadas por la Dra. Susanna Sherwin y el Profesor Bill Keevil, bajo un acuerdo de confidencialidad, en la Unidad de Salud Ambiental de la Universidad de Southampton, Reino Unido. Sus métodos y resultados se exponen a continuación, con referencia a las figuras.

Se usaron cuatro protocolos experimentales:

A. Recuentos de células cultivables: Recubrimiento de la superficie con bacterias y luego adición de biocida

Se recubrieron cultivos durante la noche de MRSA (20 µl) en probetas de acero inoxidable de 1 cm², y se dejaron secar; se añadieron alícuotas de 20 µl de composición A al 5% (v/v) a las probetas, y se incubaron a temperatura ambiente durante 0 horas (control) o 2 horas. Después de la incubación, las células se eliminaron de las probetas mediante agitación de vórtice en PBS con perlas de vidrio, y la solución resultante se diluyó y se colocó en placas de agar nutritivo. Después de la incubación durante la noche a 37° C, se contaron las células viables. Las colonias que crecieron en placas de agar nutritivo en este período de tiempo indican el número de bacterias de MRSA presentes en la muestra original que fueron cultivables en el laboratorio, y se denominan Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

B. Recuentos de células cultivables: Recubrimiento de la superficie con biocida y luego adición de bacterias

Las probetas de acero inoxidable se sumergieron en la composición A, se retiraron y se dejaron secar. Luego, se añadieron cultivos de MRSA (20 µl) a las probetas, y las probetas se incubaron a temperatura ambiente durante 0 horas (control) o 2 horas. Después de la incubación, las células se retiraron de las probetas mediante agitación de vórtice en PBS con perlas de vidrio, y la solución resultante se diluyó y se colocó en placas de agar nutritivo. Después de la incubación durante la noche a 37° C, se contaron las células viables.

C. Tinción de microscopía LIVE/Dead

Los experimentos se realizaron como se ha mencionado anteriormente, y después de la incubación, se añadió tinción fluorescente LIVE/Dead a las probetas de acero, y se incubó en la oscuridad durante 15 minutos. Se usó microscopía de epifluorescencia para observar el número total de células (verde) en comparación con las células muertas con membranas citoplasmáticas dañadas (rojo).

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

Se añadió una alícuota de 100 µl de un cultivo de *E. coli* durante la noche (cepa DH5-α) a 900 µl de tampón PBS o a 900 µl de biocida (5% v/v). Después de 2 horas de incubación, las células se sedimentaron por centrifugación y luego se resuspendieron en 1 ml de PBS. Esto se añadió luego a 9 ml de caldo R2 al 50%. Se añadió ácido pipemídico (concentración final 100 µg/ml) a la solución para detener la replicación de células vivas, haciendo que las células vivas se alarguen. Las muestras se incubaron durante 18 horas a 22° C, antes de teñir con tinción fluorescente SYTO9. Una alícuota de 1 ml de la muestra se filtró a través de filtros de policarbonato de 0,2 µm y se examinó usando microscopía epifluorescente. Se contaron las células de longitud normal (muertas), al igual que las células alargadas (vivas).

Resultados:

A. y B. Recuentos de células cultivables

La composición A (a una concentración de 1 parte 'pura' a 19 partes de agua (1:19 v/v)) dio como resultado la muerte bactericida después de dos horas de tiempo de contacto. Sin embargo, el orden en que se añadieron las bacterias y el biocida a las probetas de acero resultó ser crucial para el efecto destructor de la composición. Si las probetas de acero inoxidable se habían recubierto previamente con MRSA, y los biocidas se añadieron posteriormente, se observó un efecto de destrucción de 1-2 logs usando métodos de cultivo (Tabla 1 y Figura 1). Sin embargo, si un probeta estéril se recubrió con biocida antes de que se introdujera el MRSA en el sistema, no se pudo detectar MRSA viable después de 2 horas de incubación con (Tabla 1 y Figura 2)

Tabla 1. Números de células viables cultivadas después de la incubación durante la noche. Las células cultivables se miden como unidades formadoras de colonias (UFC).

Condiciones	Número de células medio hora 0 (CFU ml ⁻¹)	Número de células medio 2 horas (CFU ml ⁻¹)	% de Supervivencia
Solo MRSA	4.13E+06	3.47E+06	83.87
MRSA prerrecubierto más SQ53	6.67E+05	1.97E+04	2.96
SQ53 prerrecubierto más MRSA	1.77E+06	0.00E+00	0.00

La Figura 1 muestra el recuento bacteriano cultivable medio después del tratamiento con la composición A. MRSA se recubrió previamente sobre probetas de acero, y se añadió el biocida SQ53. Cada barra es una media de 6 réplicas, con barras de error que indican el error estándar de las réplicas.

La Figura 2 muestra el recuento bacteriano cultivable medio después del tratamiento con composición. SQ53 se recubrió previamente sobre probetas de acero y se añadió MRSA. Cada barra es una media de 6 réplicas, con barras de error que indican el error estándar de las réplicas.

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

C. Recuento total de células usando tinción de viabilidad BacLight LIVE/Dead

10 Además de los métodos de cultivo, las células tratadas se tiñeron con tintes fluorescentes LIVE/Dead de manera que la proporción de células supervivientes pudiera enumerarse usando microscopía de epifluorescencia. Sin embargo, aunque fue posible recoger imágenes fluorescentes de células bacterianas totales usando la tinción LIVE/Dead, no fue posible observar la tinción fluorescente de células 'muertas' usando la tinción de yoduro de propidio (PI) para las membranas bacterianas comprometidas. Esto puede deberse a la acción de la composición A (es decir, SQ53), que se piensa que envuelve la célula bacteriana, afectando por tanto a la captación de moléculas más grandes, como la tinción PI 'muerta'.

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

20 Se realizó un experimento adicional para determinar la eficacia de los biocidas mediante microscopía. Para este experimento solamente, se usó una bacteria diferente, *E. coli*. Después del tratamiento con biocidas, las células se incubaron con un antibiótico, ácido pipemídico. Si hubiese células vivas, comenzarían a replicarse, pero serían incapaces de separarse físicamente, dando como resultado una célula alargada, fácilmente visible bajo el microscopio, mientras que las células muertas siguen siendo del tamaño de una única bacteria. Se fotografió una media de 50 campos de visión por tratamiento y, usando estos resultados, se puede calcular el total de células vivas y muertas por muestra original.

Cálculo de números de campos de visión por filtro:

30 Un campo de visión = 11623.58 μm^2
 Diámetro de la membrana del filtro = 21000 μm
 Área de la membrana del filtro (πr^2) = 346360590.1 μm^2
 Números de campos de visión por filtro = 346360590.1/11623.58
 = 23963.702 campos de visión

35 Por lo tanto, el recuento de células total medio por campo de visión se multiplicó por este factor para obtener el recuento total de células por filtro y, por tanto, el recuento total de células por muestra de 1 ml (los datos se muestran en la Tabla 2). Mediante este método, se pudo determinar que la composición A dio como resultado por lo menos una destrucción de 2 log, aunque en este ensayo, la composición A pareció dar como resultado la destrucción completa de las células de *E. coli* (Figura 3) Sin embargo, la composición tuvo un efecto adverso sobre el ensayo. Una vez que las células han sido tratadas con la composición, se vuelven mucho más pegajosas que las células de control. Esto significó que no pudimos resuspender completamente las células tratadas antes del ensayo de alargamiento celular, lo que dio como resultado una disminución en el número de células que podíamos contar (Tabla 2).

45 **Tabla 2. Número total de células de *E. coli* muertas y vivas determinadas mediante microscopía de epifluorescencia.** Las células por ml se determinaron calculando la media de células por campo de visión a partir de un total de 50 campos de visión, y luego calculando el número de celdas por filtro

	Número medio de células muertas (células ml ⁻¹)	Número medio de células alargadas (células ml ⁻¹)
50 Control (<i>E. coli</i> en PBS)	1.31E+07	1.31E+06
SQ53	5.18E+06	0.00E+00

55 La Figura 3 muestra el número total de células de *E. coli* muertas y vivas determinado usando el ensayo de alargamiento celular. Las barras indican el recuento de células muertas y los recuentos de células vivas (alargadas) como se determinaron por el ensayo de alargamiento celular, y las barras de error indican el error estándar de las réplicas.

60 El ensayo de alargamiento celular, llevado a cabo en *E. coli*, fue capaz de mostrar que la composición A, cuando se aplica a un cultivo celular, da como resultado la muerte celular completa. Se descubrió que la composición A es más efectiva que los líquidos de limpieza conocidos, al mismo tiempo que no incluye componentes que son perjudiciales para la salud humana o animal.

4. Pruebas comparativas

D C Watson realizó pruebas adicionales en Abbott Analytical, en New Ferry, Reino Unido, en virtud de un acuerdo de confidencialidad. Estas pruebas se realizaron bajo el mismo estándar europeo, usando una dilución 1:20 v/v de la versión 'pura' de la composición A.

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

10 Como comparación, las soluciones de Acticida BAC50M (cloruro de benzalconio), Acticida DDQ 50 (cloruro de didecil dimetilamonio), Acticida PHB 20 (clorhidrato de polihexametilen biguanida), Acticida L (Bronopol) y Acticida PCMC (P-cloro-m-cresol) Todos fueron probados individualmente en las mismas condiciones. En estas pruebas, estaban presentes las mismas cantidades relativas de etanol, etilenglicol y agua, que en la composición A.

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

20 El Acticida DDQ50 (cloruro de didecil dimetil amonio) en la misma concentración que en la composición A, cuando se diluye a 1:20 v/v, no cumple los requisitos de la EN 1276 para actividad bactericida (*Pseudomonas aeruginosa* (NCIMB 10421), *Escherichia coli* (NCTC 10418), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Enterococcus hirae* (NCIMB 8192)) en 5 minutos a 20° C en condiciones de suciedad contra todos los organismos de referencia detallados.

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

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

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

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

45 D C Watson llevó a cabo pruebas comparativas adicionales en Abbott Analytical, en New Ferry, Reino Unido, en virtud de un acuerdo de confidencialidad. Estas pruebas se realizaron bajo el mismo estándar europeo.

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

55 Como comparación adicional, diferentes soluciones de mezclas de tres (Tabla 2A) o cuatro o cinco (Tabla 2B) de: Acticida BAC50M (cloruro de benzalconio: referido como B en las tablas 2A y 2B), Acticida DDQ 50 (cloruro de didecil dimetil amonio: referido como A (es decir, el componente individual A en lugar de la composición A anterior) en las tablas 2A y 2B), Acticida PHB 20 (clorhidrato de polihexametilen biguanida: referido E en las tablas 2A y 2B), Acticida L (bronopol: referido como C en las tablas 2A y 2B) y Acticida PCMC (P-cloro-m-cresol: referido como D en las tablas 2A y 2B); se probaron todas en las mismas condiciones. En estas pruebas, estaban presentes las mismas cantidades relativas de etanol, etilenglicol y agua, que en la composición A. Los resultados de la Tabla 2A se obtuvieron usando una dilución 1:20 v/v de las composiciones 'puras'. Los resultados de la Tabla 2B se obtuvieron usando una dilución 1:60 v/v de las composiciones 'puras'.

65

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

Mezcla	Reducciones Lg contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ABC	4.04
BCD	3.96
CDE	<3.86
DEA	4.47
ACE	4.50
BDA	3.97

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

Mezcla	Reducciones Lg contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EABC	4.32
ABCD	3.98
CDEB	<3.88
ACED	4.24
ABDE	4.61
ABCDE	>5.24

Las Tablas 2A y 2B muestran que la combinación de Acticida BAC50M (cloruro de benzalconio: referido como B en las tablas 2A y 2B), Acticida DDQ 50 (cloruro de didecil dimetilamonio: referido como A (es decir, el componente individual A en lugar de la composición A anterior) en las tablas 2A y 2B), Acticida PHB 20 (clorhidrato de polihexametilen biguanida: referido como E en las tablas 2A y 2B), Acticida L (Bronopol: referido como C en las tablas 2A y 2B) y Acticida PCMC (P-cloro-m-cresol: referido como D en las tablas 2A y 2B) proporciona una mayor reducción logarítmica contra *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 13359) que cualquier componente por sí solo y cualquier combinación posible de tres o cuatro de los componentes. Como se muestra en la Tabla 2B, las diluciones más altas también proporcionan un efecto desinfectante. Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que la combinación de Acticida BAC50M, Acticida DDQ 50, Acticida PHB 20, Acticida L y Acticida PCMC, de acuerdo con las composiciones de la presente invención, proporciona un efecto sinérgico al proporcionar una acción desinfectante.

Pruebas de agua desinfectante

La Dra. Susanna Sherwin y el Profesor Bill Keevil, en virtud de un acuerdo de confidencialidad, en la Unidad de Salud Ambiental de la Universidad de Southampton, Reino Unido, llevaron a cabo pruebas sobre la eficiencia de la composición A como tratamiento de aguas. A continuación se exponen sus métodos y resultados, con referencia a las figuras.

1. Inactivación de *Cryptosporidium parvum*

Las pruebas apuntaban a determinar la concentración de biocida SQ53 (composición A pura) necesaria para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium parvum*. Esto se evaluó mediante tinción Live/Dead, que detecta si la membrana del ooquiste se ha dañado lo suficiente como para que la tinción 'muerta' se introduzca en la célula.

Se usó un intervalo de diluciones del biocida SQ53 puro. Se detallan en la Tabla 3 a continuación, junto con las partes por millón de ingredientes activos para cada dilución. Las concentraciones conocidas como 1:19 v/v y 1:15 v/v se denominan en esta evaluación del tratamiento de agua como diluciones al 5% y al 6n25%, respectivamente.

Tabla 3 Concentraciones de biocida SQ53 utilizadas en el estudio, junto con sus niveles equivalentes de ppm.

	Diluciones de SQ53 concentrada usadas en estudios (%)	Partes reales por millón (ppm) de diluciones
5	10.00	16,140.00
	6.25	10,087.50
	5.00	8,070.00
10	2.00	3,228.00
	1.00	1,614.00
	0.50	807.00
	0.20	322.80
15	0.10	161.40

A. Incubación de *C. parvum* con biocida y posterior tinción de ooquistes vivos/muertos

20 Se recibieron ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en una muestra de 1 ml con un total de 1×10^7 ooquistes. Cada réplica usada en este estudio consistía de una alícuota de 10 μ l de este stock, que contenía una media de 1×10^5 ooquistes. Cada concentración de biocida examinada tenía tres réplicas por punto temporal examinado.

25 Cada alícuota de ooquistes se incubó durante 24 horas en un volumen final de 100 μ l que contenía uno de un intervalo de concentraciones de biocidas SQ53 (Tabla 3). 1 hora antes del punto temporal, los controles se sometieron a 1 ml de HBSS acidificado (solución de sales equilibradas de Hanks (pH 2,75)) para permitir que la tinción DAPI penetrara en la membrana celular. Las incubaciones con el biocida se produjeron a 37^o C, en la oscuridad.

30 En cada punto temporal, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm en una microcentrífuga durante 95 segundos, el sobrenadante (que contenía el biocida) se eliminó cuidadosamente y el sedimento se resuspendió (mediante agitación en vórtice) en HBSS neutro (pH 7) y se lavó repitiendo este proceso tres veces. Después del paso final de centrifugación, se dejaron 100 μ l de sobrenadante de HBSS con los ooquistes sedimentados, y se añadieron a las muestras 10 μ l de DAPI y 10 μ l de PI. Los ooquistes se resuspendieron mediante agitación en vórtice y se incubaron con las tinciones Live/Dead durante 2 horas a 37^o C en la oscuridad.

35 Después de la incubación con las tinciones Live/Dead, los ooquistes se lavaron de nuevo 2 veces por centrifugación y resuspensión en HBSS neutro. Después del paso final de centrifugación, se dejaron 10-20 μ l de sobrenadante con la muestra, los ooquistes se resuspendieron mediante agitación en vórtice y el volumen total se colocó en un portaobjetos de vidrio y se dejó secar. Una vez que la muestra se secó, se usó aceite de inmersión para colocar un cubreobjetos y se realizó una microscopía de los portaobjetos en el plazo de 48 horas tras la preparación de la muestra.

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

45 Los ooquistes de *C. parvum* se analizaron para detectar la presencia de la tinción 'muerta' PI y la contratinción DAPI. Cada muestra se examinó bajo microscopía de epifluorescencia de inmersión en aceite, y se tomaron fotografías de tantos ooquistes como fuera posible, para permitir un recuento de >100 ooquistes por réplica cuando era posible. Si los números de ooquistes eran bajos, se tomaron fotografías de todos los ooquistes visualizados. Luego se contaron los números de células muertas y vivas, y se calculó el porcentaje de ooquistes vivos para cada muestra replicada. Se calculó el porcentaje de supervivencia medio a través de las réplicas.

50 La Figura 4 muestra el porcentaje de supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* después de 24 h de incubación con un intervalo de concentraciones de biocida SQ53 (barras grises). La línea gris oscura muestra los ooquistes totales contados para generar el porcentaje de supervivencia para cada barra. Se muestran barras de error estándar.

C. 24 h de incubación con biocida

60 En la Figura 4 se muestran los niveles de *C. parvum* "vivo" recuperados de las muestras después de la incubación con biocida SQ53 durante 24 h. Las concentraciones más bajas de biocida (0,01-0,02% de SQ53) mostraron un máximo de solo un 16% de reducción de ooquistes viables después de 24 horas, mientras que las concentraciones de biocida que fueron del 0,5% del concentrado y más mostraron una reducción del 80-90% de los ooquistes viables, con la concentración de biocida más alta mostrando una reducción del 97% de ooquistes viables.

Los niveles de recuperación de ooquistes fueron altos en este estudio y no mostraron correlación con el nivel de supervivencia de ooquistes en las muestras, lo que significa que los resultados pueden tratarse con confianza alta.

Como se ha mencionado anteriormente, la contaminación de la piscina y las aguas recreativas con el organismo *C. parvum* es un problema grave en todo el mundo, por ejemplo, en el Reino Unido. Una vez que se contaminan las aguas, es fácil que el organismo se transmita a los humanos y puede producirse una infección con tan solo 132 ooquistes (DuPont et al., (1995), The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* en Healthy Volunteers, 332(13):855-859). El tratamiento actual de estas aguas con cloro es ineficaz para eliminar este organismo, ya que estudios anteriores han demostrado que el tratamiento con 4 ppm de cloro a pH 7 durante 25 horas no produjo una disminución en la viabilidad celular como se observa en el ensayo DAPI/PI, y solo una reducción del 40% en la viabilidad celular cuando se usa el ensayo de exquistación (Widmer, (2002), Molecular mechanisms of chemical inactivation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts, AWWA Research Foundation).

Al contrario que esto, estas pruebas muestran que el biocida SQ53 (composición A pura) puede dar como resultado una reducción del 80-90% en la viabilidad celular, cuando se usan concentraciones del 0,5% y más altas. Si se usan concentraciones del 10%, puede verse una reducción del 97% (Figura 4) Este es un tratamiento mucho más eficiente que 4 ppm de cloro.

2. Inactivación de *Klebsiella pneumoniae*

La Dra. Susanna Sherwin y el Profesor Bill Keevil, en virtud de un acuerdo de confidencialidad, en la Unidad de Salud Ambiental de la Universidad de Southampton, Reino Unido, también probaron la acción de SQ53 (composición A) contra la bacteria altamente resistente a los antibióticos *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 (Nueva Delhi metalo-β-lactamasa). Se usaron las mismas concentraciones que las mostradas en la Tabla 3 anterior.

La *Klebsiella pneumoniae* se cultivó a 22° C durante la noche en caldo LB, con agitación orbital a 150 rpm, hasta una densidad óptica (DO₆₂₀) de 0,6. El biocida SQ53 (composición A) se diluyó en agua estéril, y los stocks de trabajo se calcularon de modo que se pudieran añadir 20 µl de cada stock de trabajo a 180 µl de cultivo para crear las concentraciones finales mostradas en la Tabla 3 anterior. Cada pocillo de control recibió 20 µl de agua estéril en lugar de biocida. Tras la adición del cultivo, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas, y se tomaron muestras para colocar en placas a las 0 horas, 2 horas y 4 horas. Las muestras se neutralizaron con caldo neutralizante, se diluyeron en LB y se colocaron en placas de agar LB. Las placas se incubaron a 37° C durante la noche antes de contar las células viables (UFC).

A las 2 horas de exposición al biocida, se incubó una dilución 1/100 del cultivo tratado en la oscuridad con 50 µl de tinción live/dead durante 30 minutos. Se filtraron 100 µl de esta muestra sobre un filtro de policarbonato negro de 0,2 µm de tamaño de poro y se registraron los recuentos celulares del total de células vivas y muertas con microscopía de contraste de interferencia diferencial por episcópica/epifluorescencia (EDIC/EF). Se tomó una imagen de cada filtro en 10 campos de visión aleatorios, y se usaron medias de estos para calcular el recuento total de células por ml de muestra filtrada.

Cálculo de números de campos de visión por filtro:

Un campo de visión	= 11623.58 µm ²
Diámetro de la membrana del filtro	= 21000.00 µm
Área de la membrana del filtro (π r ²)	= 346360590.10 µm ²
Números de campos de visión por filtro	= 346360590.10/11623.58
	= 29798.099 campos de visión

Por lo tanto, el recuento total de células medio por campo de visión se multiplicó por este factor para obtener el recuento total de células por filtro y, por lo tanto, podríamos calcular el recuento total de células por 1 ml de cultivo original.

El tratamiento de la bacteria *K. pneumoniae* con concentraciones de SQ53 del 2% o más dio como resultado una reducción de 8 log de las unidades formadoras de colonias (UFC), sin detectar bacterias cultivables a tanto las 2 como las 4 horas (Figura 5 y Tabla 4). Sin embargo, cuando se usaron concentraciones más bajas de biocida SQ53, la capacidad de cultivo de las bacterias fue más variable, con reducciones de bacterias de 4 a 5 log y de 3 a 7 log (a las 2 h y las 4 h respectivamente), que fueron proporcionales a la concentración de biocida probado.

Figura 5: Capacidad de cultivo bacteriana de *K. pneumoniae* después del tratamiento con varias concentraciones de biocida SQ53. La *K. pneumoniae* se trató con SQ53 durante 2 y 4 horas. Cada estudio examinó la eficacia de las concentraciones de biocidas entre el 0,1 y el 10%. Las unidades formadoras de colonias (UFC·ml⁻¹) se calcularon después del crecimiento nocturno a 37° C

Tabla 4. Reducciones logarítmicas en *Klebsiella pneumoniae* después de la incubación con 0,1-10% de biocida SQ53.

	Concentración de biocida (%)	Ensayo de placa de agar 2H	Ensayo de placa de agar 4H
5	10.00	3.08E+08	3.08E+08
	6.25	3.08E+08	3.08E+08
10	5.00	3.08E+08	3.08E+08
	2.00	3.08E+08	3.08E+08
	1.00	3.08E+08	2.80E+07
15	0.50	3.51E+05	3.08E+08
	0.20	1.29E+05	6.14E+04
	0.10	3.84E+04	3.08E+03
20	0.00	1.00E+00	1.00E+00

Para la bacteria *K. pneumoniae*, las pruebas de cultivo estándar demostraron que la incubación con el biocida SQ53 dio como resultado una reducción de 4 a 5 logs de la bacteria a concentraciones de biocida del 1% o menos a las 2 horas, y una reducción de 3 a 7 logs de la bacteria a concentraciones de biocida del 1% o menos a las 4 horas. A concentraciones de biocida del 2% y más, se observó una reducción de 8 log de bacterias, sin que se detectaran células cultivables (Figura 5 y Tabla 4). Esto significa que a concentraciones del 2% y superiores, el biocida SQ53 inactiva 8 log de organismos de *K. pneumoniae*.

3. Características deseables de un tratamiento de agua.

La Tabla 5 analiza, cualitativamente, las propiedades deseables de los biocidas para el tratamiento de agua. La Tabla 5 es un extracto modificado del libro "Directory of Microbicides for the Protection of Materials", editado por Wilfried Paulus, Kluwer Academic Publishers, 2004, Sección 5.3, Unhoch et al., "Recreational Water Treatment Biocides". Este extracto establece que las "características requeridas" en la columna de la izquierda de la Tabla 5 son características deseadas de los biocidas para el tratamiento del agua, por ejemplo para su uso en la desinfección de sistemas de aguas recreativas.

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

Estabilidad

Se ha descubierto que la composición A es estable, es decir, no pierde nada de su actividad en la limpieza de superficies, hasta 12 meses después de la preparación inicial de la composición.

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

Cuando se usan en esta especificación y en las reivindicaciones, los términos "comprende" y "que comprende" y variaciones de los mismos significan que se incluyen las características, pasos o números enteros especificados. No debe interpretarse que los términos excluyen la presencia de otras características, pasos o componentes.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. El uso de una composición, o una mezcla acuosa que comprende agua y una composición, contra una biopelícula, en donde la composición comprende:

5

cloruro de benzalconio,
cloruro de didecil dimetil amonio,
clorhidrato de polihexametilen biguanida,
bronopol,
10 p-cloro-m-cresol,
etanol y
etilenglicol,

en donde el uso no está en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

15

2. El uso de la reivindicación 1, en donde la composición o mezcla acuosa es para su uso contra una biopelícula en un sistema de agua, preferiblemente en donde el sistema de agua es un sistema de agua recreativa.

3. El uso de una composición, o una mezcla acuosa que comprende agua y una composición, para limpiar una superficie, en donde la composición comprende:

20

cloruro de benzalconio,
cloruro de didecil dimetil amonio,
clorhidrato de polihexametilen biguanida,
bronopol y
25 p-cloro-m-cresol,

en donde el uso no está en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

30

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la composición o la mezcla acuosa se aplica a la superficie mediante una mopa, esponja, paño, toalla, guante o toallita.

5. El uso de una composición, o una mezcla acuosa que comprende agua y una composición, para desinfectar un suministro de agua, en donde la composición comprende:

35

cloruro de benzalconio,
cloruro de didecil dimetil amonio,
clorhidrato de polihexametilen biguanida,
bronopol y
40 p-cloro-m-cresol.

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la composición o la mezcla acuosa se usa como un suplemento, o además, del tratamiento de agua con cloro.

45

7. Una composición, o una mezcla acuosa que comprende agua y una composición, para su uso en la desinfección de un área de la piel, en donde la composición comprende:

50

cloruro de benzalconio,
cloruro de didecil dimetil amonio,
clorhidrato de polihexametilen biguanida,
bronopol y
55 p-cloro-m-cresol,

y en donde la composición o la mezcla acuosa se introduce en la piel mediante una toallita o mediante pulverización.

55

8. Un método para preparar una composición que comprende los siguientes componentes:

60

cloruro de benzalconio,
cloruro de didecil dimetil amonio,
clorhidrato de polihexametilen biguanida,
bronopol y
65 p-cloro-m-cresol,

en donde el método comprende proporcionar los componentes de la composición y mezclar los componentes en un mezclador.

65

9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-6, la composición o mezcla acuosa para el uso de acuerdo con la reivindicación 7 o el método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la composición comprende adicionalmente etanol y etilenglicol.

5 10. El uso de la mezcla acuosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la mezcla acuosa para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la mezcla acuosa consiste de, en % en peso:

10 3 de cloruro de benzalconio;
3 de cloruro de didecil dimetil amonio;
3,3 de clorhidrato de polihexametilen biguanida;
0,9 de bronopol;
0,04 de p-cloro-m-cresol;
4,9 de etanol;
1,0 de etilenglicol; y
15 83,86 de agua.

11. El uso de la mezcla acuosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la mezcla acuosa para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la mezcla acuosa consiste de, en % en peso:

20 0,15 de cloruro de benzalconio;
0,15 de cloruro de didecil dimetil amonio;
0,165 de clorhidrato de polihexametilen biguanida;
0,045 de bronopol;
0,002 de p-cloro-m-cresol;
25 0,245 de etanol;
0,05 de etilenglicol; y
99,193 de agua.

12. Una mezcla acuosa que consiste de:

30 3% en peso de cloruro de benzalconio;
3% en peso de cloruro de didecil dimetil amonio;
3,3% en peso de clorhidrato de polihexametilen biguanida;
0,9% en peso de bronopol;
35 0,04% en peso de p-cloro-m-cresol;
4,9% en peso de etanol;
1,0% en peso de etilenglicol; y
83,86% en peso de agua,

40 o una mezcla acuosa que consiste de:

45 0,15% en peso de cloruro de benzalconio;
0,15% en peso de cloruro de didecil dimetil amonio;
0,165% en peso de clorhidrato de polihexametilen biguanida;
0,045% en peso de bronopol;
0,002% en peso de p-cloro-m-cresol;
0,245% en peso de etanol;
0,05% en peso de etilenglicol; y
50 99,193% en peso de agua,

13. Una toallita para la aplicación en la piel, la toallita comprendiendo una mezcla acuosa que consiste de:

55 3% en peso de cloruro de benzalconio;
3% en peso de cloruro de didecil dimetil amonio;
3,3% en peso de clorhidrato de polihexametilen biguanida;
0,9% en peso de bronopol;
0,04% en peso de p-cloro-m-cresol;
4,9% en peso de etanol;
1,0% en peso de etilenglicol; y
60 83,86% en peso de agua,

14. Una toallita para la aplicación en la piel, la toallita comprendiendo una mezcla acuosa que consiste de:

65 0,15% en peso de cloruro de benzalconio,
0,15% en peso de cloruro de didecil dimetil amonio,

5 0,165% en peso de clorhidrato de polihexametilen biguanida,
0,045% en peso de bronopol,
0,002% en peso de p-cloro-m-cresol,
0,245% en peso de etanol,
0,05% en peso de etilenglicol; y
99,193% en peso de agua,

15. Una mezcla acuosa que consiste de:

10 3% en peso de cloruro de benzalconio;
3% en peso de cloruro de didecil dimetil amonio;
3,3% en peso de clorhidrato de polihexametilen biguanida;
0,9% en peso de bronopol;
15 0,04% en peso de p-cloro-m-cresol;
4,9% en peso de etanol;
1,0% en peso de etilenglicol; y
83,86% en peso de agua,

20 para su uso en la desinfección de un área de la piel, o
una mezcla acuosa que consiste de:

25 0,15% en peso de cloruro de benzalconio,
0,15% en peso de cloruro de didecil dimetil amonio,
0,165% en peso de clorhidrato de polihexametilen biguanida,
0,045% en peso de bronopol,
0,002% en peso de p-cloro-m-cresol,
0,245% en peso de etanol,
0,05% en peso de etilenglicol; y
99,193% en peso de agua,

30 para su uso en la desinfección de un área de la piel.

35

40

45

50

55

60

65

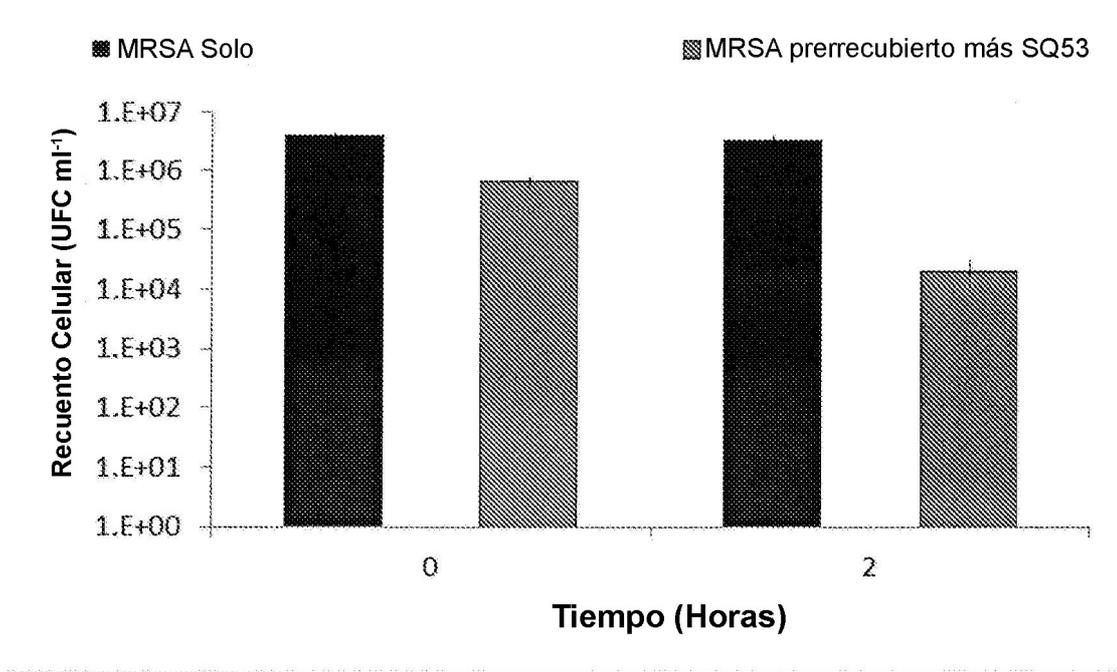


Figura 1

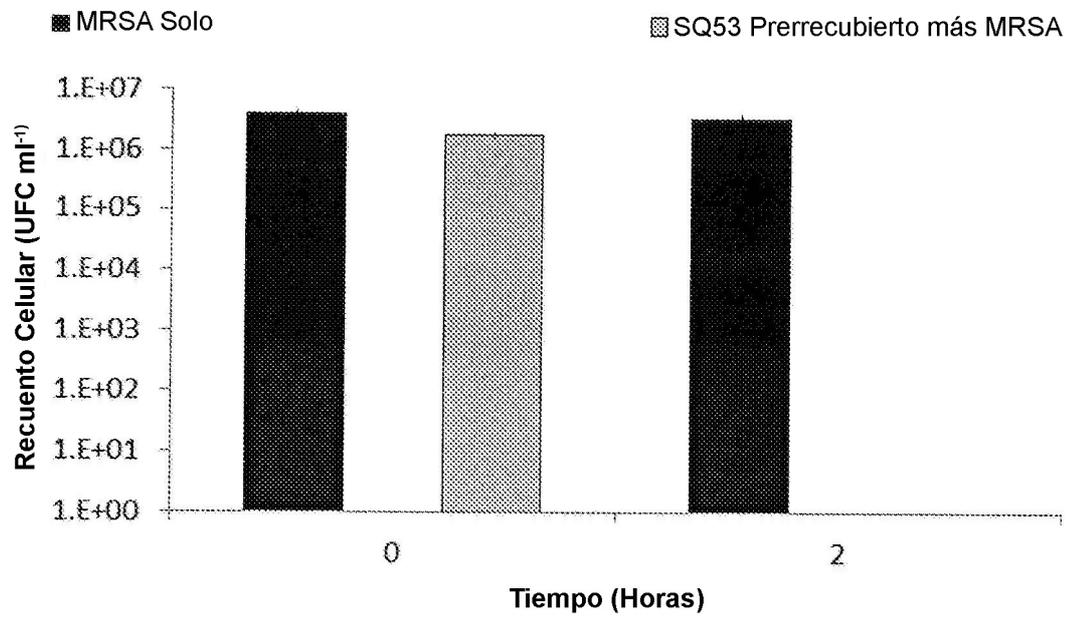


Figura 2

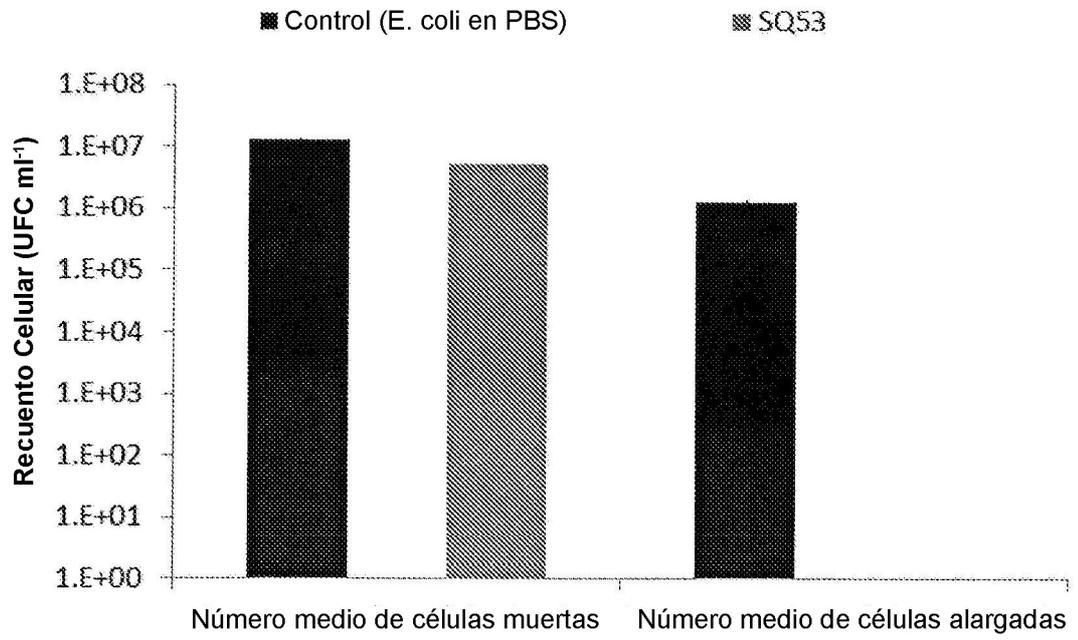


Figura 3

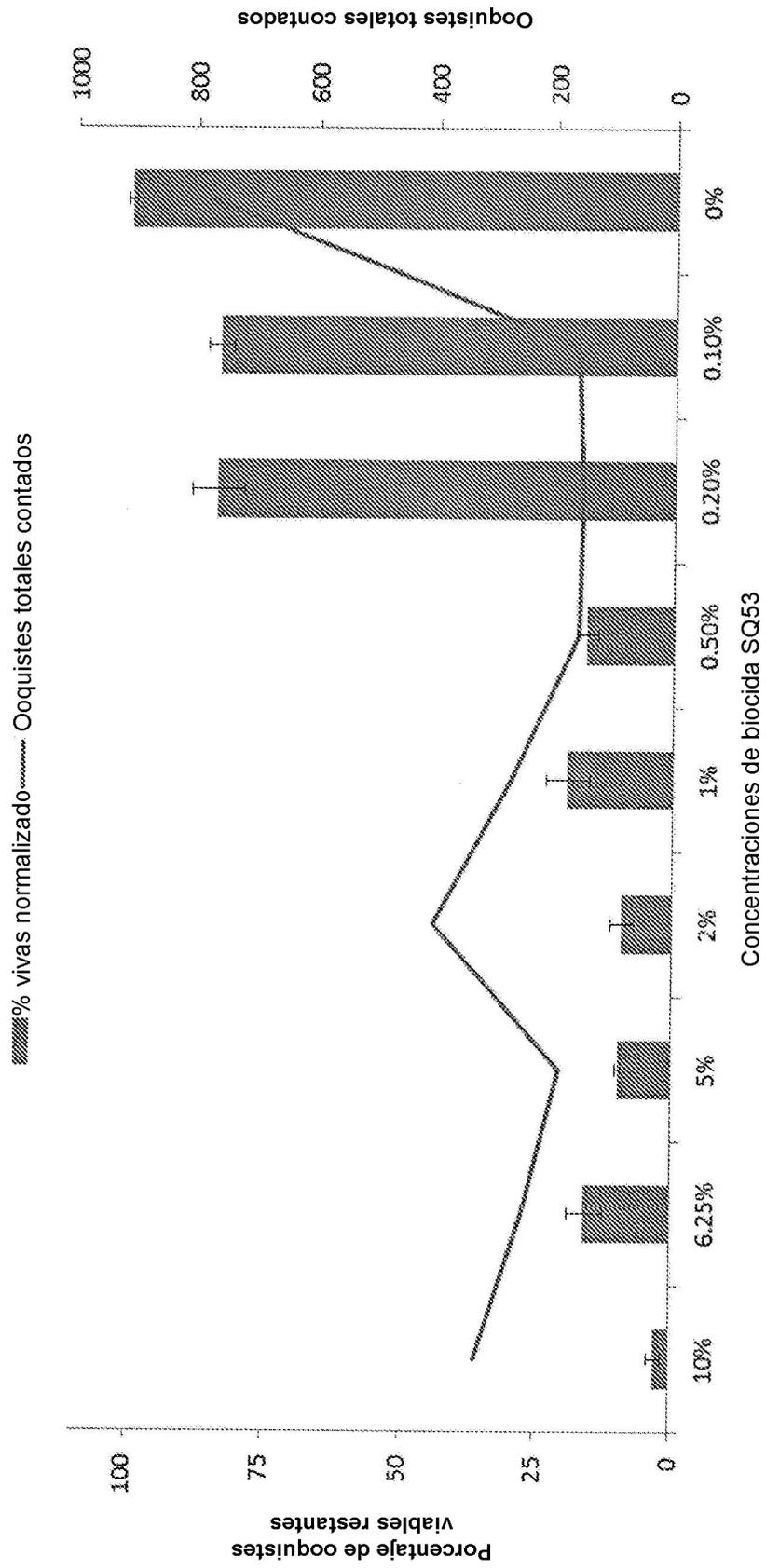


Figura 4

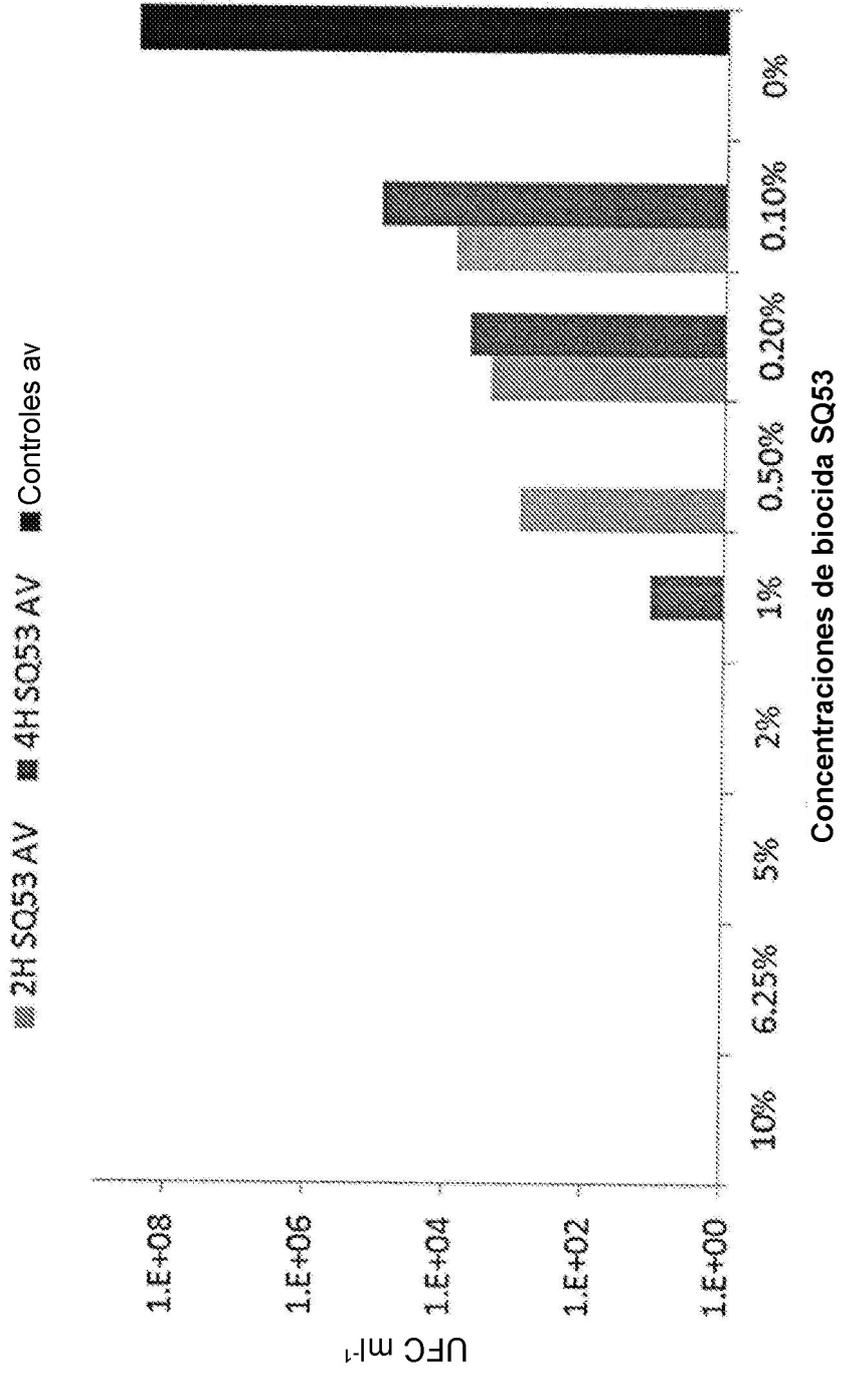


Figura 5

Tabla 5

Característica requerida	Salas de Cobre	Plata Coloidal	Cloro	Bromo	Polihexametileno biguanida	Ozono	UV	SQ 53
Eficaz tanto contra patógenos como microorganismos molestos	Parcial	Parcial	Sí	Sí	Parcial	Sí	Sí	Sí
Orden bajo de toxicidad o preferiblemente no tóxico para la vida humana, animal y vegetal	Parcial	Parcial	Sí	Parcial	Sí	Si se controla	Sí	Sí
Seguro de manejar	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
No se degrada en contacto o reacciona con otros productos químicos para piscinas o spas para formar subproductos de la desinfección dañinos	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Vida útil adecuada a temperaturas de almacenamiento de un mínimo de 1 año	Sí	Sí	No	No	Sí	N/A	N/A	Sí
Eficaz en presencia de y estable a impurezas orgánicas de bañistas y el entorno, temperatura del agua alta y baja, variaciones de pH, diferentes calidades de agua y luz solar	No	No	No	No	Sí	Sí	No	Sí
No debe impartir color, olor o sabor al agua	Sí	Sí	No	No	Sí	No	Sí	Sí
Puede controlarse con un único punto de kit de prueba de uso	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí
No debe decolorar/dañar las superficies y los equipos de la piscina y spa	No	No	No	No	Sí	No	Sí	Sí
Rendimiento de floculación	No	No	No	No	No	No	No	Sí
Biopelícula	No	No	Parcial	Parcial	Parcial	Parcial	No	Sí