

**MEDIDA DE RESIDUAL DE CLORURO DE BENZALCONIO TRAS APLICACIÓN EN
SUPERFICIE ESTANDARIZADA. ENSAYO TRAS 5 DÍAS DE APLICACIÓN.**

- a) Identificación del laboratorio de ensayo: Clean-Biotec
- b) Identificación de la muestra
Nombre del producto: EXQUAT 50
Número de lote: 0071T200990
Fabricante: TQC
Fecha de entrega: 20/10/2020
Condiciones de almacenamiento: Lugar fresco y seco
Diluyente del producto recomendado por el fabricante: acuoso
Sustancia(s) activa(s) y su(s) concentración(es) (opcional): Cloruro del benzalconio (50% p/v)
- c) Método de ensayo y su validación
Superficie tratada: Disco de acero inoxidable estandarizado 304 de 2 cm diámetros acabado por ambos lados grado 2b.
Método: extracción en agua y tampón Fosfato y medida por espectrofotometría de absorción molecular 460 nm. Basado en Lowry, J.B. 1979 y Baroni, S. et al. 2016.
Neutralizador: No Aplica
- d) Condiciones experimentales
Periodo de análisis: 14/01/2021 –19/02/2021
Diluyente del producto utilizado durante el ensayo: Agua ultrapura estéril
Concentraciones de ensayo del producto: 1/1000 y 2/1000
Aspecto de las diluciones del producto: Transparente.
Sustancias interferentes: Solución de albúmina bovina (fracción V)
 Condiciones limpias: Concentración final de albúmina bovina 0,3 g/l
 Condiciones sucias: Concentración final de albúmina bovina 3,0 g/l
Temperatura de ensayo: 20°C
Tiempo de contacto con la superficie: 24, 48, 72, 96, 120 h.
Temperatura de incubación: N/A
- e) Resultados del ensayo
Véanse las tablas y figuras
- f) Conclusiones:
- 1. La concentración de Cloruro de benzalconio aplicada en las superficies presenta una ligera variación no significativa entre el día de aplicación y el último día de estudio, independientemente de las condiciones.**
 - 2. La concentración de Cloruro de benzalconio aplicada en las superficies es diferente y siempre menor en condiciones sucias que en limpias desde el momento de aplicación, lo que indica que hay interferencia de la albúmina (3 g/l) en el producto desinfectante.**
 - 3. El mantenimiento durante 5 días de la concentración de Exquat 50 en el control y en condiciones limpias indica que durante ese tiempo sigue teniendo función desinfectante, hecho avalado por los resultados obtenidos en los estudios realizados para *Staphylococcus aureus* (20210216) y para el plásmido SARS-CoV-2 (20210218).**

g) Localidad, fecha y firma identificada

En Logroño, a 22 de febrero de 2021

Firmado: Dra. M^a Angélica García Álvaro



Clean-Biotec
Biología Ambiental
C.I.F. B-26340950

Este informe es de uso exclusivo para el cliente y solo se podrá hacer copia del mismo para su presentación ante la Autoridad Sanitaria de su País. Cualquier otro uso debe ser comunicado y autorizado por escrito por Clean-Biotec y las condiciones que Clean-Biotec, SL establezca.

Objetivo

Comprobar la permanencia del residual de Cloruro de benzalconio del producto Exquat 50 aplicada en una superficie estandarizada a lo largo de cinco días en condiciones limpias y sucias

Metodología

Se ha llevado a cabo la medida a lo largo de cinco días de la concentración de Cloruro de Benzalconio contenida en una superficie estandarizada de acero inoxidable, tras su aplicación en dilución 1/1000 y 2/1000. Se ha tenido en cuenta las condiciones de limpieza y suciedad aplicando solución de albúmina al 0,3 g/l y 3 g/l, respectivamente.

Tabla 1. Tratamientos llevados a cabo para control de la concentración de desinfectante.

Dilución	Tratamiento
1/1000	Agua
	Albúmina 0,3 g/l
	Albúmina 3,0 g/l
2/1000	Agua
	Albúmina 0,3 g/l
	Albúmina 3,0 g/l

El día 0 se incorporaron 100 µl de Exquat 50 en dilución 1/1000 a 45 discos y en dilución 2/1000 a otros 45 discos. Se dejaron secar en estufa a 36°C.

Tras la exposición de los discos a cada una de las soluciones de Exquat 50, 1/1000 y 2/1000 durante 24, 48, 72, 96 y 120 h se lavaron 3 discos por el lado impregnado.

De la solución 1/1000 se lavaron 3 discos con 1,5 ml de agua (control), sobre sendos tubos de ensayo, 3 discos con 1,5 ml de albúmina 0,3 mg/l (condiciones limpias) sobre sendos tubos de ensayos y otros 3 discos con 1,5 ml de albúmina 3 mg/l (condiciones sucias) sobre sendos tubos de ensayo. Lo mismo se realizó con los discos que habían impregnados con la solución 2/1000.

A cada uno de los 18 tubos obtenidos cada día les añadía 1,5 ml de tampón fosfato 0,1M a pH 7,5, se agita en vórtex y se añadía 0,5 ml de solución de Azul de Bromotimol 0,5mM, se agitaba y tras 10 minutos se medía la absorbancia a 460 nm. Se hizo una medida inicial a t=0 aplicando las mismas condiciones que para las muestras diaria.

Tabla 2. Valores de Concentraciones y absorbancias obtenidas

Patrones Conc Cloruro de benzalconio mg/l	Absorbancia a 460 nm
10	0,119
20	0,248
30	0,402
40	0,551
50	0,701
60	0,865

La recta de calibrado se muestra a continuación, se hicieron patrones desde 10 mg/l a 60 mg/l de Cloruro de Benzalconio y siguiendo los mismos pasos que para las muestras se midieron las absorbancias a 460. Cada día se comprobó con el patrón de 40 que la recta obtenida seguía vigente, puesto que se utilizaron los mismos reactivos.

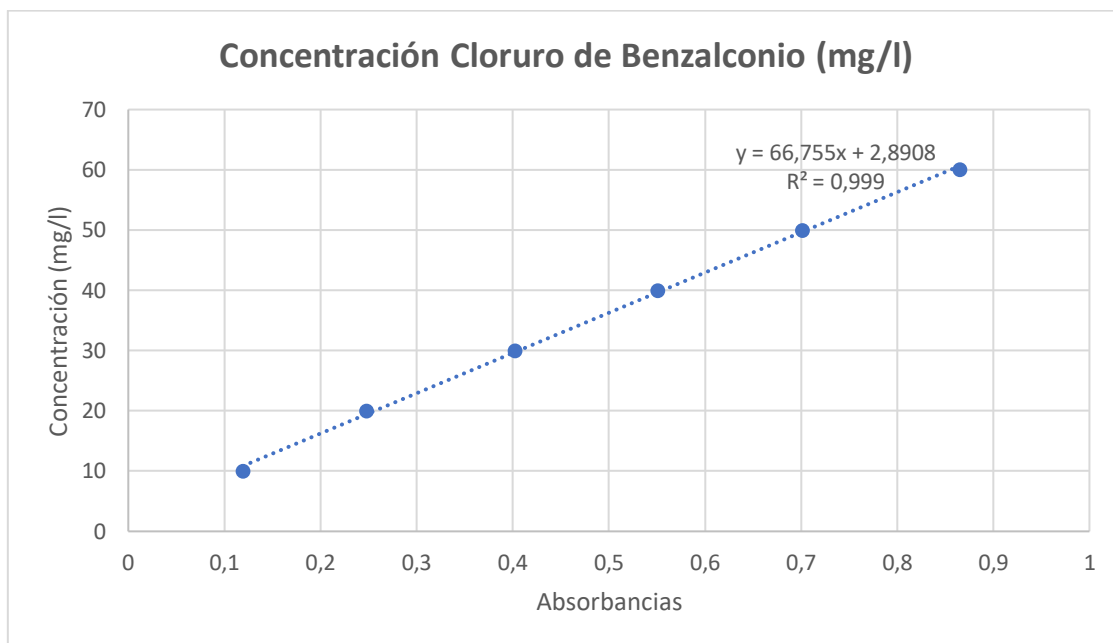


Figura 1: Recta de calibración para patrones bajos entre 10 y 60 mg/l de Cloruro de benzalconio. Se muestra la ecuación lineal de ajuste y su coeficiente de determinación R^2 .

Resultados de los tratamientos

Tabla 3. Resultados de residual de Cloruro de benzalconio dilución 1/1000 aplicado en los discos.

1/1000	Control agua	Condiciones Limpias	Condiciones Sucias
0 h	31,26	31,66	28,72
	32,00	32,33	28,99
	32,20	31,93	28,79
media 0h +/-ET	31,68 +/- 0,27	31,97 +/- 0,10	28,84 +/- 0,14
24 h	31,73	31,53	28,72
	31,93	31,66	28,86
	32,20	31,26	28,86
media 24h +/-ET	31,95 +/- 0,17	31,48 +/- 0,14	28,81 +/- 0,05
48 h	31,33	31,33	29,66
	31,46	31,46	28,86
	32,13	32,13	29,19
media 48 h +/-ET	31,64 +/- 0,30	31,17 +/- 0,27	29,24 +/- 0,28
72 h	30,73	31,33	28,86
	32,00	30,66	28,12
	31,40	30,06	28,32
media 72h +/-ET	31,37 +/- 0,45	30,68 +/- 0,45	28,44 +/- 0,27
96 h	30,79	31,40	29,86
	31,46	30,46	29,19
	31,40	30,53	28,72
media 96 h +/-ET	31,22 +/- 0,26	30,79 +/- 0,27	29,26 +/- 0,40
120 h	31,19	31,33	27,92
	31,33	30,59	28,66
	31,06	30,73	28,99
media 120 h +/-ET	31,19 +/- 0,09	30,88 +/- 0,88	28,52 +/- 0,39

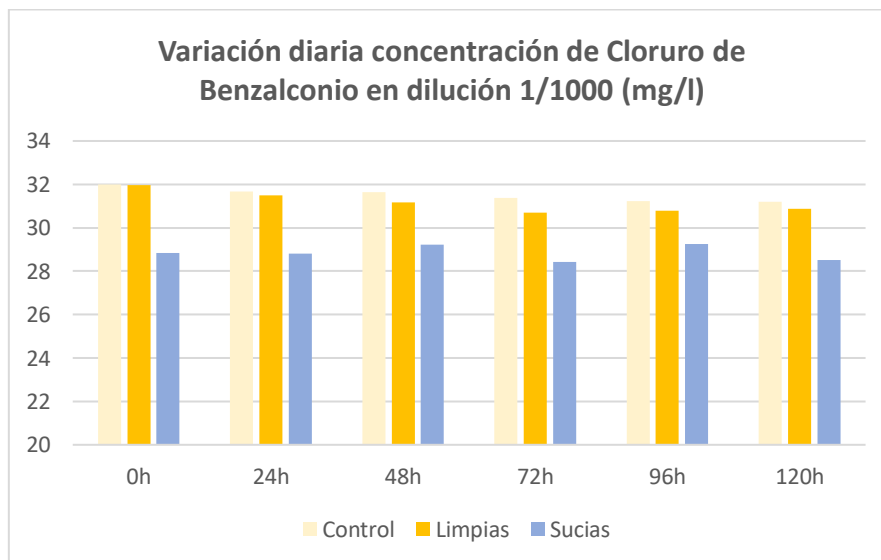


Figura 2: Variación diaria de la concentración de Exquat 50 dilución 1/1000 aplicado en los discos en el control y condiciones limpias y sucias

Tabla 4. Resultados de residual de Cloruro de benzalconio dilución 2/1000 aplicado en los discos.

2/1000	Control agua	Condiciones Limpias	Condiciones Sucias
0 h	59,57	59,43	52,82
	60,77	60,83	54,56
	60,77	60,37	54,89
media 0h +/-ET	60,37 +/- 0,49	60,21 +/- 0,50	54,09 +/- 0,79
24 h	60,23	59,37	52,89
	60,57	59,23	54,69
	60,77	59,70	54,56
media 24h +/-ET	60,52 +/- 0,19	59,43 +/- 0,17	54,05 +/- 0,71
48 h	60,17	60,63	54,69
	60,50	59,50	53,82
	60,63	59,37	54,23
media 48 h +/-ET	60,43 +/- 0,17	59,83 +/- 0,49	54,25 +/-0,31
72 h	60,50	59,90	53,36
	60,37	58,56	53,82
	59,83	59,03	54,36
media 72h +/-ET	60,23 +/- 0,25	59,17 +/- 0,48	53,85 +/- 0,35
96 h	61,23	59,37	52,49
	60,77	59,57	53,22
	59,23	57,70	55,09
media 96 h +/-ET	60,41 +/- 0,74	58,88 +/- 0,73	53,60 +/- 0,95
120 h	60,10	57,50	53,49
	60,63	58,43	53,22
	60,63	59,30	53,96
media 120 h +/-ET	60,46 +/- 0,22	58,41 +/- 0,64	53,56 +/- 0,26

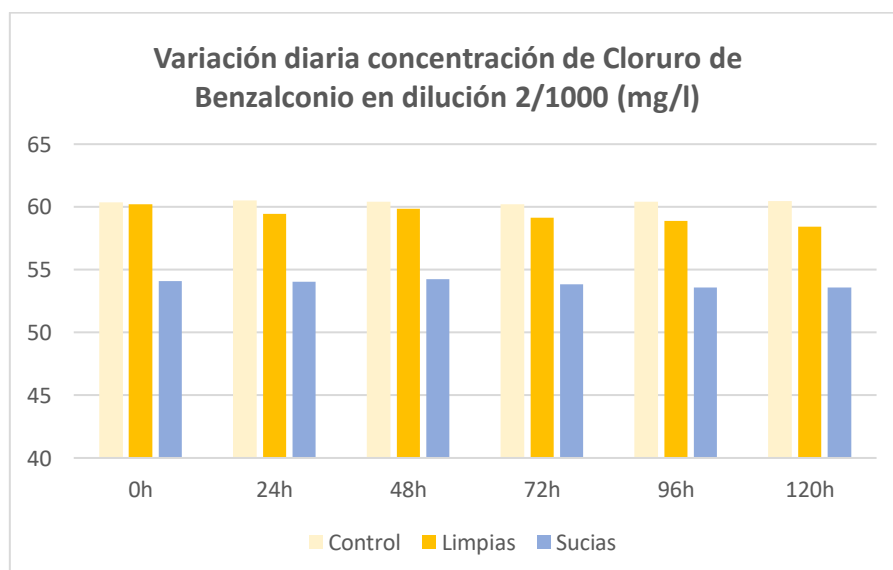


Figura 3. Variación diaria de la concentración de Exquat 50 dilución 2/1000 aplicado en los discos en el control y condiciones limpias y sucias.

Tabla 5. Probabilidades obtenidas en el estudio de diferencias significativas entre tratamientos cada día (valores de p al aplicar T-Student: $p < 0,05$ significativo; $p < 0,01$ muy significativo y $p < 0,001$ altamente significativo; $n=3$).

Dilución 1/1000			
	Limpias-Sucias	Control - Limpias	Control – Sucias
0 h	0,000	0,926	0,000
24 h	0,001	0,060	0,000
48 h	0,004	0,231	0,002
72 h	0,006	0,254	0,002
96 h	0,026	0,315	0,008
120 h	0,004	0,262	0,001
Dilución 2/1000			
0 h	0,001	0,800	0,001
24 h	0,001	0,006	0,000
48 h	0,000	0,231	0,000
72 h	0,000	0,073	0,000
96 h	0,006	0,144	0,002
120 h	0,001	0,020	0,000

Los resultados muestran que hay diferencias significativas entre el residual del Cloruro de Benzalconio cuando se aplica en condiciones limpias y sucias, en su mayoría con $p < 0,001$ y apenas entre el control y las condiciones limpias.

Tabla 6. Probabilidades obtenidas al comparar las concentraciones de Exquat 50 el día 0 y el quinto día (valores de p al aplicar T-Student: $p < 0,05$ significativo; $p < 0,01$ muy significativo y $p < 0,001$ altamente significativo; $n=3$).

Dilución	Control	Limpia	Sucia
1/1000	0,103	0,770	0,393
2/1000	0,849	0,053	0,474

Los resultados muestran que no hay diferencias entre la concentración del Cloruro de Benzalconio aplicada en la superficie entre el día de aplicación (0 h) y el último día de estudio (120 h).

Bibliografía

Baroni, S.; Calgano, M.L.; Fortunato, M.S.; Álvarez Rocandio, J.D.; Gallego, A. y Korol S.E. 2016. Evaluación de un método colorimétrico directo para la medición de Cloruro de Benzalconio. XXXI Congreso Argentino de Química.

Lowry, J.W. 1979 Direct Spectrophometric Assay of Quaternary Ammonium Compounds Using Bromthymol Blue. Journal of Pharmaceutical Sciences Vol 68, Nº 1