



## **INFORME FINAL**

# **“EFECTO DE AGUA ELECTROPEROXIDADA ActivH2O SOBRE EL CORONAVIRUS SARS-COV-2”**

Responsable del proyecto por parte del CSIC:

Fernando Usera Mena  
Servicio de Seguridad Biológica  
Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)

abril, 2021

## 1. INTRODUCCIÓN

El 31 de diciembre de 2019, la Comisión Municipal de Salud y Sanidad de Wuhan (Hubei, China) informó sobre un grupo de 27 casos de neumonía de etiología desconocida, con una exposición común a un mercado mayorista de marisco, pescado y animales vivos en la ciudad de Wuhan. La sintomatología del primer caso se registró el 8 de diciembre de 2019. El 7 de enero de 2020, se identificó como agente causante del brote un nuevo tipo de virus de la familia *Coronaviridae* que ha sido denominado SARS-CoV-2, cuya secuencia genética fue compartida por las autoridades chinas el 12 de enero (1).

El día 11 de marzo de 2020, la OMS declaró la COVID-19 como pandemia mundial. Desde el inicio de la epidemia hasta la fecha de este informe se han alcanzado 129 millones de casos en todo el mundo, con más de 2,81 millones de fallecidos. En España, se han alcanzado 3,28 millones de casos, con más de 75.000 fallecidos (1-4-2021).

Los coronavirus son virus zoonóticos, cuando afectan al ser humano (HCoV) pueden producir cuadros clínicos que van desde el resfriado común hasta otros más graves como los producidos por los virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (por sus siglas en inglés, SARS) y del Síndrome Respiratorio de Oriente Próximo (MERS-CoV) (2)

La vía de transmisión entre humanos de SARS CoV-2 parece similiar a SARS y MERS, a través de las secreciones de personas infectadas, principalmente por inhalación o contacto con gotas respiratorias en el rango de 5 micras (transmisión hasta 2 metros) y por contacto con las manos o los fómites contaminados con estas secreciones, seguido del contacto con la mucosa de la boca, nariz u ojos (3). Se ha comprobado que la permanencia de SARS-CoV-2 viable en aerosoles es de unas 3 horas, y en superficies de cobre, cartón, acero inoxidable y plástico de 4, 24, 48 y 72 horas respectivamente a una temperatura de 21-23 °C y un 40% de humedad relativa (4, 5). En posteriores estudios se ha demostrado como vía más probable de transmisión la inhalación de aerosoles contaminados finos o ultrafinos en espacios poco ventilados (6).

El periodo de incubación mediano es de 5-6 días, con un rango de 1 a 14 días. El 97,5% de los casos sintomáticos se desarrolla a los 11,5 días tras la exposición (7). El SARS-CoV-2 causa una patología leve o muy leve en el 80% de los infectados, mientras que en el resto de casos puede producir neumonía de distinta gravedad asociada a fiebre, dolor de cabeza, tos seca y dificultad respiratoria, que puede evolucionar hacia una inflamación exacerbada del pulmón y edema pulmonar. La enfermedad es más grave en pacientes de mayor edad, particularmente los que ya padecen otras patologías, como enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedad crónica respiratoria, infecciones por otros virus respiratorios o hipertensión y afecta a un número superior de hombres que de mujeres. Mediante modelización se ha estimado una letalidad entre los casos hospitalizados del 14% (8) y en el total de casos de entre 0,3 y 1% (9).

La COVID-19 se ha caracterizado por una alta transmisión intrahospitalaria. En Italia, se ha estimado que el 20% de los trabajadores sanitarios que han dado respuesta a la epidemia se han infectado en el plazo de un mes (9). En España el 18,5% de los casos notificados han sido trabajadores sanitarios, siendo significativamente mayor este porcentaje entre las mujeres que entre los hombres (26 vs 10,2%) (11).

La magnitud de la pandemia y la alta transmisibilidad del virus han puesto a prueba a los sistemas sanitarios de los países más afectados, produciéndose una crisis económica y social sin parangón a nivel mundial. Por ello, no es solamente esencial la obtención de tratamientos eficaces mediante inmunización y terapia, sino también, y no menos importante, la optimización de procesos de desinfección que sean capaces de eliminar los virus que se encuentren presentes en suspensión (aerosoles) y en superficies contaminadas con objeto de romper la cadena de infección. Las áreas

más afectadas, donde se deben aplicar estos procesos son, por supuesto, las correspondientes al ámbito sanitario (hospitales, centros de salud, ambulancias), pero también el interior de cualquier edificación en la que se produzca una concurrencia del público o de los trabajadores significativa (edificios públicos, medios de transporte, centros de enseñanza, centros de trabajo, centros comerciales, etc.).

Los coronavirus son virus con envuelta que en general son lábiles, inactivándose tras la aplicación de la mayoría de los germicidas químicos conocidos. En condiciones experimentales, el SARS-CoV-2 reduce su carga microbiológica inicial en 4-6  $\log_{10}$  a los 5 minutos de aplicar lejía casera en concentraciones de 1:49 y 1:99, etanol 70%, povidona yodada 7,5%, cloroxilenol 0,05%, clorhexidina 0,05%, cloruro de benzalconio 0,1%, y solución de jabón líquido en concentración de 1:49 (5).

Sin embargo, aunque estas sustancias germicidas son muy efectivas, en la mayoría de los casos son muy agresivas, tanto para el personal que realiza los procesos de desinfección, como para terceras personas, lo que obliga a realizar las descontaminaciones de área utilizando equipos de protección individual de alta gama y en ausencia de personal. Lo cual hace que dichos procedimientos puedan ser peligrosos, complejos y lentos. Por otra parte, muchas de estas sustancias pueden dañar los materiales de revestimiento, lo que hace que se reduzca en gran medida la gama de germicidas aptos para su utilización.

Una alternativa para solventar estos problemas es la peroxidación del agua para su utilización como un germicida de superficies y materiales, sin la necesidad de utilizar otros germicidas que puedan ser agresivos. En el proceso de peroxidación mediante electrolisis se producen especies reactivas oxidantes (cloritos, cloratos, peróxido de hidrógeno, etc.) a bajas concentraciones que son estables y que confieren al agua así tratada potencial germicida, pero con la gran ventaja de que esta agua no es agresiva para las personas, los materiales o el medio ambiente.

ActivH2O tiene la explotación a nivel mundial y en exclusividad de esta tecnología y lleva varios años desarrollando sus aplicaciones, habiendo realizado estudios previos en diferentes ámbitos:

- Desinfección del agua de consumo humano, método alternativo a la cloración
- Desinfección del agua para actividades recreativas
- Eliminación de fitopatógenos en las aguas de riesgo
- Desinfección de superficies mediante nebulización
- Generación de vapor con actividad germicida para procesos industriales
- Mejora de la sanidad animal en diferentes especies de granja
- Lavado y desinfección de vegetales de consumo humano
- Desinfección de materiales en odontología
- Desinfección en instalaciones sanitarias

Por otra parte, también se han realizado diferentes pruebas para comprobar que el agua peroxidada no produce daños en los alimentos vegetales tratados o en la salud humana.

Por todo ello, se ha realizado el estudio que se presenta a continuación para verificar el efecto viricida del agua peroxidada sobre los coronavirus HCoV-229E y SARS-CoV-2, este último agente productor de la COVID-19.

## 2. OBJETIVOS

Comprobar la efectividad desinfectante del agua electro-peroxidada ACTIVH<sub>2</sub>O, frente a virus, en este caso SARS-CoV-2, para el empleo del agua en la limpieza de superficies. Todas las pruebas con SARS-CoV-2 se han realizado en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica (NCB3) del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) (CNB-CSIC) ya que dicho virus ha sido incluido en el grupo de riesgo 3 de patógenos humanos por la Unión Europea y por la Organización Mundial de la Salud.

Para el ajuste de la técnica, en primer lugar se han realizado ensayos de eficacia viricida utilizando el alfa coronavirus humano HCoV-229E, perteneciente al grupo de riesgo 2 de patógenos humanos, muy similar en cuanto a estructura, pero menos peligroso que el SARS-CoV ya que produce el típico cuadro de catarro común.

Los resultados obtenidos se plasman en este informe final, en el que queda determinada la eficacia de este viricida, teniendo en cuenta las condiciones de ensayo utilizadas y que se indican en esta memoria.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

En la metodología que se expone se ha utilizado como base la norma UNE-EN 14476 14476:2014+A2 Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad viricida en medicina. Método de ensayo y requisitos (Fase2/Etapa1) (12).

### CONDICIONES EXPERIMENTALES GENERALES:

- Diluyente utilizado para la solución de ensayo: agua destilada.
- Concentraciones de ensayo del agua electroperoxidada:
  - 1 ppm
  - 10 ppm
  - 20 ppm
- Nota: se utiliza como referencia ppm de iones cloruro
- Reajuste de concentraciones de ensayo tras la obtención de resultados preliminares:
  - 1 ppm
  - 2 ppm
  - 4 ppm
  - 8 ppm
- Nota: se utiliza como referencia ppm de iones cloruro
- Tiempos de contacto:
  - 0,5 minutos
  - 1 minutos
  - 5 minutos
- Temperatura de ensayo: temperatura ambiente, aproximadamente 20°C
- Neutralizante de la reacción: tiosulfato de sodio estéril en agua destilada, 4,5 g/L
- Identificación de los virus a ensayar y títulos iniciales:
  - HCoV-229E, 2,5x10<sup>6</sup> ufp/ml
  - SARS-CoV-2, 1,3x10<sup>7</sup> ufp/ml

Nota: suspensiones virales en medio DMEM con un 2% de suero fetal bovino (FBS).

Nota: a la vista de los resultados preliminares obtenidos, se decidió diluir las suspensiones virales stock 1/10 en tampón fosfato completo (PBS) para reducir el FBS al 0,2% ya que este componente interfería el efecto viricida del agua electroperoxidada

- Líneas celulares a utilizar:
  - HCoV-229E: Huh-7
  - SARS-CoV-2: VeroE6
- Medio de crecimiento: DMEM con un 10% de FBS
- Medio de mantenimiento para las titulaciones de los virus: DMEM con un 2% de FBS
- Temperatura de incubación de los cultivos celulares:
  - Huh-7: 37°C
  - VeroE6: 32°C

#### **CONDICIONES EXPERIMENTALES CON HCOV-229E:**

Al tratarse de un patógeno humano perteneciente al Grupo de riesgo 2, todas las operaciones se realizarán en uno de los laboratorios de nivel 2 de contención biológica (NCB2) del CNB. Todas las fases de los ensayos que implicaron la utilización de virus viables se realizaron en cabina de bioseguridad y se siguieron las normas específicas para este nivel de contención dictadas en el Manual de Seguridad e Higiene del CNB.

#### **CONDICIONES EXPERIMENTALES CON SARS-CoV-2:**

El SARS-CoV-2 ha sido asimilado por la OMS al Grupo de riesgo 3 de patógenos humanos y ha sido clasificado recientemente por la Unión Europea en el mismo grupo. Por tanto, todas las operaciones se realizaron en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica (NCB3) del CNB. Debido a la elevada transmisibilidad del virus a través de aerosoles, se extremaron las precauciones en cuanto a contención y equipamiento de protección individual y colectiva. Se siguieron las normas dictadas en el Reglamento de funcionamiento y en el Plan de emergencias específicos de este laboratorio.

#### **PREPARACIÓN DE STOCKS VIRALES CON TÍTULO CONOCIDO**

##### **Amplificación de células HuH7 (hepatocarcinoma humano) para HCoV-229E y de células VeroE6 (de riñón de mono verde africano) para SARS-CoV-2:**

Se inocularán cultivos confluentes de células a multiplicidad de infección 0.01 en un volumen de 20 ml de medio en frascos cerrados F175 (175 cm<sup>2</sup> de superficie). El medio utilizado es DMEM suplementado con un 2% de suero fetal bovino (FBS). Las células se incubarán a 32°C para HCoV 229E y a 37°C para SARS-CoV-2. A día 2 postinfección se recogerán 10 ml de sobrenadante de cultivo y se añadirán 10 ml de medio fresco. A día 3 postinfección se recogerá el volumen completo de sobrenadante (20 ml). Los sobrenadantes recolectados, stock de virus, se almacenarán alicuotados a -80°C en el laboratorio NCB2 (HCoV-229E) o en el laboratorio NCB3 (SARS-CoV-2).

##### **Titulación de stock virales mediante recuento de placas de lisis:**

Para determinar el título de virus de los stocks de día 2 y 3 postinfección se utilizarán células crecidas en placas de 12 pocillos (M12). Se prepararán diluciones seriadas por duplicado de factor 10 de cada uno de los stocks y se inocularán 100 µl de las diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup> en cada pocillo. Después de 2 h de adsorción a 32°C (HCoV 229E) o a 37°C (SARS-CoV-2), se retirará el inóculo de virus y se reemplazará por 1 ml de medio semisólido (mezcla 1:1 de agar 1.4% y DMEM 2x suplementado con 4% de FBS). Las placas de titulación se incubarán a 32°C (HCoV-229E) o a 37°C (SARS-CoV-2) durante 4 días. Posteriormente se fijarán las células con formaldehído (10% formaldehído en tampón fosfato salino -PBS- completo) durante 1 h y se retirará el medio semisólido. A continuación se teñirán las células con cristal violeta (0.1% en metanol:agua 20:80) durante 30 min para observar

las placas de lisis. Los títulos obtenidos se expresan en unidades formadores de placas por mililitro (upf/ml).

## **ENSAYO DEL EFECTO GERMICIDA DEL AGUA ELECTROPEROXIDADA**

Fases generales: dilución, neutralización y posterior cultivo para titulación de los virus.

### **Descripción del ensayo:**

- Se equilibran los reactivos, medios, aguas e inóculos a 20°C.
- En viales estériles de 1,6 ml se añaden 0,8 ml de solución desinfectante de agua electroperoxidada a diferentes concentraciones.
- Posteriormente se añaden 100 µl de suspensión viral de título conocido en DMEM más 2% de FBS o una dilución 1/10 de dicha suspensión en PBS.
- Se agita el contenido y se deja un tiempo de contacto conforme a la curva de tiempos indicada.
- Se añaden 100 µl de neutralizante estéril, tiosulfato de sodio, 4,5 g/L.
- Se agita y se deja que actúe el neutralizante durante 5 minutos.
- Se toma una alícuota de 100 µl para titulación viral mediante recuento de placas de lisis.
- El resto de la mezcla de reacción se congela a -80°C.

### **Tipo de controles de ensayo:**

- Control A: la misma preparación, pero sin añadir agua electroperoxidada ni tampoco neutralizante.
- Control B: la misma preparación, pero sin añadir agua electroperoxidada, para ver el efecto del neutralizante

## **ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

Tras realizar los ensayos de eficacia germicida, se procedió a la titulación de las suspensiones vírales de HCoV 229E y de SARS-CoV-2 control y tratadas valorando su infectividad en células susceptibles Huh7 y Vero E6 respectivamente mediante ensayos de titulación como los indicados anteriormente. Para el cálculo de los títulos virales se seguirá lo indicado en la norma UNE-EN 14476:2014+A2:2020.

## **4. RESULTADOS**

### **VERIFICACIÓN DEL POSIBLE EFECTO CITOTÓXICO DEL TIOSULFATO SÓDICO**

**Control añadiendo tiosulfato sódico a placas confluentes de células Huh7 y VeroE6. Comprobación visual de posible producción de citotoxicidad:**

1. Diluir tiosulfato sódico en agua destilada estéril para obtener concentraciones finales de 4,5 gr/L, 0,45 g/L y 0 g/L. Añadir 100 µl por duplicado de cada concentración a pocillos de placas de 12 pocillos. Cada pocillo contenía 500 µl de medio DMEM más un 2% de FBS.
2. Incubar durante los cuatro días que duran las titulaciones virales y observar diariamente posible efecto citopático.

Resultado: no se observaron diferencias significativas en los cultivos de Huh-7 y VeroE6 en presencia de diferentes concentraciones de tiosulfato sódico con respecto a los cultivos control no tratados. Por tanto, se puede afirmar que este neutralizante no produce un efecto citopático aparente.

### Control añadiendo tiosulfato sódico a títulos conocidos de virus HCoV-229E y SARS-CoV-2 y posterior titulación. Control de posibles cambios en susceptibilidad celular a los virus.

1. Añadir por duplicado 100 µl de tiosulfato sódico a 100 µl de suspensión viral y 800 µl de agua destilada estéril. Agitar e incubar durante 5 minutos a 20°C. Concentraciones finales de tiosulfato 4,5 gr/L, 0,45 g/L y 0 g/L.
2. De cada vial, tomar 100 µl por duplicado y añadir a pocillos de placas de 12 pocillos. Cada pocillo contenía 500 µl de medio DMEM más un 2% de FBS.
3. Realizar las titulaciones mediante el método de recuento de planchas de lisis

Resultado: no se observaron diferencias significativas entre los títulos de viales control y los títulos de los viales que contenían tiosulfato sódico a diferentes concentraciones. Por tanto, se puede afirmar que las células presentan la misma susceptibilidad al virus hayan estado o no en contacto con diferentes concentraciones de tiosulfato sódico

### RESULTADOS PRELIMINARTES DEL EFECTO DEL AGUA ELECTROPEROXIDADA SOBRE HCOV-229E Y SARS-COV-2

Como se puede observar en la figura 1, el agua electroperoxidada a diferentes concentraciones y durante diferentes tiempos de exposición no produjo efectos aparentes sobre el título viral del HCoV-229E.

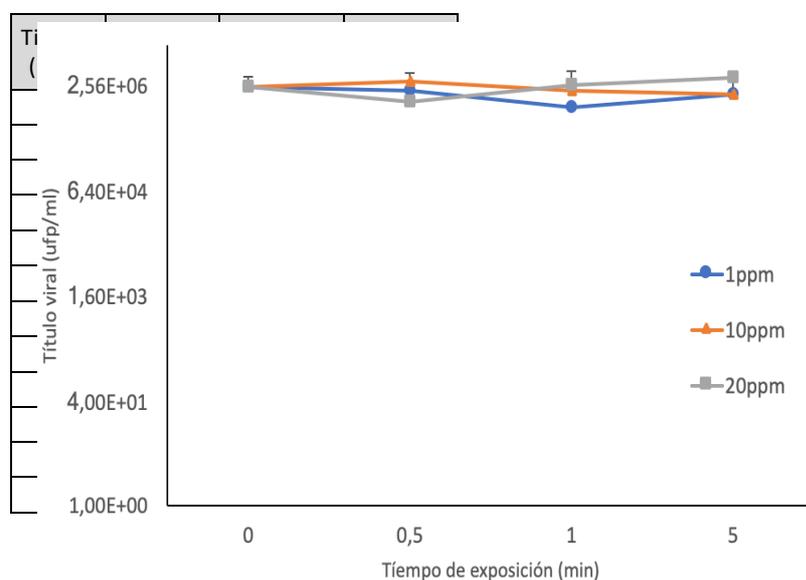


Fig. 1: Efecto del agua electroperoxidada sobre el título del virus HCOV-229E a diferentes tiempos y concentraciones

Esta ausencia de efecto viricida también se pudo observar cuando se realizó el mismo ensayo sobre el virus SARS-CoV-2, como se indica en la figura 2. El único resultado utilizable en estos ensayos fue que el agua electroperoxidada no tenía un efecto citopático aparente y tampoco producía cambios en la susceptibilidad de las células a los virus.

Tiempo (min)	AEP (ppm)	Título viral (ufp/ml)	Des. estándar
0	1	1,25E+05	1,06E+05
0,5	1	4,00E+05	2,12E+05
1	1	4,00E+05	2,83E+05
5	1	4,25E+05	1,06E+05
0	10	1,25E+05	1,06E+05
0,5	10	4,00E+05	7,07E+04
1	10	2,25E+05	3,54E+04
5	10	3,25E+05	3,54E+04
0	20	1,25E+05	1,06E+05
0,5	20	3,75E+05	1,77E+05
1	20	3,00E+05	7,07E+04
5	20	2,25E+05	1,77E+05

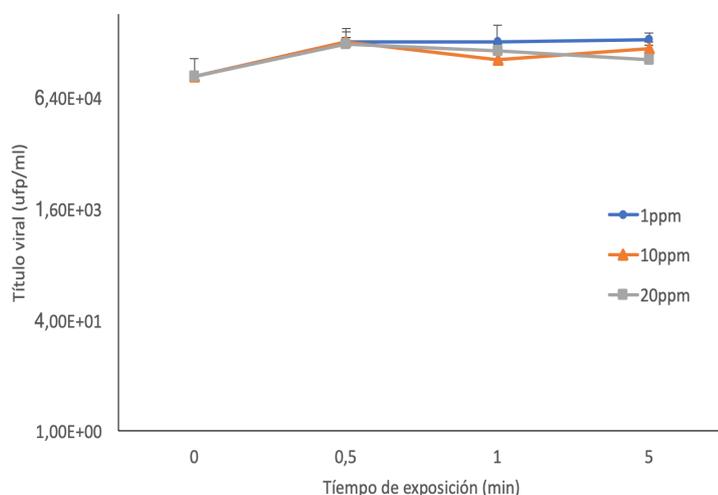


Fig. 2: Efecto del agua electroperoxidada sobre el título del virus HCOV-229E

### COMPROBACIÓN DEL EFECTO ATENUANTE DEL SUERO FETAL BOVINO

Era muy probable que la ausencia de efecto viricida del agua electroperoxidada fuera debida al efecto interferente del suero fetal bovino. Por tanto, se realizaron diluciones del stock viral con PBS y posteriormente se comprobó el efecto del agua electroperoxidada. Como se puede observar en la figura 3. No existen diferencias entre los títulos virales sin diluir con y sin exposición al agua electroperoxidada, pero ya en la primera dilución 1/10 del stock viral el efecto es total, produciéndose una reducción completa del título viral. Este efecto se mantiene en diluciones mayores del stock viral (diluciones 1/100 y 1/1000).

Tiempo (min)	AEP (ppm)	Dilución stock viral	Título viral (pfu/ml)	Des. estándar
5	0	Sin dilución	5,03E+05	1,77E+04
5	20	Sin dilución	7,05E+05	6,36E+04
5	20	1,00E+05	0,00E+00	0,00E+00
5	20	1,00E+04	0,00E+00	0,00E+00
5	20	1,00E+03	0,00E+00	0,00E+00

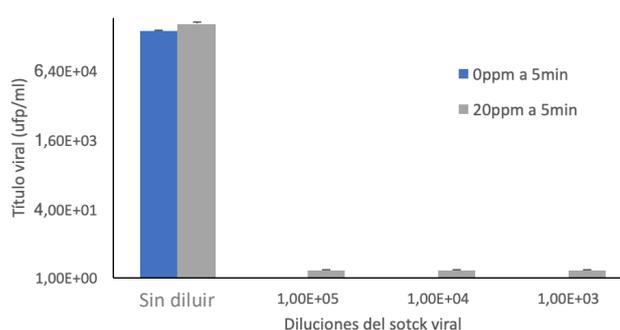


Fig. 3: Efecto del agua electroperoxidada sobre el virus HCOV-229E utilizando diferentes diluciones del stock viral en PBS

### RESULTADOS DEL EFECTO DEL AGUA ELECTROPEROXIDADA SOBRE EL SOTCK DILUIDO DE HCOV-229E

Una vez que se comprobó el efecto interferente del FBS, se decidió continuar el estudio utilizando stocks virales diluidos 1/10 en PBS. Primeramente, se volvió a ensayar el efecto del agua electroperoxidada a las mismas concentraciones y tiempos que los ya ensayados. Como se puede

observar en la figura 4, el agua electroperoxidada no produjo efectos significativos a una concentración de 1 ppm en ninguno de los tiempos ensayados. Sin embargo, el efecto fue total a concentraciones de 5 y 20 ppm a partir de 30 segundos.

Tiempo (min)	AEP (ppm)	Título viral (ufp/ml)	Des. estándar
0	1	1,75E+04	0,00E+00
0,5	1	3,06E+03	6,19E+02
1	1	3,06E+03	6,19E+02
5	1	1,44E+04	1,67E+04
0	5	1,75E+04	0,00E+00
0,5	5	0,00E+00	0,00E+00
1	5	0,00E+00	0,00E+00
5	5	0,00E+00	0,00E+00
0	20	1,75E+04	0,00E+00
0,5	20	0,00E+00	0,00E+00
1	20	0,00E+00	0,00E+00
5	20	0,00E+00	0,00E+00

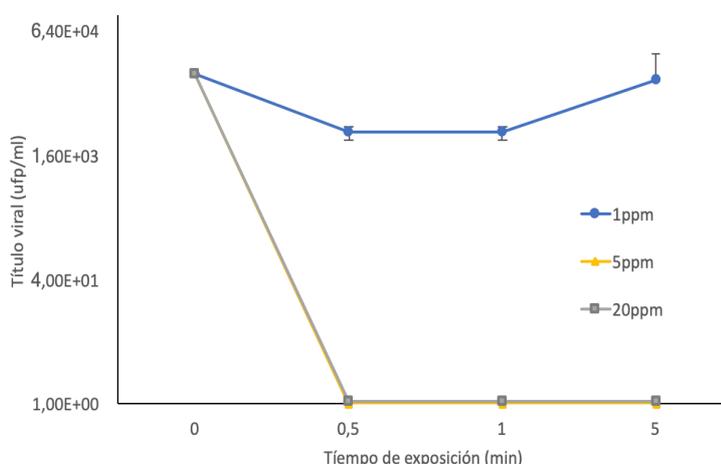


Fig. 4: Efecto del agua electroperoxidada sobre el título del virus HCoV-229E a diferentes tiempos y concentraciones. Dilución del FBS 1/10

Con objeto de poder observar de forma gradual la reducción del título viral del HCoV-229E, se decidió reducir el rango de la curva de concentraciones manteniendo la curva de tiempos de ensayo. La figura 5 muestra un claro efecto viricida del agua electroperoxidada que aumenta con la concentración, empezándose a observar con 4 ppm. A una concentración de 8 ppm se observa una reducción de 4,11 log en el título viral inicial tras 5 minutos de contacto. Este efecto aumenta con el tiempo de contacto, produciéndose un 70% de reducción ya a los 30 segundos.

Tiempo (min)	AEP (ppm)	Título viral (ufp/ml)	Des. estándar
0	1	1,31E+04	6,19E+03
0,5	1	1,75E+04	0,00E+00
1	1	8,75E+03	0,00E+00
5	1	1,31E+04	6,19E+03
0	2	1,31E+04	6,19E+03
0,5	2	1,31E+04	6,19E+03
1	2	1,31E+04	6,19E+03
5	2	2,19E+04	6,19E+03
0	4	1,31E+04	6,19E+03
0,5	4	2,63E+03	0,00E+00
1	4	2,63E+03	0,00E+00
5	4	2,63E+03	0,00E+00
0	8	1,31E+04	6,19E+03
0,5	8	1,75E+01	0,00E+00
1	8	4,38E+00	6,19E+00
5	8	0,00E+00	0,00E+00

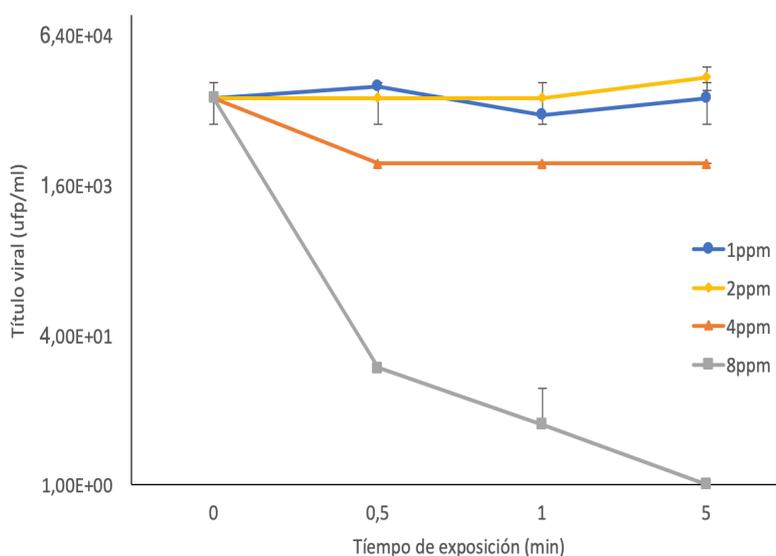


Fig. 5: Efecto del agua electroperoxidada sobre el título del virus HCoV-229E a diferentes tiempos y concentraciones. FBS 0,02%

Teniendo en cuenta estos buenos resultados, se procedió a valorar el efecto viricida del agua electroperoxidada sobre SARS-CoV-2 en las mismas condiciones. Como se puede observar en la figura 6, el efecto viricida se confirmó e incluso se obtuvieron mejores resultados que sobre el virus HCoV-229E. El efecto viricida ya se observa a 1 ppm y 2 ppm con reducciones de 0,66 log y 0,76 log del título viral inicial. Este efecto se muestra muy significativo y dependiente del tiempo de contacto a partir de 4ppm, con una reducción de 2,48 log tras 5 minutos. Finalmente, con una concentración de 8 ppm, el agua electroperoxidada produce la reducción completa del título viral inicial, 3,48 log, ya a los 30 segundos, manteniéndose dicho efecto tras 1 y 5 min

.Tiempo (min)	AEP (ppm)	Título viral (pfu/ml)	Des. estándar
0	1	3,00E+03	5,66E+02
0,5	1	9,50E+02	6,36E+02
1	1	7,50E+02	7,07E+01
5	1	6,75E+02	1,06E+02
0	2	3,00E+03	5,66E+02
0,5	2	6,00E+02	2,12E+02
1	2	6,75E+02	1,06E+02
5	2	5,25E+02	3,54E+01
0	4	3,00E+03	5,66E+02
0,5	4	2,70E+02	3,25E+02
1	4	7,00E+01	4,24E+01
5	4	1,00E+01	1,41E+01
0	8	3,00E+03	5,66E+02
0,5	8	0,00E+00	0,00E+00
1	8	0,00E+00	0,00E+00
5	8	0,00E+00	0,00E+00

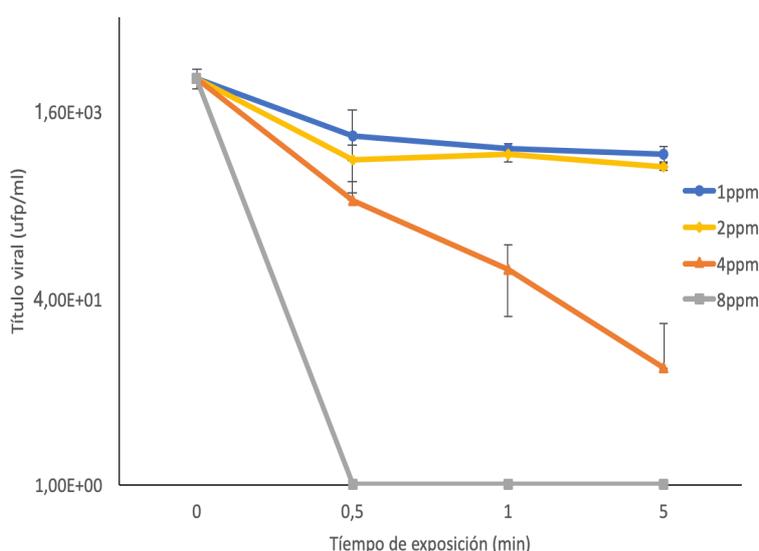


Fig. 6: Efecto del agua electroperoxidada sobre el título del virus SARS-COV-2 a diferentes tiempos y concentraciones. Dilución del FBS 0,02%

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el agua electroperoxidada es un potente viricida, tanto para el coronavirus HCoV-229E, como para el coronavirus SARS-CoV-2, causante de la COVID-19, obteniéndose reducciones máximas del título viral inicial de 4,11 ciclos logarítmicos (más del 99,99%) para HCoV-229E, a una concentración de 8 ppm y tras un tiempo de exposición de 5 minutos, y de 3,48 ciclos logarítmicos (99,95%) para SARS-CoV-2, a la misma concentración y ya a los 30 segundos de exposición.

Incluso, se podría afirmar que el SARS-CoV-2 parece más sensible al efecto de este viricida ya que se obtienen reducciones visibles a concentraciones muy bajas, de 1 y 2 ppm, observándose un efecto muy claro con 4 ppm. En este sentido, muy posiblemente no se haya obtenido una reducción mayor del título de SARS-CoV-2 debido a que el título viral inicial era bastante bajo, de  $3 \times 10^3$  ufp/ml, no permitiéndose ver el efecto completo. Por tanto, si se partiera de un título viral mayor se obtendrían muy posiblemente reducciones de más de 4 ciclos logarítmicos, tal como demuestran los resultados obtenidos con el virus HCoV-229E. Con respecto a esta dificultad, se ha de tener en cuenta que la técnica empleada produce una reducción del título viral stock de dos ciclos logaritmos. En primer lugar, porque se ha de reducir el título inicial 1/10 para bajar la concentración de FBS, cuyo efecto interferente se discutirá a continuación y, en segundo lugar, debido a la preparación de la propia mezcla de reacción que produce una segunda dilución 1/10 del stock viral.

Volviendo a los resultados obtenidos, otro aspecto importante a destacar es la rapidez del efecto viricida que produce el agua electroperoxidada sobre el SARS-CoV-2, obteniéndose un efecto completo a los 30 segundos de contacto.

Todos estos datos se encuentran en línea con los resultados previamente obtenidos por los laboratorios Cleanbiotec. Biotecnología ambiental en su informe nº 20200717, donde se indica que el agua electroperoxidada produce una reducción del título inicial de *Escherichia coli* CECT515T de dos ciclos logarítmicos a una concentración de 2 ppm tras 5 minutos de contacto y de 3 ciclos logarítmicos a una concentración de 5 ppm tras el mismo tiempo de contacto (13).

Como se ha indicado anteriormente, el stock viral inicial debía diluirse 1/10 en PBS para reducir la concentración de FBS ya que este suero demostró un potente efecto interferente en ensayos previos donde el agua electroperoxidada no demostró su efecto viricida. Este aspecto es importante para valorar la aplicabilidad del agua electroperoxidada en determinados entornos con elevada presencia de materia orgánica.

A pesar de ello, y como se ha indicado en la introducción de este informe, ACTIVH2O ha realizado previamente una gran variedad de pruebas con resultado satisfactorio sobre el efecto germicida del agua electroperoxidada en diferentes ámbitos como la desinfección del agua de consumo humano, la eliminación de fitopatógenos en el ámbito agrícola, la desinfección de vegetales comestibles, la mejora de la sanidad animal o la desinfección en el ámbito de la odontología y en el ámbito sanitario, entre otros.

Conforme a lo indicado, y como conclusión final de este estudio se puede afirmar que el agua electroperoxidada tiene un potente efecto viricida sobre el coronavirus SARS-CoV-2 causante de la COVID-19. Su efecto además se caracteriza por ser muy rápido, pudiéndose obtener una reducción de la carga viral completa tras los primeros 5 minutos de actuación, con una reducción como mínimo del 99,95%. Esta capacidad viricida, podría tener implicaciones importantes en la lucha contra la COVID-19 ya que el agua electroperoxidada parece ser más inocua que otras viricidas, pudiendo tener una utilización y aplicación más segura.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1, complete genome. 23 de enero de 2020 [citado 7 de febrero de 2020]; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947.3>
2. Paules CI, Marston HD, Fauci AS. Coronavirus Infections. More Than Just the Common Cold. JAMA [Internet]. 23 de enero de 2020 [citado 6 de febrero de 2020]; Disponible en: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2759815>
3. Hung LS. The SARS epidemic in Hong Kong: what lessons have we learned? J R Soc Med [Internet]. agosto de 2003 [citado 6 de febrero de 2020];96(8):374-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC539564/>
4. Doremalen N van, Bushmaker T, Morris D, Holbrook M, Gamble A, Williamson B, Tamin A, Harcourt J, Thornburg N, Gerber S, Lloyd-Smith J, de Wit E and Munster V. Aerosol and surface stability of HCoV-19 (SARS-CoV-2) compared to SARS-CoV-1. medRxiv [Internet]. 13 de marzo de 2020 [citado 16 de marzo de 2020];2020.03.09.20033217. Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.09.20033217v2>

5. G. Kampf, D. Todt, S. Pfaender and E. Steinmann. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection* 104 (2020) 246-251. [https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701\(20\)30046-3/fulltext](https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701(20)30046-3/fulltext)
6. E.A. Meyerowitz, A. Richterman, R.T. Gandhi and P.E. Sax. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Annals of Internal Medicine*. Reviews. January 2021. <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/M20-5008>
7. World Health Organization. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>
8. Wu P, Hao X, Lau EHY, Wong JY, Leung KSM, Wu JT, Cowling BJ, Leung GM. Real-time tentative assessment of the epidemiological characteristics of novel coronavirus infections in Wuhan, China, as at 22 January 2020. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. enero de 2020;25(3). <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000044>
9. Anderson RM, Heesterbeek H, Klinkenberg D, Hollingsworth TD. How will country-based mitigation measures influence the course of the COVID-19 epidemic? *The Lancet* [Internet]. 9 de marzo de 2020 [citado 17 de marzo de 2020];0(0). Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)30567-5/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)30567-5/abstract)
10. COVID-19: protecting health-care workers. *Lancet Lond Engl*. 21 de marzo 2020; 395 (10228):922. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7138074/>
11. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Situación de COVID-19 en España. Informe 22 [Internet]. 2020 abr. Disponible en: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/Informes COVID-19/Informe nº 22. Situación de COVID-19 en España a 13 de abril de 2020.>
12. Norma UNE-EN 14476 14476:2014+A2 Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad virucida en medicina. Método de ensayo y requisitos (Fase2/Etapa1).
13. Estudio de actividad bactericida y virucida frente a SARS-CoV-2 de ActivH2O. Cleanbiotec. Biotecnología ambiental. Informe nº 20200717 <https://www.docplayer.es/201758846-Titulo-estudio-de-actividad-bactericida-y-virucida-frente-a-sars-cov-2-de-agua-activ.html>