

Evidencia del efecto de los radicales OH[•] para una desinfección de aire y superficies interiores en un método inofensivo para los humanos.

Mtz-Vimbert, R^{1,2}; Arañó L, M¹; Custodio S, JD^{1,2}; García R, J³; Monagas A, Pedro³.

¹Emovere Natura, Biomedical Research Communications

²e-SHealth, Consulting healthcare, Parc Científic Universitari TecnoCampus Mataró

³Centre de Recerca en Seguretat i Control Alimentaria, de la Universitat Politècnica de Catalunya, CRESCA-UPC

email: roberto.vimbert@eshealth.eu

Resumen

El desarrollo de las sociedades humanas en todo el mundo ha generado al mismo tiempo un daño ambiental muy grave que amenaza la salud humana y la supervivencia de animales y plantas debido a una mayor incidencia de enfermedades infecciosas.

Un método avanzado de saneamiento ambiental inofensivo para la eliminación de microorganismos patógenos y compuestos orgánicos volátiles (COV) en grandes espacios y superficies de aire son procesos de oxidación avanzados (POA) basados en radicales hidroxilos (OH) en concentraciones suficientes para realizar funciones biocidas en microorganismos patógenos. y degradar compuestos orgánicos en el aire a formas minerales o compuestos orgánicos inofensivos.

Es una tecnología reconocida como limpia y segura y generalmente se lleva a cabo a través de la radiación solar como un iniciador de proceso con material de fotocatalizador. El problema presentado en los métodos de fotocatálisis es su baja velocidad, la generación de productos intermedios de degradación tóxica, la desactivación del material y la necesidad de irradiación UV.

El aumento de la propagación de microorganismos patógenos en el aire ha generado serias preocupaciones sobre su amenaza para la seguridad ambiental. Sin embargo, no existe un método efectivo para eliminar rápidamente estos microorganismos dañinos en un gran espacio aéreo. En comparación con los desinfectantes convencionales, los procesos de oxidación basados en radicales OH[•] tienen excelentes ventajas.

Palabras clave: radicales hidroxilos (OH[•]); desinfección; VOC, proceso avanzado de oxidación, enfermedades infecciosas, ozono, terpenos.

Introducción

El desarrollo de las sociedades humanas en todo el mundo ha generado al mismo tiempo un daño ambiental muy grave que amenaza la salud humana y la supervivencia de animales y plantas debido a una mayor incidencia de enfermedades infecciosas.

La atmósfera no tiene una microbiota nativa, pero es un medio de dispersión rápido y global para muchos tipos de microorganismos. La historia de la aerobiología ha

demostrado hasta el siglo pasado el papel fundamental que juega la contaminación del aire respiratorio en el desarrollo de epidemias como el cólera, la gripe y la Legionella [1]. Esta contaminación del aire respiratorio junto con la facilidad de movilidad de los seres humanos en todo el mundo ha generado en este nuevo siglo síndromes respiratorios extremadamente graves para la supervivencia.

Entre noviembre de 2002 y julio de 2003, el síndrome respiratorio agudo severo (SRAS) se propagó rápidamente de China a otros 37 países de todo el mundo, causando 775 muertes humanas con una pérdida económica de \$ 40 mil millones [2].

A principios de 2009, una nueva cepa de H1N1 de origen porcino se extendió por todo el mundo desde México. H1N1 fue declarada una pandemia de gripe por la Organización Mundial de la Salud (OMS), causando alrededor de 17,000 muertes humanas a principios de 2010 [3].

En 2012 surgió un nuevo episodio de coronavirus, el MERS-CoV (coronavirus del Síndrome Respiratorio del Medio Oriente). La aparición de SARS-CoV en 2002 y MERS-CoV en 2012 ha cambiado la perspectiva de la familia Coronaviridae ya que las neumonías que han causado (SARS y MERS) tienen cifras de mortalidad del 10% y 30%, que son elevadas en comparación con el resto de los virus en la familia [4].

En diciembre de 2019, un tercer nuevo coronavirus llamado SARS-COV2 (coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo) surgió en los últimos 17 años en la provincia de Wuhan Hubei, China [5], fue nombrado COVID-19 en febrero de 2020 y declarado una pandemia por el Organización Mundial de la Salud (OMS).

Por lo tanto, es muy importante desarrollar un método rápido y eficiente para la eliminación de microorganismos patógenos en grandes espacios de aire.

Un método avanzado de saneamiento ambiental inofensivo para la eliminación de microorganismos patógenos y compuestos orgánicos volátiles (COV) en grandes espacios y superficies de aire son procesos de oxidación avanzados (POA) basados en radicales hidroxilos (OH^\bullet) en concentraciones suficientes para realizar funciones biocidas en microorganismos patógenos. y degradar los compuestos orgánicos en el aire a formas minerales o compuestos orgánicos inofensivos [6].

Los resultados de diferentes estudios muestran que los radicales OH^\bullet destruyen rápidamente diferentes microorganismos con una concentración de 0.8 mg / L y una densidad de pulverización de 21 $\mu\text{L} / \text{m}^2$ en 4 segundos [7]. Los cambios morfológicos celulares vitales y esenciales en los microorganismos patógenos también se observan bajo un microscopio cuando se exponen a una dosis fatal de radicales OH^\bullet

Es una tecnología reconocida como limpia y segura y generalmente se lleva a cabo a través de la radiación solar como un iniciador de proceso con material de fotocatalizador. El problema presentado en los métodos de fotocatálisis es su baja velocidad, la generación de productos intermedios de degradación tóxica, la desactivación del material y la necesidad de irradiación UV.

El aumento de la propagación de microorganismos patógenos en el aire ha generado serias preocupaciones sobre su amenaza para la seguridad ambiental. Sin embargo, no existe un método efectivo para eliminar rápidamente estos microorganismos dañinos en un gran

espacio aéreo. En comparación con los desinfectantes convencionales, los procesos de oxidación basados en radicales OH^\bullet tienen excelentes ventajas.

Actualmente, el cloro, el álcali y el alcohol alcalino-amina son los tres tipos principales de desinfectantes químicos que se usan ampliamente para eliminar la contaminación microbiana. Sin embargo, algunos inconvenientes son los siguientes: la selectividad, un tipo de desinfectante químico, solo puede matar selectivamente uno o más tipos de microorganismos patógenos. Su tiempo de procesamiento es largo, en un rango de 0.5 - 1 hora debido a la baja velocidad de reacción química y su alto valor de dosificación letal, que podría alcanzar el 9% (v / v), lo que implica una contaminación secundaria severa por los intermedios de cloro restantes. Finalmente, su procesamiento letal se limita a la superficie de los objetos, lo que hace imposible su aplicación en grandes espacios aéreos [8,9].

En comparación con los desinfectantes químicos anteriores, la avanzada tecnología de oxidación basada en radicales OH^\bullet tiene varias ventajas: 1) Ausencia de selectividad, pueden matar cualquier microorganismo patógeno en dosis letales bajas debido a su fuerte carácter oxidativo, con un potencial de oxidación de 2.8 V, ligeramente menos que el de flúor (3.03 V). 2) El tiempo de procesamiento de los radicales OH^\bullet es muy corto, varios segundos. La razón es que la velocidad de reacción química de los radicales OH^\bullet es mayor que $109 \text{ L mol}^{-1} \text{ segundo}^{-1}$, que es 107 veces mayor que la de otros oxidantes como O_3 , H_2O_2 , Cl_2 , etc. 3) Como oxidante verde, los radicales OH^\bullet se descomponen en H_2O y O_2 sin oxidantes residuales después de sus reacciones bioquímicas [10,11].

Formación de radicales OH^\bullet

El oxígeno es una molécula esencial para la vida, pero dada su alta reactividad, también se convierte en un elemento tóxico que da lugar a la llamada paradoja del oxígeno. El oxígeno es una molécula básicamente oxidante. La siguiente concentración de contaminantes se encuentra generalmente en el aire exterior rural (sin fuentes de contaminación): dióxido de carbono, 320 ppm; ozono, 0.02 ppm, monóxido de carbono, 0.12 ppm, óxido nítrico, 0.003 ppm, y dióxido de nitrógeno, 0.001 ppm. Sin embargo, estos valores aumentan significativamente en el aire urbano [12].

El radical OH^\bullet es el oxidante natural más importante en la química troposférica. A menudo se le llama "detergente" en la atmósfera, ya que reacciona con muchos contaminantes, iniciando el proceso de depuración de los mismos, también juega un papel importante en la eliminación de gases de efecto invernadero como el dióxido de carbono, el metano y el ozono. Las características que hacen atractivos los Procesos de oxidación avanzados (POA) son, entre otros, que con ellos el contaminante se destruye, no se concentra o transfiere al medio ambiente, se logra una mineralización total o casi total de contaminantes orgánicos, es decir, tienen aplicación en la destrucción de la gran mayoría de compuestos orgánicos, especialmente en compuestos no biodegradables como organoclorados, PCB, HAP, etc. Es una tecnología limpia y segura y, en algunos procesos, la radiación solar puede usarse como el iniciador de proceso.

El principal problema para eliminar rápidamente los microorganismos patógenos en un gran espacio aéreo es cómo producir los radicales OH^\bullet con alta concentración y gran producción. Actualmente, los métodos principales son la catálisis de Fenton, la fotocatalisis, el ozono, así como sus efectos de colaboración [13-17]. Sin embargo, estas

tecnologías tienen algunas desventajas serias: 1) Los radicales OH^\bullet se obtienen en una baja concentración y baja cantidad de producción, de modo que el tiempo de reacción bioquímica total es largo, en el rango de 15 - 360 min. 2) Las tecnologías mencionadas anteriormente solo se aplican a los experimentos o aplicaciones a pequeña escala. 3) Una gran cantidad de reactivos químicos como H_2O_2 , TiO_2 , Fe^{2+} , etc. son necesarios en el proceso de producción de OH^\bullet , lo que resulta en su alto costo y un problema de seguridad. 4) Para aumentar la producción de radicales OH^\bullet , se colaboran varios tipos de tecnologías, lo que da como resultado equipos accesorios de gran volumen, como la torre de burbujas, la cama compacta giratoria, etc.

En estudios anteriores, la producción de una gran cantidad de radicales OH^\bullet ha sido reportada por ionización y disociación de O_2 en aire y H_2O en estado gaseoso utilizando un método físico de descarga de campo eléctrico fuerte. De esta manera, los radicales OH^\bullet se han utilizado con éxito en el tratamiento del agua de lastre y la marea roja en el océano [18,19].

El óxido de titanio es la referencia como material fotocatalizador actualmente, dada su alta actividad, estabilidad relativa, bajo costo y baja toxicidad. Sin embargo, hay problemas por resolver, como la baja tasa de fotocatalisis, la generación de productos intermedios de degradación tóxica, la desactivación del material y la necesidad de irradiación UV ya que su separación de banda no está acoplada a la luz solar [20].

Desarrollo de un nuevo proceso de oxidación avanzado para la descontaminación de aire y superficies.

Dado el escenario descrito, se genera un desafío para el desarrollo tecnológico seguro y efectivo en la descontaminación del aire y las superficies. El objetivo tecnológico se basa en el hito de lograr una tecnología capaz de producir radicales OH^\bullet en cantidades suficientes mediante un sistema innovador que garantice su eficacia y seguridad para los seres humanos. El sistema Wadu02 © es un dispositivo mediante el cual se evapora una especie reactiva al oxígeno (ERO) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o un terpeno como el d-limoneno. Esta evaporación reaccionará con una emisión interna de ozono por debajo de una concentración de 0.050 ppm (0.1 mg / m³), el límite de exposición al ozono establecido en las regulaciones emitidas por la OMS en los valores límite ambientales (VLA) del año 2000 para el público en general en exposiciones de hasta 8 horas [21], tomadas como un punto de referencia internacional de seguridad en la emisión de ozono y así obtener una producción constante y no dañina de radicales OH^\bullet .

Las emisiones de ozono de Wadu02® se evaluaron a través de un laboratorio externo bajo el estándar de filtros de aire electrostáticos, SUN - UL 867 y se probaron con un calibrador y monitor de ozono Teledyne, a temperatura y humedad controladas por medio de un transductor Vaisala y un medidor de flujo. La emisión de ozono del dispositivo Wadu02, certificada en modo activo y modo nocturno en parámetros menores de 0.020ppm (0.012 - 0.015 ppm sin filtros y 0.015 - 0.016 ppm con filtros, respectivamente) resultó menor que todos los estándares internacionales con respecto a la seguridad en exposiciones prolongadas a ozono.

Las emisiones de ozono de Wadu02 se evaluaron mediante pruebas de filtros de aire electrostáticos domésticos en un laboratorio externo [22] bajo el estándar de filtros de aire electrostáticos, SUN - UL 867 y se probaron con un calibrador y monitor de ozono

Teledyne ®, a temperatura y humedad controladas por el transductor y medidor de flujo Vaisala ®. La emisión de ozono del dispositivo Wadu02® fue certificada en modo activo y modo nocturno en parámetros menores de 0.020ppm (0.012 - 0.015 ppm sin filtros y 0.015 -0.016 ppm con filtros, respectivamente) resulta menor que todos los estándares internacionales con respecto a la seguridad en exposiciones prolongadas al ozono

La producción de radicales OH^\bullet a través de la oxidación de H_2O_2 , bajo condiciones controladas, se evaluó de acuerdo con la funcionalidad oxidativa del dispositivo Wadu02® y con una comparación realizada con peróxidos de hidrógeno líquido en los rangos de pureza de 0.25% a 0.75%, con la ayuda de la reacción colorimétrica realizada en una tira de prueba de yoduro de potasio. Los resultados indican que la capacidad oxidativa promedio de un H_2O_2 a 0.5% de pureza es equivalente a la capacidad oxidativa ofrecida por los dispositivos modelo Wadu02®, con una producción máxima de 0.9 mg / m³ (0.64 ppm), que es aproximadamente el 64.2% del límite actual de exposición laboral (WEL) ajustado a 1,4 mg / m³ (1ppm) [23,24].

La concentración umbral para los efectos irritantes agudos del gas de peróxido de hidrógeno en el tracto respiratorio es de 10 mg / m³ (equivalente a 7 ppm) en humanos; mientras que los valores correspondientes para la piel son 20mg / m³. Con respecto a su exposición prolongada, no se ha encontrado que el peróxido de hidrógeno cause efectos teratogénicos o cancerígenos en humanos. Tampoco se han observado efectos mutagénicos o cromosómicos.

También fue verificado, como alternativa a la alta reactividad natural que presenta el peróxido de hidrógeno, la sustitución de la carga del cartucho con esencias aromáticas extraídas de flores y plantas por el papel biocida que tienen los terpenos por sus propiedades antivirales y antibacterianas y se analizó el proceso de oxidación avanzada bajo las mismas condiciones de baja emisión de ozono (menos de 0.02ppm) con el modelo Wadu02, para comparar la eficacia comprobada con el peróxido de hidrógeno.

El limoneno es uno de los monoterpenos más abundantes en la naturaleza, presente en los aceites esenciales extraídos de la cáscara de los cítricos, incluidos los aceites esenciales de naranja y mandarina. Este monoterpeno es susceptible a la oxidación para generar compuestos con mayor valor agregado [25].

Los terpenos son hidrocarburos que consisten en más de una unidad de isopreno con cinco carbonos que están presentes en los aceites esenciales. Los monoterpenos, la mayoría de los terpenos, junto con sesquiterpenos y diterpenos, comprenden la mayoría de los aceites esenciales. Debido al bajo peso molecular y la alta volatilidad de los monoterpenos y sesquiterpenos, el uso de aceites esenciales en ambientes interiores puede aumentar los niveles de compuestos orgánicos volátiles (COV) [26].

Los terpenos contienen uno o más dobles enlaces $\text{C} = \text{C}$, que interactúan fácilmente con oxidantes fuertes como el ozono, los radicales hidroxilos [27-29] y los radicales nitratos. El ozono es un contaminante común en interiores, cuyos niveles generales se distribuyen aproximadamente de 20 a 40 ppb [30,31]. El uso de máquinas de oficina, como fotocopadoras, impresoras y máquinas de fax, también eleva las concentraciones de ozono en interiores [32]. Los COV emitidos a través de la evaporación de los productos a base de terpenos para interiores pueden interactuar con el ozono y generar contaminantes secundarios del aire, principalmente formaldehído y partículas en

suspensión [33-37]. Los aerosoles orgánicos secundarios generados por la interacción de terpenos y ozono consisten en partículas finas y ultrafinas [38-40]. En consecuencia, se realizaron evaluaciones previas del consumo total de limoneno en el dispositivo Wadu02® para obtener una evaporación controlada y segura.

Se determinó que el consumo total de d-limoneno en los productos Wadu02® era del orden de 0,4 g / 24 h. Según la funcionalidad de este dispositivo y la evaporación promedio de las mediciones registradas en el laboratorio, los productos Wadu02® emiten una nube que contiene d-limoneno con una concentración de aproximadamente 1.84 ppm, que en una habitación de 60m² (180m³) puede dar lugar a una concentración máxima con un valor inferior a 2ppb. Esta concentración es significativamente menor que los niveles OEL suecos y alemanes [41] (límites de exposición ocupacional) que son 27ppm y 10ppm, respectivamente.

Toxicología

Para la evaluación y análisis de las cantidades de formaldehído, que pueden generarse directamente a partir de la reacción del ozono con las unidades estructurales de los enlaces C=C se evaluaron los informes que indican que las proporciones de formaldehído formadas por este mecanismo durante las reacciones iniciadas con ozono con terpenos representan solo un pequeño porcentaje de reacciones al ozono [33,34].

El mecanismo principal que forma el formaldehído se inicia por la reacción del ozono con el grupo funcional C=C para generar ozonuro. Posteriormente, el ozonuro se descompone en un carbonilo y un intermedio de Criegee rico en energía (birradical). Ambos productos participan en varias reacciones de oxidación adicionales para formar especies altamente reactivas como los radicales hidroxilos y productos estables. Estos productos estables pueden ser cetonas y ácidos carboxílicos si el proceso ha tenido lugar en un medio oxidante o aldehídos y cetonas cuando el proceso ha tenido lugar en un medio reductor.

Se observó la formación de carbonilos estables con bajos pesos moleculares, incluyendo formaldehído, acetaldehído, acetona y propionaldehído, durante las reacciones en fase gaseosa del ozono con terpenos [31,33,36]. Los radicales hidroxilos reactivos generados a partir de reacciones de ozono con terpenos jugaron un papel vital en la formación de formaldehído en interiores.

Los radicales hidroxilos reactivos generados a partir de reacciones de ozono con terpenos jugaron un papel vital en la formación de formaldehído en interiores. Varios estudios han indicado que las concentraciones de radicales OH• en interiores generadas por reacciones de ozono con compuestos insaturados fueron más altas que las de exteriores al mediodía o la noche [42-44]. Los radicales OH• fueron responsables del 56 ~ 70% del formaldehído en interiores en las reacciones entre el ozono y los 23 VOC y el ozono y los terpenos [45]. Por lo tanto, un nuevo objetivo es la evaluación de las reacciones de los radicales OH• mediante terpenos y la posible contribución para obtener altos niveles de formaldehído en interiores y los posibles efectos sobre la calidad del aire interior [46].

Prueba de seguridad

Una vez que se verificó que el consumo total de limoneno y peróxido de hidrógeno no excede los límites que se consideran teratogénicos y cancerígenos en humanos y que la

emisión de ozono es menor que en las reglamentaciones internacionales, se evaluó la efectividad en la reducción de formaldehídos en la oxidación avanzada de limoneno con Wadu02® utilizando el método de prueba SPS-KACA002-132: 2016 en condiciones controladas de temperatura y humedad (21 ± 1)°C (45 ± 5)% HR con d-limoneno en cartucho y con d-limoneno en gel [47]. Los resultados indican que la reducción de formaldehído en las reacciones de ozonólisis con emisiones inferiores a 0.020 ppm y con bajas concentraciones de d-limoneno con una evaporación de 0.4 g/24 h equivalente a 1.84 ppm es significativa y alcanza valores del 19% con gel y 41% con cartucho de limoneno líquido.

Estos resultados muestran que, a pesar de la alta reactividad del d-limoneno con ozono para la formación de formaldehído, la emisión controlada de ozono por debajo de 0.02ppm y la evaporación de limoneno por debajo de 2ppb en un espacio de 60m2 es una reacción segura e inofensiva.

Para validar esta hipótesis, se llevaron a cabo una serie de pruebas experimentales para determinar la reducción de partículas y contaminantes del aire emitidos por la quema de una varilla de incienso durante una exposición de 2 horas a un purificador de aire Wadu02®, utilizando cartuchos cargados con d-limoneno. y H₂O₂ en una cámara de volumen controlado de 225.72 m³ (6.6 X 6 X 5.7) [48].

Se realizaron cinco ensayos sobre la calidad del aire, en diferentes condiciones: la primera lectura se determinó en la calidad del aire inicial en la sala, sin ninguna exposición al incienso o purificadores de aire. La segunda conferencia se tomó después de 2 horas desde que se quemó la mitad de la barra de incienso; la tercera clase se determinó cuando se alcanzó la calidad del aire inicial y luego, se quemó la mitad de una varilla de incienso con la presencia de un purificador de aire con cartucho de peróxido de hidrógeno durante dos horas. La cuarta lectura se tomó con las mismas condiciones que la tercera, pero, en este caso, con un purificador de aire con cartucho de D-limoneno; y finalmente la quinta conferencia fue determinada por las mismas condiciones que la tercera y cuarta, pero esta vez con la presencia de ambos purificadores de aire (cartuchos de D-limoneno y peróxido de hidrógeno).



Figura 1. Medidas sobre la calidad del aire antes y después de contaminar la sala con la combustión de una varilla de incienso, comparación de la seguridad y la eficacia de Wellis en la eliminación de VOC's y formaldehído con cartucho de peróxido de hidrógeno y d-limoneno.

El estudio muestra que bajo estas condiciones; quemar una varilla de incienso genera una mala calidad del aire un promedio de 30 minutos después del inicio de la combustión; con una tendencia a regularizarse después de una hora, a volver a las condiciones iniciales

dos horas después del inicio de la combustión, ya que las partículas emitidas se dispersaron en el espacio aéreo de la habitación. Sin embargo, las lecturas de formaldehído y VOC son más altas que la lectura de control, lo que refleja un riesgo de exposición prolongada.

Los resultados en presencia de purificadores Wadu02®, independientemente del contenido del cartucho (d-limoneno o H₂O₂), mantienen la calidad del aire inicial desde la primera media hora de exposición; reduciendo significativamente los valores de partículas, formaldehído y COV. La eficacia en términos de reducción de formaldehído y COV según el uso de d-limoneno o H₂O₂ para llevar a cabo la emisión de radicales OH• no es significativa, aunque el H₂O₂ presenta valores más eficientes.

Los resultados permiten declarar eso; el funcionamiento del purificador de aire Wadu02®, basado en la emisión de ozono en bajas concentraciones (< 20 ppb) y la evaporación de cantidades estandarizadas de d-limoneno o H₂O₂ del cartucho, para la ejecución del proceso de oxidación avanzada; son seguros, inofensivos y efectivos para reducir las partículas suspendidas, los COV y el formaldehído.

Aplicación de radicales OH• como biocida de amplio espectro

Los radicales libres y los iones causan alteraciones irreversibles en las macromoléculas (proteínas, membrana o ADN) como consecuencia del movimiento de los electrones, por lo que tienen un efecto mórbido. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) son las más inestables, reactivas y las que primero reaccionan con los demás. Dentro de este grupo, el radical OH• es la especie con una vida media más efímera debido a su alta reactividad y, por lo tanto, será la más peligrosa [49].

Se estudió la eficacia de la concentración de radicales OH• en la eliminación de microorganismos patógenos. En condiciones de densidad de pulverización de 21 µL/cm² y en tiempos de procesamiento de 4 segundos, se ha informado una disminución dramática en las células de supervivencia para *S. Marcescens* a concentraciones justo por encima de 0,15 mg/L y casi por completo en concentraciones de 0,41 mg/L. En *B. subtilis*, los niveles fueron prácticamente indetectables a concentraciones de 0.5 mg/L, mientras que en las esporas de bacilo la reducción fue significativa a niveles de 0.3mg/L y prácticamente completamente a concentraciones máximas de 0.8mg/L.

La función biocida de los radicales OH• se basa en el proceso avanzado de oxidación. Este mecanismo de estrés celular es generado por el fenómeno de "explosión respiratoria" a través de una cascada de reacciones por la liberación de especies reactivas de oxígeno [51-52]:

- 1) El radical OH• es la especie más reactiva en biología. (vida media 100 picosegundos)
- 2) El peróxido de hidrógeno puede pasar a través de membranas biológicas.
- 3) El ion hipoclorito modifica y degrada todas las moléculas biológicas. Es un producto de la explosión respiratoria (similar a la mitocondrial).

Los principales efectos de estas formas reactivas ocurren en las membranas, lípidos y enlaces sulfhidrilo de las proteínas y nucleótidos del ADN53, produciendo:

· Peroxidación lipídica, cuyos peróxidos resultantes inician una reacción en cadena catalítica que conduce a una mayor pérdida de ácidos grasos insaturados y un daño extenso en la membrana.

- Producción de enlaces cruzados entre proteínas, a través de la formación de enlaces disulfuro.
- Mutaciones en el material genético del microorganismo patógeno.

Durante el proceso de oxidación celular, las cadenas insaturadas son fácilmente atacadas por los radicales OH^\bullet . La peroxidación de los ácidos grasos en las membranas genera radicales peroxilo (ROO^\bullet), disminuyendo su funcionalidad. Estos radicales tienen una reactividad menor que los radicales OH^\bullet y, por lo tanto, su vida media es algo más larga. La presencia de daños en la célula causados por el estrés oxidativo provoca una respuesta antioxidante en la célula: intentan pasar los electrones de una especie a otra hasta que inactivan los radicales y restablecen su estabilidad. Por otro lado, estas interacciones pueden generar cascadas, extendiendo el daño [54].

Oxidación lipídica. Las membranas biológicas están formadas por cadenas de ácidos grasos insaturados y se oxidan fácilmente. Los radicales OH^\bullet atacan los dobles enlaces de estas estructuras y dejan un electrón no apareado en la cadena que se unirá a una molécula de oxígeno (O_2) para reestabilizarse, dando lugar a un radical peroxilo. La formación de radicales peróxidos modifica su funcionalidad de manera irreversible, ya que cambia su distribución espacial causando inestabilidad en la membrana [55].

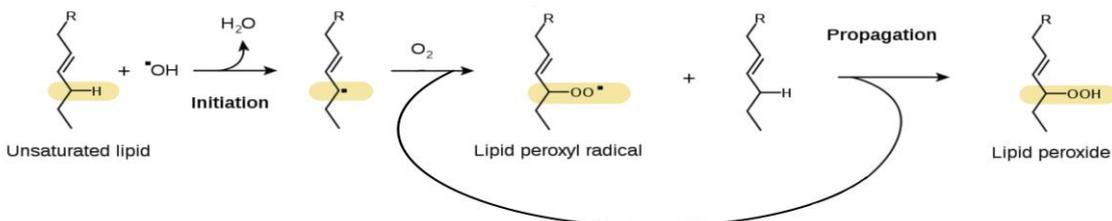


Figura 2. Los radicales OH^\bullet atacan los enlaces de estas estructuras y generan una cadena con un electrón no apareado, que reaccionará con una molécula de oxígeno (O_2) para reestabilizarse. Como producto, los radicales peroxilo aparecen en la membrana, que actúa como retroalimentación positiva, aumentando aún más el daño a la membrana.

Oxidación proteica directa (producida por RONS) o indirecta (producida por peroxidación lipídica)

Los radicales libres causan cambios en la estructura molecular de los aminoácidos al modificar su carga. Esto puede terminar rompiendo la cadena de polipéptidos, fragmentando la proteína. Los radicales peroxilo dan lugar a sustancias con grupos aldehído, especies altamente reactivas que establecen covalencia entre grupos de proteínas del lado amino. La reticulación, intra e interproteína. Finalmente hay pérdida de conformación y formación de agregados de proteínas, y por lo tanto, la disminución / inhibición del funcionamiento correcto de la proteína.

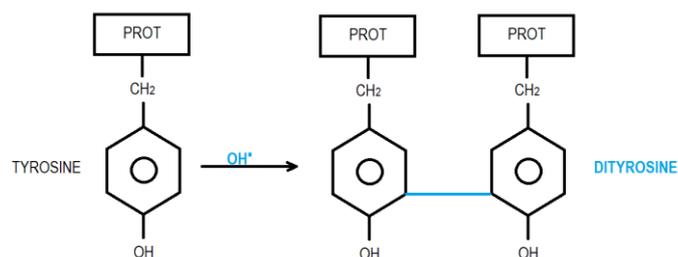


Figura 3. Los radicales OH • forman puentes covalentes irreversibles entre dos tirosinas, dando al producto final ditirosina. Esto no es reconocido por las quinasas de las vías de señalización, por lo que se pierde la información que el Tyr tuvo que transmitir. Además, esta estructura no es degradable, de modo que las proteínas funcionales se acumulan con los puentes intra e intermoleculares.

Cambios morfológicos de microorganismos.

El estudio de Bai et al 2012 [50] verificó los cambios morfológicos de las esporas de *B. subtilis* y *Bacillus* con tratamiento con radicales OH• bajo observación microscópica en esporas de *B. Subtilis*, *S. Marcescens* y *Bacillus*.

Se observó claramente que *B. subtilis* en forma de caña intacta y citoplasma distribuido uniformemente después del tratamiento con radicales OH•, perdió en gran medida la integridad de la membrana. En comparación, las células de esporas de *Bacillus* presentan un revestimiento externo resistente de múltiples capas que hace imposible matar rápidamente las esporas de *Bacillus* con desinfectantes químicos convencionales como cloro, álcali y alcohol alcalino-amina. Sin embargo, después del tratamiento con radicales OH•, las esporas del bacilo también se rompieron y las células de forma redonda desaparecieron. En consecuencia, las esporas de *Bacillus* requieren una mayor concentración de OH• eliminación de radicales, densidad de pulverización: dispersión y tiempo. La concentración, la densidad de pulverización de dispersión y el tiempo de procesamiento son los tres parámetros importantes para el efecto destructivo de los radicales OH• en los microorganismos.

La demostración de que el efecto de los radicales OH• en un microorganismo será con mayor eficacia biocida de acuerdo con su estructura más superficial recogida en estudios previos determina la necesidad de reconocer las características morfológicas de los microorganismos patógenos desde su capa externa hasta el interior de la célula específica. [56,57].

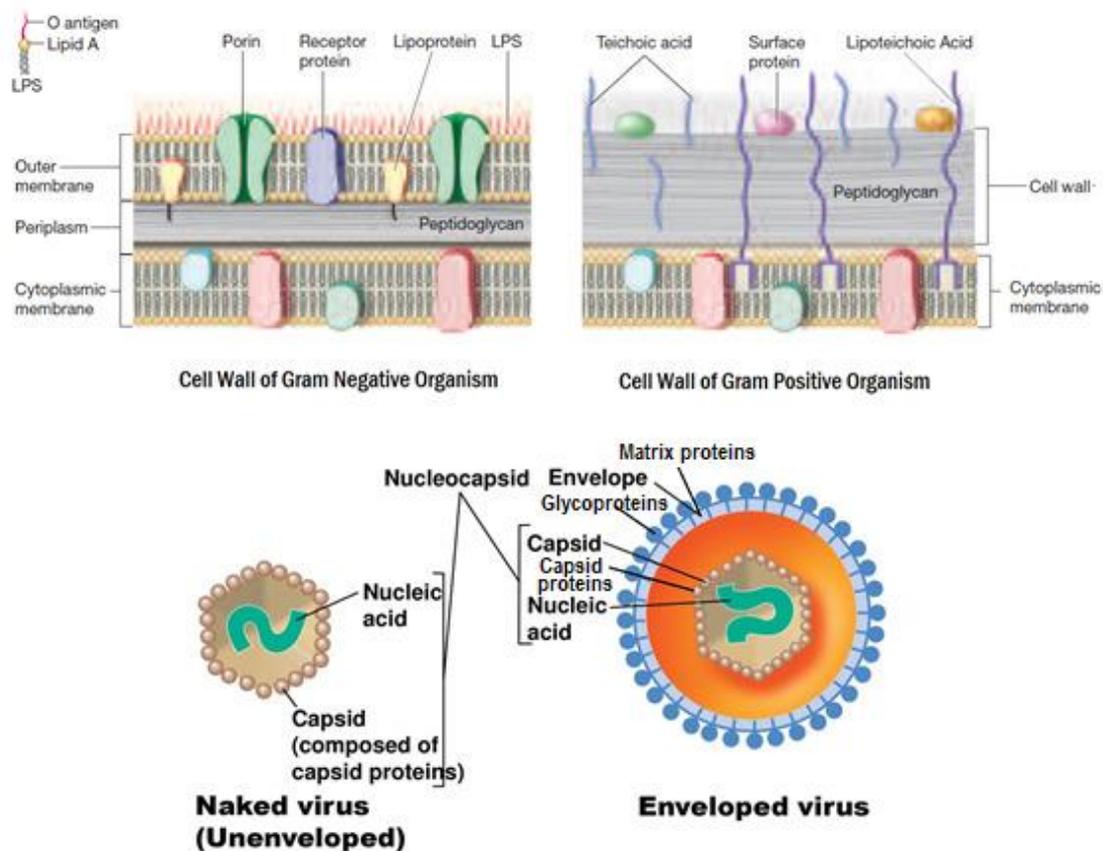


Figura 4: Envolturas celulares según el tipo y la morfología de virus y bacterias. Adaptado de Pearson Education, Inc © 2015 & Laboratoryinfo.com

Algunos microorganismos han podido revertir este proceso oxidativo a través de la superóxido dismutasa (SOD), una familia de tres metaloenzimas (FeSOD, MnSOD y CuZnSOD) con una alta capacidad de interactuar con oxidantes, neutralizándolos y reduciendo el daño oxidativo. Como es el caso con MnSOD que *Escherichia coli* sintetiza [58] después de la exposición al oxígeno y es inducida por la presencia de radicales superóxido. Tanto la SOD como la actividad catalasa se han detectado en el citosol de las células microbianas y en el espacio periplásmico (ubicado entre la membrana plasmática y la pared celular) de la bacteria. Asimismo, se ha demostrado un papel protector contra las ROS generadas en el estallido respiratorio de catalasa en *Staphylococcus aureus*. [59-61]

En los últimos años, han sido desarrollados por diferentes laboratorios, certificadores externos y centros universitarios de investigación; Diversos estudios para comprobar la eficacia biocida del Wadu02®, en presencia de microorganismos patógenos en diferentes espacios.

Los resultados se reflejan en la siguiente tabla, en la que podemos mostrar que, en el caso de las bacterias gram + y gram -, la reducción alcanza un promedio de 99.9% en promedio en la primera hora de exposición al proceso avanzado de oxidación en el aire y superficies.

En el caso de los virus, los resultados se observan dependiendo de las condiciones de humedad relativa y la morfología del virus. Los resultados de eficacia de Wadu02® en virus sin envoltura indican que en condiciones húmedas la eficacia es menor que en ambientes secos, se alcanzan promedios del 99%. Mientras se encuentra en virus envueltos, la humedad favorece el proceso avanzado de oxidación y la eliminación de virus que en ambientes secos.

Informe sobre estabilidad y desinfección de 2019-nCoV

El 2019-nCoV es una nueva cepa de coronavirus que se detectó por primera vez en la ciudad de Wuhan (China) en diciembre de 2019. El número de pacientes infectados ha crecido rápidamente en las últimas semanas, convirtiéndose en un grave problema de salud pública. La transmisión del virus ocurre principalmente a través de gotitas respiratorias producidas por una persona infectada que puede llegar a la boca o la nariz de personas cercanas o posiblemente inhalarse a los pulmones. Los coronavirus son una gran familia de virus que son comunes en muchas especies diferentes de animales, incluidos camellos, vacas, gatos y murciélagos. En raras ocasiones, los coronavirus animales pueden infectar a las personas y luego propagarse entre personas como con MERS, SARS y ahora con 2019-nCoV [62].

El nuevo coronavirus ha sido clasificado como un Betacoronavirus, como MERS y SAR, los cuales tienen su origen en los murciélagos. Los coronavirus están en la subfamilia Coronavirinae en la familia Coronaviridae, en el orden Nidovirales. Se dividen en 4 subgéneros Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Deltacoronavirus y Gammacoronavirus [63].

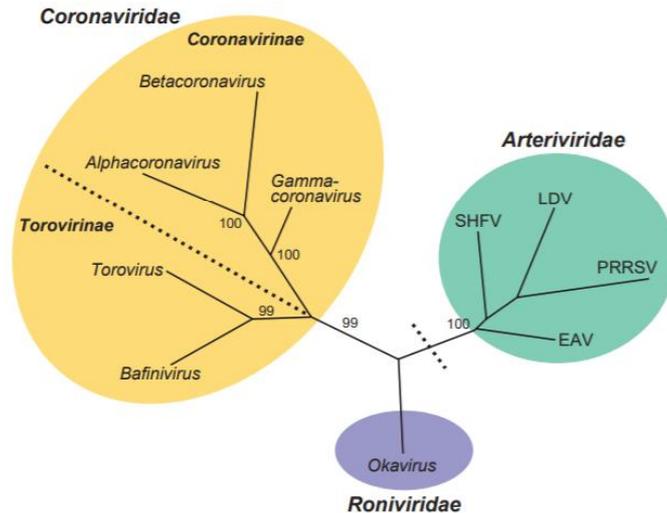


Figura 5. Filogenia del nidovirus. El orden Nidoviral consta de tres familias: Coronavirinae, Roniviridae y Arteriviridae (Comité Internacional de Taxonomía de Virus, 2012).

Según el material genético, estos virus se incluyen en el grupo IV de la clasificación de Baltimore, ya que la partícula viral contiene solo una cadena de ARN de cadena simple lineal de polaridad positiva. Por lo tanto, el material genético en sí mismo actúa como un ARN mensajero ya que comparten la polaridad positiva, cuando se traducen, la ARN polimerasa y las diferentes proteínas estructurales que forman la cápside se sintetizan [64].

Su diámetro es de alrededor de 60-200 nm, presentan una nucleocápside con simetría helicoidal y una vaina lipídica que se deriva de la membrana de la célula huésped previamente infectada y contiene glucoproteínas y antígenos de superficie. De la vaina lipídica surgen las proyecciones características de este género formando una corona solar alrededor que es visible bajo un microscopio y le da nombre a la familia. A pesar de lo que podría esperarse, tener una envoltura implica que el virus es sensible a diferentes factores y agentes externos como calor, solventes lipídicos, detergentes no iónicos, formaldehído y agentes oxidantes e irradiación UV [63].

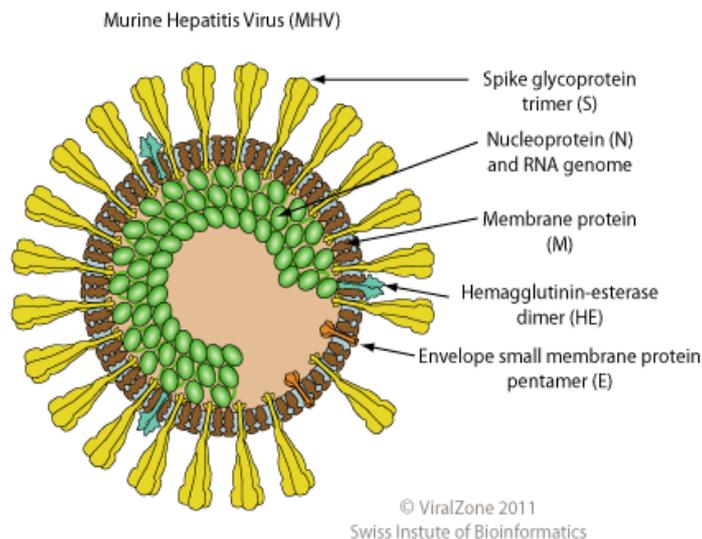


Figura 6. Proteínas estructurales de coronavirus (ViralZone)

Como se puede ver en la figura 4, la cápside de coronavirus consta de las siguientes proteínas estructurales:

La glicoproteína Spike (S) sobresale de la envoltura externa del virus formando la "corona" visible bajo un microscopio. Su función es adherirse a las proteínas que se encuentran en la superficie de la célula que se infectará. En algunos casos, la proteína S hace que la célula infectada se fusione con otras células adyacentes, favoreciendo así la propagación del virus.

La proteína de envoltura (E) es responsable de la formación de nuevas partículas virales y su liberación de la célula infectada, siendo necesaria para la difusión del virus.

La proteína de membrana (M) está unida a la parte interna de la membrana del virus y hace que esta membrana se doble, determinando la forma esférica de los viriones. Esta proteína (M) también interactúa con la nucleocápside formada por el ARN del virus y la proteína (N). Finalmente, la proteína de la nucleocápside (N) se fosforila y se une al genoma viral durante el ensamblaje.

Son virus distribuidos en todo el mundo debido a su diversidad genética, sus cortos períodos de incubación y la alta tasa de mutación que presentan. La combinación de estos factores permite que el patógeno infecte no solo a los animales sino también a los humanos.

Es bien sabido que el ozono, a concentraciones superiores a 100 ppm y altas tasas de humedad, es un tratamiento de desinfección eficaz, y especialmente para los virus de ARN con o sin envoltura [65-67]. Sin embargo, las altas concentraciones de ozono pueden ser perjudiciales para la coexistencia en entornos urbanos habitables. Se ha informado que las especies reactivas de oxígeno (ROS), incluidos los radicales OH^\bullet , el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ozono O_3 , mejoran la eficacia de desinfección de varios microorganismos [68,69].

Según los resultados obtenidos con Wadu02® en virus con estructuras similares (RSV) a Covid-19, podemos esperar que la eficacia del dispositivo tenga un resultado de eliminación esperado de un promedio de 99 a 92% dependiendo de las condiciones de humedad relativa.

Tabla 1. Test result (limonene)

Pathogen	Tabla 1. Test result (limonene)			Documented testing
	Means of dispersion	Exposure	effectiveness %	
<i>Bacillus subtilis</i>	Surface	1 h	99,4	Bacillus, Esch, Staph - KNU
	Air	20 min	99,6	Bacillus, Esch, Staph - KNU
<i>Staphylococcus aureus</i>	Surface	1 h	52,3	Bacillus, Esch, Staph - KNU
	Surface	4 h	99,9	Esch, Pseudo, Staphy- KCL
	Air	1 h	99,9	Bacillus, Esch, Staph - KNU

Tabla 1. Test result (limonene)

Pathogen	Means of dispersion	Exposure	effectiveness %	Documented testing
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>resistente (MRSA)</i>	Surface	4 h	99,9	Salm, Kleb, MRSA - KCL
	Air	4 h	99,9	MRSA - KCL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Surface	4 h	99,9	Esch, Pseudo, Staphy- KCL
<i>Enterobacter species:</i> <i>Salmonella</i>	Surface	4 h	99,9	Salm, Kleb, MRSA - KCL
<i>Enterobacter species:</i> <i>Klebsiella</i>	Surface	4 h	99,9	Salm, Kleb, MRSA - KCL
	Air	4 h	99,9	Klebsiella - KCL
<i>Enterobacter species:</i> <i>Escherichia coli</i>	Surface	1 h	99,9	Bacillus, Esch, Staph - KNU
	Surface	4 h	99,9	Esch, Pseudo, Staphy- KCL
	Air	20 min	99,9	Bacillus, Esch, Staph - KNU
<i>Influenza virus</i> <i>(Enveloped)</i>	Wet	30 min	86	Influenza A - UB
	Dry	30 min	38	Influenza A - UB
VRS <i>(Enveloped)</i>	Wet	2 h	99	VRS - UB
	Dry	2 h	92	VRS - UB
<i>Rotavirus</i> <i>(Naked)</i>	Wet	2 h	37	RoV - UB
	Dry	2 h	99	RoV - UB

Conclusiones

Los resultados muestran que el uso de radicales OH^\bullet en el proceso de oxidación avanzada producido por el purificador Wadu02®, es un nuevo método seguro y efectivo para eliminar rápidamente los microorganismos patógenos en grandes espacios y superficies de aire.

La aplicación de radicales OH^\bullet en diferentes estudios, ha demostrado que su aplicación en procesos de oxidación avanzados, estandarizados como medida de seguridad realizada por Wadu02®; son seguros, inocuos y efectivos en el control de microorganismos patógenos, eliminación de partículas en suspensión, formaldehído y COV (Componentes Orgánicos Volátiles).

La evidencia sobre la eficacia de los radicales OH^\bullet como biocida nos muestra que su uso está respaldado por ser un oxidante fuerte, capaz de eliminar microorganismos en bajas

concentraciones (0.8 mg / L) equivalentes a 10 milésimas de la dosis de desinfectantes químicos convencionales. Su densidad de pulverización: la dispersión es de 22 ml / cm², lo que representa una milésima parte de otros desinfectantes, su velocidad de reacción constante alta 10⁹L/mol • s en el procesamiento de radicales OH• es inferior a 4 segundos, que es la milésima parte de los desinfectantes químicos.

Finalmente, el daño que se ha observado a los patógenos bajo un microscopio es irreversible.

Basando nuestro estado homeostático en el correcto funcionamiento de nuestro sistema antioxidante interno y la demostración experimental del uso de radicales OH• de manera efectiva en la desinfección del aire y las superficies, podemos emitir una declaración de seguridad sobre el uso de la tecnología Wadu02® para lograr la seguridad, Procesos de oxidación avanzados efectivos e inofensivos en humanos en los procesos de purificación y descontaminación del aire y las superficies.

Bibliografía

1] De la Rosa, MC; Mosso, MA; Ullán, C. (2002) El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observ. Medioambiental*; 5:375 -402.

[2] Smith RD. (2006) Responding to global infectious disease outbreaks: lessons from SARS on the role of risk perception, communication and management. *Soc Sci Med*;63(12):3113-23.

[3] Writing Committee of the WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza, Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, Uyeki TM, Zaki SR, Hayden FG, Hui DS, Kettner JD, Kumar A, Lim M, Shindo N, Penn C, Nicholson KG. (2010) Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med*; 362(18):1708-19. Review. Erratum in: *N Engl J Med*. 2010 May 27;362(21):2039.

[4] Chan PK, Chan MC. (2013) Tracing the SARS-coronavirus. *J Thorac Dis*;5(Suppl.2): S118-21.

[5] Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*;395(10223):497-506.

[6] Isaksen, I.S.A.; Dalsoren, SB. (2011) Getting a better estimate of an atmospheric radical. *Science* 331: 31-9.

[7] Mindong Bai, Zhitao Zhang, Yiping Tian & Mindi Bai (2012) Rapidly eliminating pathogenic microorganisms in large air space using spraying OH• radicals, *Journal of the Air & Waste Management Association*, 62:4, 393-7.

[8] Raber, E., Jin, A., Noonan, K., McGuire, R. and Kirvel, R.D. (2001) Decontamination issues for chemical and biological warfare agents: How clean is clean enough? *Int. J. Environ. Health Res.*, 11: 128–148.

[9] Raber, E. and McGuire, R. (2002) Oxidative decontamination of chemical and biological warfare agents using L-Gel. *J. Hazard. Mater.*, 93: 339–352.

[10] Roberto, A. and Vincenzo, C. (1999) Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catal. Today*, 53: 51–9.

- [11] Glaze, W.H., Kang, J.W. and Chapin, D.H. (1987) The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone Sci. Eng.*, 9: 335–6.
- [12] Elías, A; Rogero, S; Fernández, I; Montes, J; Luengas, T; Gurtubay, L. (2012) Contribución de los COV's a la contaminación del aire interior, Communication XVI International Congress of Project Engineering. Valencia, Spain.
- [13] Shreya, S., Boris, D. and Vishal, S. (2007) Development of a new approach for microbial decontamination of water using modified Fenton's reaction. *Environ. Pollut.*, 148: 674–8.
- [14] Veressinina, G.Y. and Trapido, M. (2008) Degradation of salicylic acid by Fenton and modified Fenton treatment. *Chem. Eng. J.*, 143: 1–9.
- [15] Maurizio, A. and Vincenzo, A. (2005) Oxidation of oxalate ion in aqueous suspensions of TiO₂ by photocatalysis and ozonation. *Catal. Today*, 107–108: 612–8.
- [16] Naoyuki, K. and Yukako, M. (2005) Advanced oxidation effect of ozonation combined with electrolysis. *Water Res.*, 39: 4661–72.
- [17] Nick, S. and Satoshi, H. (2010) Microwaves in advanced oxidation processes for environmental applications. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, 11: 114–31.
- [18] Bai, M.D., Bai, X.Y., Zhang, Z.T., Bai, M.D. and Yang, B. (2005) Treatment of red tide in Ocean using non-thermal plasma based advanced oxidation technology. *Plasma Chem. Plasma Process.*, 25: 539–50.
- [19] Bai, X.Y., Zhang, Z.T., Bai, M.D. and Yang, B. (2005) Killing of invasive species of ship's ballast water in 20t/h system using hydroxyl radicals. *Plasma Chem. Plasma Process.*, 25: 41–54.
- [20] Gargori,C; Galindo,R; Llusar,M; Tena,MA; Monrós,G; Badenes,JA.(2009) Photocatalytic degradation of Orange II by titania addition to sol-gel glasses. *Sci and Tech*; 50:314-20
- [21] WHO (2000) Guías de la calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. (2005) (<http://www.euro.who.int/Document/E87950>)
- [22] Intertek (2018) Ozone emissions testing of household electrostatic air cleaners report number:103502990CRT-001, GFT-OP-10o.
- [23] Real Decreto 374/2001, de 6 de abril sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo. (BOE núm. 104 de 1 de mayo de 2001.)
- [24] Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales.
- [25] Castellanos, FE. (2007). Biotransformación de limoneno y aceites esenciales de naranja y mandarina empleando *aspergillus niger*. Chemical Master degree thesis. Universidad Industrial de Santander.
- [26] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Waoum M.(2008) Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol.* 46:446-75.
- [27] Nøjgaard JK, Bilde M, Stenby C, Nielsen OJ, Wolkoff P. (2006) The effect of nitrogen dioxide on particle formation during ozonolysis of two abundant monoterpenes indoors. *Atmos Environ*; 40:1030-42.

- [28] Weschler CJ. (2006) Ozone's impact on public health: Contributions from indoor exposures to ozone and products of ozone-initiated chemistry. *Environ Health Perspect*; 114:1489-96.
- [29] Wells JR, Forester CD. (2009) Yields of carbonyl products from gas-phase reactions of fragrance compounds with OH radical and ozone. *Environ Sci Technol*; 43:3561-8.
- [30] Sabersky RH, Sinema DA, Shair FH. (1973) Concentrations, decay rates, and removal of ozone and their relation to establishing clean indoor air. *Environ Sci Technol*; 7:347-53.
- [31] Weschler CJ. (2000) Ozone in Indoor Environments: Concentration and Chemistry. *Indoor Air*;10:269-88.
- [32] Grosjean D, Williams EL, Grosjean E, Andino JM, Seinfeld JH. Atmospheric oxidation of biogenic hydrocarbons: reaction of ozone with beta-pinene, D-limonene and trans carophyllene.(1993) *Environ Sci Technol*;27:2754-8.
- [33] Shu Y, Kwok ESC, Tuazon EC, Atkinson R, Arey J. (1997) Products of the gas-phase reactions of linalool with OH radicals, NO₃ radicals, and O₃. *Environmental science & technology*; 31:896-904.
- [34] Fan Z, Liroy P, Weschler C, Fiedler N, Kipen H, Zhang J. (2003) Ozone-initiated reactions with mixtures of volatile organic compounds under simulated indoor conditions. *Environ Sci Technol*; 37:1811-21.
- [35] Tamás G, Weschler CJ, Toftum J, Fanger PO. (2006) Influence of ozone-limonene reactions on perceived air quality. *Indoor Air*; 16:168-78.
- [36] Lamorena RB, Lee W. (2008) Influence of ozone concentration and temperature on ultra-fine particle and gaseous volatile organic compound formations generated during the ozone-initiated reactions with emitted terpenes from a car air freshener. *J Hazard Mater*; 158:471-7.
- [37] Huang YT, Chen CC, Chen YK, Chiang CM, Lee CY. (2012) Environmental test chamber elucidation of ozone-initiated secondary pollutant emissions from painted wooden panels in buildings. *Build Environ*; 50:135-40.
- [38] Wainman T, Zhang J, Weschler CJ, Liroy PJ. (2000) Ozone and limonene in indoor air: a source of submicron particle exposure. *Environ Health Perspect*; 108:1139-45.
- [39] Lamorena RB, Jung SG, Bae GN, Lee W. (2007) The formation of ultra-fine particles during ozone-initiated oxidations with terpenes emitted from natural paint. *J Hazard Mater*; 141:245-51.
- [40] Sarwar G, Corsi R. (2007) The effects of ozone/limonene reactions on indoor secondary organic aerosols. *Atmos Environ*; 41:959-73.
- [41] Chemical agent directive 98/24/EC and Framework Directive 89/391/EEC
- [42] Weschler CJ, Shields HC. (1996) Production of the hydroxyl radical in Indoor Air. *Environ Sci Technol*; 30:3250-8.
- [43] Weschler CJ, Shields HC. (1997) Measurements of the hydroxyl radical in a manipulated but realistic indoor environment. *Environ Sci Technol*; 31:3719-22.
- [44] Sarwar G, Corsi R, Kimura Y, Allen D, Weschler CJ. (2002) Hydroxyl radicals in indoor environments. *Atmos Environ*; 36:3973-88.

- [45] Weschler CJ. (2004) Chemical reactions among indoor pollutants: what we've learned in the new millenium; 14:184-94.
- [46] Huang, H. L., Tsai, T. J., Hsu, N. Y., Lee, C. C., Wu, P. C., & Su, H. J. (2012). Effects of essential oils on the formation of formaldehyde and secondary organic aerosols in an aromatherapy environment. *Building and Environment*, 57, 120-125.
- [47] Korea Conformity Laboratories (2017). SPS-KACA002-132:2016 / Wadu02-A-03.
- [48] Universitat Politècnica de Catalunya CRESCA-UPC. Salmeron D, AM; Picón T, J; García R, J. (2019) Test of remove effect particle matters, VOC's and formaldehyde by means of hydrogen peroxide and d-limonene.
- [49] Riley PA. (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*;65(1):27-33.
- [50] Bai M, Zhang Z, Tian Y, Bai M. (2012) Rapidly eliminating pathogenic microorganisms in large air space using spraying *OH radicals. *J Air Waste Manag Assoc*; 62(4):393-7.
- [51] Shapoval GS, Gromovaia VF. (2003) Mechanism of antioxidant protection of an organism from oxidative stress. *Ukr Biokhim Zh*;75(2):5-13.
- [52] Adair TM. (1996) Is peroxide a hazard? *J Am Dent Assoc*;127(4):422.
- [53] Huttunen J. (1994) Free radicals and antioxidants. Advantages of antioxidants in clinical medicine, truth or fiction? *Duodecim*;110(17):1606-8.
- [54] Ede S, Hafner L, Dunlop P, Byrne J, Will G. (2012) Photocatalytic disinfection of bacterial pollutants using suspended and immobilized TiO₂ powders. *Photochem Photobiol*;88(3):728-35.
- [55] Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. (1995) Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J*.;6(2):85-90.
- [56] O'Brien D, Stevens N, Fitzgerald-Hughes D, Humphreys H. Effect of a novel air disinfection system on airborne micro-organisms in a hospital outpatient clinic (2012) *J Hosp Infect*;80(1):98-9.
- [57] Wong V, Staniforth K, Boswell TC. (2011) Environmental contamination and airborne microbial counts: a role for hydroxyl radical disinfection units? *J Hosp Infect*;78(3):194-9.
- [58] Hao J, Qiu S, Li H, Chen T, Liu H, Li L. (012) Roles of hydroxyl radicals in electrolyzed oxidizing water (EOW) for the inactivation of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol*;155(3):99-104.
- [59] Zhang Q, Ma R, Tian Y, Su B, Wang K, Yu S, Zhang J, Fang J. (2016) Sterilization Efficiency of a Novel Electrochemical Disinfectant against *Staphylococcus aureus*. *Environ Sci Technol*;50(6):3184-92.
- [60] O'Brien D, Stevens N, Fitzgerald-Hughes D, Humphreys H. Effect of a novel air disinfection system on airborne microorganisms in a hospital outpatient clinic. *J Hosp Infect*. 2012 Jan;80(1):98-9.
- [61] Wong V, Staniforth K, Boswell TC. (2011) Environmental contamination and airborne microbial counts: a role for hydroxyl radical disinfection units? *J Hosp Infect*;78(3):194-9.

- [62] Novel coronavirus 2019 situation summary, Wuhan, China, CDC (date unknown)
- [63] Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic acids research*, 46(D1), D708–D717.
- [64] Fehr AR, Perlman S. (2015) Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol*; 1282:1-23.
- [65] WHO guidelines on hand hygiene in health care: first global patient safety challenge clean care is safer care
- [66] Sato H, Wananabe, Y; Miyata, H. (1990) Virucidal effect of ozone treatment of laboratory animal viruses. *Exp Anim*; 39:223-9.
- [67] Breidablik, HJ; Lysebo, DE; Johannessen, L; Skare, A; Andersen, JR; Kleiven, OT (2019) Ozonized water as an alternative to alcohol based hand disinfection. *J Hosp Infect*, 102:419-24.
- [68] Jeong, J; Kim, JY; Yoon, J. (2006) The role of Reactive oxygen species in the electrochemical inactivation of microorganisms. *Environ Sci Technol* 40:6117-122.
- [69] Huang, X; Qu, Y; Cid, CA; Finke, C; hoffman, MR; Lim, K; Jiang, SC. (2016) Electrochemical disinfection of toilet wastewater electrolysis cell 92:164-72