

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 913**

51 Int. Cl.:

A61K 33/20 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 27/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2010** **E 10743222 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015** **EP 2442818**

54 Título: **Métodos de tratamiento de trastornos oculares externos usando agua ácida de alto ORP y composiciones de la misma**

30 Prioridad:

04.09.2009 US 239912 P

17.06.2009 US 187900 P

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

03.11.2015

73 Titular/es:

APR NANOTECHNOLOGIES S.A. (100.0%)

Via Corti 5

6828 Balerna, CH

72 Inventor/es:

CHEN, YONGGE y

DENONI, ROBERTO

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 549 913 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de tratamiento de trastornos oculares externos usando agua ácida de alto ORP y composiciones de la misma

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a métodos farmacológicos de tratamiento de trastornos oculares externos usando agua ácida que tiene un alto potencial de oxidación reducción (ORP) y composiciones de la misma.

Antecedentes de la invención

Trastornos oculares externos

[0002] El ojo externo incluye varios órganos, que incluyen la córnea, el iris y el cristalino. El iris es una membrana del ojo, responsable de controlar la cantidad de luz que alcanza la retina. La córnea y el cristalino refractan la luz sobre la retina. Los ojos sanos producen una visión clara como resultado de la transparencia de la córnea y el cristalino. La catarata, una opacidad del cristalino del ojo, puede obstruir el paso de la luz y dar como resultado una pérdida de visión gradual. Desafortunadamente, existen muy pocos tratamientos por las cataratas, distintos de reemplazar el cristalino con cataratas por un cristalino artificial mediante un procedimiento quirúrgico complicado.

[0003] Los trastornos tales como queratitis, neovascularización, y deficiencia del epitelio también pueden reducir la visión al interferir en la transparencia de la córnea. Estos trastornos pueden ser el resultado de numerosas causas, incluyendo infecciones virales y bacterianas, traumatismos y cirugía. A menudo se usan antibióticos y agentes antivirales para tratar las causas infecciosas, pero en numerosos casos el paciente no tiene otra elección que someterse a un procedimiento quirúrgico complicado para retirar el tejido dañado antes de que pueda cicatrizar y reducir la vista.

[0004] Los documentos de Publicación PCT WO 2004/012748 y WO 2001/054704 enseñan una solución ácida ionizada isotónica para el cuidado de heridas, y ofrecen un agua basada en sus características antioxidantes y propiedades antimicrobianas. Las publicaciones exponen que la solución se puede usar en lugar de la solución salina en aplicaciones oftálmicas tales como soluciones de limpieza de lentes de contacto o para la irrigación del ojo durante cirugía oftálmica, y que las propiedades de la solución dependen de los intervalos de concentración particulares de una mezcla de sales.

[0005] Permanece la necesidad de métodos farmacológicos de tratamiento de trastornos oculares, especialmente los que afectan a la córnea y el cristalino. Existe particularmente la necesidad de métodos que prevengan el deterioro adicional de la vista del ojo, y que mejoren potencialmente la vista del paciente cuya vista ha empeorado.

Agua ácida de alto ORP

[0006] Se conoce que las soluciones acuosas de sales, particularmente cloruro sódico, como consecuencia de un tratamiento electrolítico, se dividen en dos productos líquidos, uno que tiene características básicas y reductoras (conocido generalmente como agua de cátodo o agua alcalina) y otro (generalmente conocido como agua de ánodo o agua ácida) que tiene características ácidas y oxidantes.

[0007] Las aguas electrolíticas convencionales padecen la desventaja reconocida de tener una conservación muy limitada. De hecho, unos pocos días después de la preparación, el producto tiende generalmente a degradarse y pierde sus propiedades. Por lo tanto, las aguas electrolíticas conocidas se deben preparar y usar básicamente en el acto. En consecuencia, la utilización comercial del producto en sí mismo es extremadamente desventajosa, dado que la vida en anaquel de cualquier envase listo para uso está drásticamente limitada.

[0008] Shimmura *et al.*, en "Acidic electrolysed water in the disinfection of the ocular surface" (Experimental Eye Research, enero de 2000, Vol. 70, N° 1, páginas 1-6) desvela un agua electrolítica ácida que tiene un pH de menos de 3, y un potencial de oxidación reducción mayor de 1100 mV, y su uso para la desinfección de una superficie ocular, o para la reducción de la erosión corneal, opacidad corneal, y queratitis por pseudomonas.

[0009] El resumen del documento de solicitud de patente Japonesa JP19970040444m de Nobel Igaku Kenkyusho desvela el uso de agua ácida electrolítica a un pH de 2,0-3,2 y un ORP de 800-1000 mV, como loción ocular para el tratamiento de infecciones oculares.

[0010] El documento de Patente US 2006/275502 A1 desvela agua electrolizada ácida para su uso como desinfectante para uso en higiene femenina.

[0011] La estabilidad del agua oxidante electrolizada se informa en el artículo "Effects of Storage Conditions and pH

on Chloride Loss in Electrolyzed Oxidizing (EO) Water" - Journal of Agricultural and Food Chemistry - 2002, 50, 209-212 de Soo-Voon Len, *et al.* En Soo-Voo Len, el agua electrolizada con pH ácido (2,5-2,6), alto ORP (1020-1120 mV), y un contenido de cloro libre de ~50 ppm (53-56 ppm) se generó usando una intensidad de corriente de 14 amperios y 7,4 V. Desafortunadamente, en condiciones de apertura a 25 °C, el cloro del agua electrolizada se

5 perdió completamente después de 30 horas cuando se agitó, y después de 100 horas cuando no se agitó. Además, en condiciones de oscuridad cerradas a 25 °C, el cloro libre del agua electrolizada disminuyó en aproximadamente un 40 % después de 1400 horas (aproximadamente 2 meses).

[0012] La estabilidad del agua oxidante electrolizada también se informa en el artículo "Effects of storage conditions on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water" - Journal of Food Engineering 65 (2004) 465-471 de Shun-Yao Hsu, *et al.* En Shun-Yao Hsu, el agua electrolizada de la "formulación J" tiene un pH ácido (2,61), alto ORP (1147 mV), y un contenido de cloro libre de 56 ppm. El artículo informa que en condiciones cerradas a 25-30 °C, el cloro libre en el agua electrolizada era 43 ppm después de 21 días, un 23 % de pérdida.

15 [0013] De ese modo, permanece la necesidad de agua electrolítica ácida con una mayor estabilidad química que las aguas tradicionales. Existe la necesidad particular de agua con una mayor estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo, de modo que permita la utilización comercial de productos de agua electrolítica ácida.

*: composición que comprende agua ácida como se define en las reivindicaciones para su uso en

20 Sumario de la invención

[0014] Se ha descubierto inesperadamente que el agua ácida, que tiene un alto potencial de oxidación reducción, estimula y facilita la regeneración ordenada del ojo cuando se ve afectado por estímulos ambientales negativos tales como infecciones o traumatismos, o procesos metabólicos tales como envejecimiento y diabetes. En particular, se ha

25 descubierto que el agua fomenta un epitelio sano en la córnea, reduce la neovascularización corneal descontrolada, y estimula la síntesis de proteínas ordenada en el cristalino. De ese modo, el agua se puede usar para tratar diversos trastornos oculares externos que afectan a la córnea, el cristalino o el iris, incluyendo cataratas, queratitis, neovascularización y deficiencia del epitelio.

30 [0015] Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agua ácida de alto ORP como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de un trastorno ocular externo seleccionado entre cataratas o neovascularización corneal en un paciente animal con necesidad del mismo, en la que el tratamiento comprende administración tópica de la composición a un ojo de dicho paciente.

35 [0016] La composición está preferentemente en la forma de una gota ocular.

[0017] La composición para su uso en el tratamiento se puede usar a voluntad en respuesta a irritación observable. Un tratamiento eficaz para estos trastornos requiere por lo general una pluralidad de administraciones, que se

40 extienden días, meses o incluso años de la vida del paciente. El agua se puede definir mediante diversas características que incluyen pH y ORP, además de otras características que incluyen el tamaño de agregado (como se mide mediante la anchura línea media de RMN), y el contenido de diversas especies de cloro/cloruro.

[0018] También se ha descubierto inesperadamente que el agua ácida nanoagregada que tiene una composición

45 particular de especies de cloro tiene una mayor estabilidad química que las aguas tradicionales. La composición única puede resultar de membranas y electrodos particulares usados en el equipo de electrólisis, que pueden producir una alta intensidad de corriente sin hacer que los electrodos se deshagan en superficie y liberen metales pesados que pueden afectar adversamente la estabilidad.

50 [0019] Se expondrán realizaciones y ventajas adicionales de la invención en parte en la descripción que sigue a continuación, y en parte serán obvias a partir de la descripción, o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Las realizaciones y ventajas de la invención se podrán realizar y conseguir por medio de los elementos y combinaciones indicados particularmente en las reivindicaciones anexas. Se ha de entender que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son únicamente a modo de ejemplo y explicación y no son

55 restrictivas de la invención, según se reivindica.

Breve descripción de las figuras

[0020] Las figuras acompañantes, que se incorporan a, y constituyen una parte de, la presente memoria descriptiva,

60 ilustran varias realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

La Figura 1 es una vista esquemática de un dispositivo electrolítico que comprende una cámara de electrólisis y dos electrodos.

65 La Figura 2 es una vista de sección transversal de un ojo humano, que representa los diversos componentes del

ojo.

La Figura 3 es un gráfico que ilustra la modulación de las citoquinas del sistema inmune mediante el Agua Nanoagregada Ácida.

La Figura 4 es un conjunto de gráficos que ilustran la concentración de las diversas especies de cloro en función del pH.

La Figura 5 es un gráfico que ilustra la pérdida de cloro libre en Agua Nanoagregada Ácida de alto y bajo contenido en cloro en condiciones de apertura, agitación, y exposición durante 24 horas.

Descripción detallada de la invención

[0021] La presente invención se puede entender con mayor facilidad por referencia a las siguientes definiciones y descripción detallada de realizaciones preferentes de la invención y a los Ejemplos no limitantes incluidos en la misma.

Definiciones y uso de términos

[0022] "Farmacéuticamente aceptable" significa que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y ni biológicamente ni de otro modo indeseable e incluye las que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano.

[0023] Como se usa en el presente documento, el término "fluido" se usa para referirse a cualquier fluido, solución o suspensión pura que es capaz de producir una reacción química no espontánea si se somete a electrólisis. Un fluido altamente preferente es agua. El término "agua" se usa para referirse a cualquier tipo de agua, tal como agua corriente, agua filtrada, agua desionizada, y agua destilada. Una vez sometida a electrólisis, el agua se separa en dos fracciones líquidas a las que, en aras de la simplicidad, se denomina en el presente documento agua ácida o agua de ánodo y agua de cátodo o agua alcalina.

[0024] La expresión "agua de alto ORP" se refiere a agua que tiene un potencial de oxidación reducción mayor de +600. El ORP varía preferentemente de +600 a +1350 mV, más preferentemente de +800, +900, o +1000 mV a +1300 mV, lo más preferentemente de +1100 a +1250 mV.

[0025] La expresión "agua de ácido" o "agua ácida" se refiere a agua que tiene un pH menor de 7,0. El pH del agua de ácido varía preferentemente de 0,5, 1,0 o 2,0 a 6,5, 6,0, 5,0, 4,0, o 3,0, y lo más preferentemente varía de 1,0 a 4,0.

[0026] La expresión "agua electrolítica", cuando se usa en el presente documento, significa agua producida mediante el proceso de electrólisis, y se caracteriza preferentemente por un potencial de oxidorreducción (ORP) y/o un pH que refleja su naturaleza ácida o alcalina.

[0027] La expresión "agua nanoagregada", cuando se usa en el presente documento, se refiere a agua que tiene un tamaño de agregado reducido, por lo general inducido mediante electrólisis. El tamaño del agregado se puede medir mediante su anchura línea media de RMN, y en realizaciones preferentes el agua tiene una anchura de línea media de RMN usando ^{17}O de menos de aproximadamente 60, 56, o 52 Hz, preferentemente mayor de aproximadamente 42 o 45 Hz.

[0028] Como se usa en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para producir la respuesta biológica deseada. La cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede depender de la edad, sexo y peso del paciente, y las condiciones médicas actuales del paciente. El experto en la materia será capaz de determinar las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores además de la presente divulgación.

[0029] Los términos "tratar" y "tratamiento", cuando se usan en el presente documento, se refieren a la gestión médica de un paciente con la intervención de curar, mejorar, estabilizar, o prevenir una enfermedad, patología, o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente hacia la mejora de una enfermedad, patología, o trastorno, y también incluye el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido hacia la retirada de la causa de la enfermedad, patología, o trastorno asociados. Además, estos términos incluyen tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas en lugar de la cura de la enfermedad, patología, o trastorno; tratamiento preventivo, es decir, el tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, patología, o trastorno asociados; y tratamiento de apoyo, es decir, el tratamiento empleado para apoyar otra terapia específica dirigida hacia la mejora de la enfermedad, patología, o trastorno asociados.

[0030] Cuando el contexto lo permite, el término "significativamente" se puede interpretar que significa un nivel de significación estadística, además de "básicamente". En nivel de significación estadística puede ser, por ejemplo, de al menos $p < 0,05$, de al menos $p < 0,01$, de al menos $p < 0,005$, o de al menos $p < 0,001$. Cuando en el presente

documento se expresa o identifica un resultado o efecto medible, se ha de entender que el resultado o efecto se puede evaluar basándose en su significación estadística con respecto a una línea base.

[0031] La expresión "trastorno ocular exterior", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier trastorno de la córnea, iris o cristalino, que está asociado con un crecimiento o estructuración irregular de los componentes proteicos o celulares. Algunos ejemplos de trastornos oculares externos incluyen queratitis, neovascularización, deficiencia del epitelio y cataratas. La queratitis puede ser superficial, ulcerosa (es decir, úlcera corneal), hipopion (es decir, úlcera con hipopion), micótica (causada por hongos), o profunda (que perfora todas las capas de la córnea). Además, la queratitis puede ser el resultado de bacterias, déficit de vitamina A, virus, traumatismos (habitualmente después de la inserción de un objeto en el ojo), abrasión, cirugía, hongos, o parásitos. La neovascularización puede ser localizada, profunda, o resultante de la acumulación de tejidos (pannus). Además, la neovascularización puede ser el resultado de, o está asociada a, falta de oxígeno en el ojo, traumatismo, abrasión, cirugía, degeneración macular relacionada con la edad, inflamación y miopía.

[0032] El término "catarata", como se usa en el presente documento, se refiere a una diversidad de afecciones que crean un cristalino opaco o calcificado que obstruye la visión. La catarata puede ser una catarata infantil, juvenil o presenil. Alternativamente, la catarata puede ser una catarata relacionada con la edad o senil. Además, la catarata puede ser una catarata traumática o una catarata congénita. La catarata se puede localizar en una diversidad de regiones del cristalino. Por ejemplo, la catarata puede ser una catarata polar subcapsular anterior (en la superficie central frontal del cristalino), una catarata polar subcapsular posterior (en la superficie central trasera del cristalino), una catarata cortical (que irradia desde el centro hasta los bordes del cristalino), una catarata nuclear (en el centro del cristalino), o una combinación de las mismas. La catarata puede estar asociada a otros trastornos, tales como catarata diabética y catarata tóxica. Además, la catarata puede estar en una diversidad de estadios tales como catarata inmadura (cristalino parcialmente opaca), catarata madura (cristalino completamente opaco), o catarata hipermadura (materia cortical licuada, también conocida como catarata de Morgagnian).

[0033] En la descripción y las reivindicaciones de la presente memoria descriptiva, la palabra "comprende" y las variaciones de la palabra, tales como "comprender" y "que comprende", significan "que incluye pero no se limita a", y no pretenden excluir, por ejemplo, otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

[0034] Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones anexas, las formas en singular "un", "uno", "una", "el" y "la" o los términos similares incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. De ese modo, por ejemplo, la referencia a "un ingrediente" incluye mezclas de dos o más ingredientes, y similares. La palabra "o" o los términos similares, como se usa en el presente documento, significa un miembro cualquiera de una lista particular y también incluye cualquier combinación de los miembros de esa lista.

Discusión

[0035] Como se ha discutido anteriormente, los presentes inventores han descubierto que el agua electrolizada ácida se puede usar para tratar de forma eficaz pacientes que padecen trastornos oculares externos. Este descubrimiento se basan los resultados de la experimentación descrita en los "Ejemplos" posteriores, que revela que una composición de agua nanoagregada ácida, a diferencia de la solución salina, afecta a la curación del ojo de una forma que puede ser muy útil en el fomento de la correcta estructura y organización proteica y celular, y en la reducción de la opacidad de la córnea y el cristalino. También se ha descubierto que el agua electrolizada ácida de una composición química particular puede permanecer estable durante períodos de tiempo considerablemente más prolongados que las aguas oxidantes electrolizadas previas.

[0036] Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agua ácida de alto ORP como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de un trastorno ocular externo seleccionado entre catarata y neovascularización corneal en un paciente animal con necesidad del mismo, en la que el tratamiento comprende la administración tópica de la composición al ojo de dicho paciente. La composición está preferentemente en forma de gotas oculares.

[0037] De forma importante, el tratamiento puede disminuir la opacidad del cristalino, reducir la pérdida de visión, aumentar la agudeza visual, aumentar la sensibilidad de contraste, y reducir los halos.

[0038] La etapa de administración de la composición se puede llevar a cabo entre 1 y 20 veces por día usando cualquier método conocido en la técnica, pero se realiza preferentemente más de una vez durante un periodo de 24 horas. La administración se puede llevar a cabo durante un periodo de tiempo que incluye una semana, 10 días, dos semanas, tres semanas, un mes, o continuamente como terapia de mantenimiento. En una realización particular, la etapa de administración comprende echar gota a gota la composición directamente en el ojo. En otra realización, la etapa de administración comprende aplicar la composición al ojo con una gasa. En otra realización más, la etapa de administración comprende aplicar la composición al ojo con un lavado ocular.

[0039] El tratamiento puede comprender además, antes de la etapa de administración, diagnosticar que dicho ojo

tiene una catarata u otro trastorno ocular externo.

[0040] La etapa de administración de la composición se puede llevar a cabo entre 1 y 4 veces por día usando cualquier método conocido en la técnica. La administración se puede llevar a cabo durante un periodo de tiempo que incluye una semana, 10 días, dos semanas, tres semanas, un mes, o continuamente como terapia de mantenimiento. En una realización particular, la etapa de administración comprende echar gota a gota la composición directamente en el ojo. En otra realización, la etapa de administración comprende aplicar la composición al ojo con una gasa. En otra realización más, la etapa de administración comprende aplicar la composición al ojo con un lavado ocular.

[0041] El tratamiento puede comprender además, antes de la etapa de administración, llevar a cabo cirugía en dicho ojo.

Aguas ácidas

[0042] El agua ácida se puede obtener mediante el método de electrólisis del agua que se describe posteriormente. Las aguas ácidas electrolíticas pueden diferir de los productos similares básicamente en su estabilidad, que se debe al menos parcialmente al mayor rendimiento de los electrodos nanorrevestidos y al proceso de electrólisis. En los procesos convencionales, incluso cuando el agua se somete a una etapa de filtración antes de la electrólisis, los electrodos tienden a deshacerse en su superficie durante el proceso, liberando grandes cantidades de metales pesados (particularmente el metal o metales de los que están hechos el cátodo y el ánodo). Sin embargo, estas aguas ácidas pueden estar exentas de metales pesados debido a que dichos metales, si estuvieran presentes, están presentes en una cantidad que es inferior a los límites que se pueden detectar mediante los métodos analíticos convencionales. Por ejemplo, el agua de acuerdo con la invención puede tener una concentración de cadmio de menos de 5 mg/l, menos de 10 mg/l de cromo, menos de 5 mg/l de plomo, y menos de 20 mg/l de níquel. Los métodos de ensayo adecuados para estos metales pesados se describen en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1: métodos de ensayo de metales pesados

ENSAYO	MÉTODO DE ENSAYO
Cadmio	APAT CNR IRSA 3120/2003
Cromo total	APAT CNR IRSA 3150/2003
Plomo	APAT CNR IRSA 3230/2003
Níquel	APAT CNR IRSA 3220/2003
Residuo fijo a 180 °C	APAT CNR IRSA 2090A/2003

[0043] Aunque no se pretende quedar unido a ninguna teoría en particular, se cree que la ausencia de metales pesados es una de las razones principales para la estabilidad a lo largo del tiempo inusual y ventajosa del agua ácida electrolítica. La expresión "estabilidad a lo largo del tiempo" se usa para indicar que el agua ácida, si se mantuviera protegida de la luz, aire y calor, mantiene sus propiedades químicas y físicas, particularmente su pH, ORP y/o anchura de línea media de RMN, básicamente sin cambios durante más de 60 o 90 días, preferentemente más de 180 días, incluso más preferentemente más de 365 días, hasta dos, tres o incluso cinco años. Por básicamente sin cambios se pretende indicar que la propiedad a evaluación no varía en más de un 50, 30, 15, 10, 5, o incluso un 3 % durante el marco de tiempo aplicable.

[0044] Aunque el tiempo de estabilidad depende de las etapas tomadas para conservar la solución, se debe indicar que para condiciones de almacenamiento iguales, un agua ácida obtenida mediante el uso de un dispositivo electrolítico como se ha definido anteriormente ha mostrado una estabilidad claramente superior a los productos similares conocidos, que en el mejor de los casos han mostrado una vida de anaquel de solo 60-90 días. Por lo tanto, estos productos se deben obtener y usar durante un corto periodo de tiempo o incluso simultáneamente a su producción. Por lo tanto, el agua ácida electrolítica de acuerdo con la invención puede ser útil para aplicaciones en ubicaciones (países del Tercer Mundo) y situaciones (escasez de agua para proporcionar electrólisis) en las que las condiciones favorables para su producción no se encuentran disponibles.

[0045] El ORP del agua ácida electrolítica varía preferentemente de +1100 mV a +1300, lo más preferentemente de +1100 a +1250 mV. El pH del agua ácida varía preferentemente de 0,5 o 1,0 a 6,5, 6,0, 5,0, 4,0, o 3,0, y lo más preferentemente varía de 1,0 a 4,0.

[0046] Las medidas de resonancia magnética nuclear RMN ^{17}O , particularmente cuando se evalúan en el punto a mitad de camino del pico del agua, son útiles para medir la calidad de las aguas ácidas de la presente invención, debido a que reflejan las propiedades intrínsecas de la estructura del agua tales como la mediana del tamaño de agregado molecular de las moléculas de H_2O , y la distribución de los tamaños de agregado molecular, además de

contaminantes tales como especies iónicas en el agua. La expresión "agregado molecular" indica el número de moléculas de agua que están coordinadas en una estructura ordenada.

5 **[0047]** En la mayoría de las realizaciones preferentes, la anchura de línea media de RMN ^{17}O para el agua ácida es mayor o igual que 42, 45, 46, o 47, y menor que 100, 75, 60, 56, 53, 51, 50 o 49 Hz, en la que el intervalo se puede seleccionar para cualquiera de los extremos anteriores. De ese modo, por ejemplo, en realizaciones preferentes, el agua ácida de la presente invención tiene una anchura de línea media de RMN que varía de 45 a menos de 51 Hz, o de 45 a menos de 50 Hz, o de 46 a menos de 50 Hz.

10 **[0048]** El agua ácida también se puede caracterizar por la presencia y la cantidad de especies de cloro en el agua. Se puede usar uno de los siguientes ensayos o cualquier combinación de los siguientes ensayos para caracterizar el agua. De acuerdo con el ensayo de cloro libre (método espectrofotométrico), o el ensayo de cloro total (método espectrofotométrico), el agua se puede definir por contener menos de 85, 70, 60, 55, 52 o incluso 50 mg/l de especies de cloro, opcionalmente limitada por un límite inferior de 20, 30 o 40 mg/l. De acuerdo con el ensayo de
15 cloro total (método yodométrico), el agua se puede definir por contener menos de 80, 70, 65, o incluso 62 mg/l de especies de cloro, opcionalmente limitada por un límite inferior de 20, 30 o 40 mg/l. De acuerdo con el ensayo de cloro de la norma UNI 24012 (método mercurimétrico), el agua puede contener más de 50, 100, 130, 150 o incluso 170 mg/l de cloro, y/o menos de 250 o 200 mg/l. Los cloritos (como ClO_2^-), cuando se miden mediante EPA 300.1 (1997) (límite de detección de 100 ug/l), son preferentemente no detectables. Los cloratos (ClO_3^-), cuando se miden
20 mediante EPA 300.1 (1997) (límite de detección de 0,1 mg/l), están presentes preferentemente en una cantidad menor de 10, 5, 2, o incluso 1 mg/l.

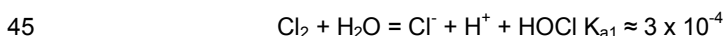
[0049] Aunque en ciertas realizaciones el agua ácida puede contener especies de cloro oxidantes en cantidades de hasta 60 o incluso 100 mg/l, en una realización preferente el agua ácida de acuerdo con la invención está
25 básicamente exenta de especies de cloro oxidantes, u otros residuos aniónicos de sales que se generan durante el proceso de electrólisis, es decir, menos de 10 o incluso 5 mg/l, y preferentemente indetectables.

[0050] En una realización particularmente deseable, el agua se puede caracterizar mediante la conductividad, la presencia de cloro gaseoso disuelto (Cl_2), ácido hipocloroso (HOCl) e iones cloruro (Cl^-), y mediante la presencia de
30 cantidades despreciables de ion hipoclorito (OCl^-). En el agua, las cantidades relativas de cloro y ácido hipocloroso se ven fuertemente afectadas por la cantidad de cloruros. Específicamente, un aumento en los cloruros da como resultado un aumento en la cantidad de cloro gaseoso con respecto al ácido hipocloroso según el siguiente equilibrio:



[0051] Debido a la relación entre la cantidad de cloruros y las cantidades de cloro gaseoso y ácido hipocloroso, la cantidad de cloruros en el agua es preferentemente muy baja (menos de 200 ppm) para asegurar que el cloro libre en el agua está casi exclusivamente en la forma de ácido hipocloroso.

40 **[0052]** La relación entre las cuatro especies Cl_2 , HOCl , Cl^- , y OCl^- se puede entender usando los equilibrios de disociación del cloro gaseoso en agua que se describen a continuación, en los que Cl_2 , HOCl , y OCl^- son las tres formas posibles del cloro total libre:



[0053] Como se puede observar en las ecuaciones anteriores, se produce generación de cloro en presencia de un exceso de Cl^- . Además, la cantidad de las tres formas de cloro total libre es una función del pH y se puede determinar algebraicamente Cl^- mediante el uso de los equilibrios descritos anteriormente como sigue a continuación:

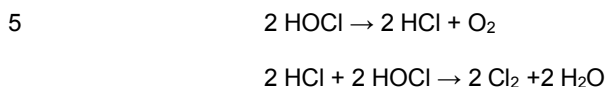
55
$$\alpha \text{Cl}_2 = [\text{H}^+]^2 [\text{Cl}^-] / ([\text{H}^+]^2 [\text{Cl}^-] + [\text{H}^+] K_{a1} + K_{a1} K_{a2})$$

$$\alpha \text{HClO} = [\text{H}^+] K_{a1} / ([\text{H}^+]^2 [\text{Cl}^-] + [\text{H}^+] K_{a1} + K_{a1} K_{a2})$$

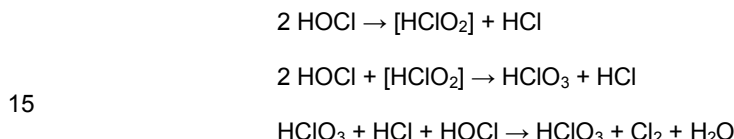
$$\alpha \text{ClO}^- = K_{a1} K_{a2} / ([\text{H}^+]^2 [\text{Cl}^-] + [\text{H}^+] K_{a1} + K_{a1} K_{a2})$$

60 **[0054]** Estas ecuaciones se pueden usar para simular la concentración de cloro a diferentes valores de pH. Por ejemplo, la Figura 3 es una simulación gráfica de la concentración de diversas especies de cloro en función del pH. Como se puede observar en la Figura 3, para un pH habitual del agua de 2,8-3,0 (indicado por la línea de puntos y guiones de color verde), el cloro libre está presente principalmente en forma de Cl_2 y HClO , y la cantidad relativa de las dos especies se ve fuertemente afectada por la cantidad de cloruros, y el aumento de estos da como resultado
65 un aumento de la cantidad de cloro gaseoso con respecto al HClO .

[0055] Se reconoce generalmente que las soluciones diluidas de ácido hipocloroso son inestables debido a la descomposición. Esta descomposición se puede producir de acuerdo con una primera ruta:



[0056] O de acuerdo con una segunda ruta, en la que el ácido cloroso (HClO_2) es un compuesto intermedio en la formación de ácido clórico (HClO_3):



[0057] Los estudios cinéticos han indicado que ambas rutas de descomposición dependen del pH y aumentan con la concentración, temperatura, y exposición a luz. Además, el primer proceso se puede acelerar mediante catálisis, y el segundo proceso se puede acelerar en presencia de otros electrolitos, en particular iones cloruro. Debido a la descomposición, las soluciones de hipoclorito pueden ser más estables que las soluciones de ácido hipocloroso. Por esta razón, las soluciones comerciales a menudo tienen un pH neutro o alcalino, lo que hace que el cloro libre exista como hipoclorito y no como ácido hipocloroso.

[0058] Aunque no se pretende quedar unidos a ninguna teoría en particular, se cree que el bajo contenido de ion cloruro es una de las razones principales para la estabilidad inusual y ventajosa a lo largo del tiempo del agua ácida electrolítica, tanto por evaporación como por autodescomposición. Preferentemente, la cantidad de cloruros tanto al principio como al final del proceso electrolítico es baja (200 ppm o inferior), de modo que el agua comprende cloro en la forma de HClO . Por ejemplo, en una realización particular, el agua puede comprender ~50 ppm de cloro libre, y ~200 ppm de iones cloruro. A pH 2,80, esto corresponde a un 99,3 % de HClO , y un 0,7 % de cloro gaseoso disuelto.

[0059] La conductividad del agua varía preferentemente de 900 a 1800 $\mu\text{S}/\text{cm}$, y más preferentemente varía de 1000, 1100, 1200, o 1300 a 1400, 1500, 1600, o 1700 $\mu\text{S}/\text{cm}$. El contenido de cloro libre del agua varía preferentemente de 20 a 80 ppm, más preferentemente varía de 30 o 40 a 60 o 70 ppm, y lo más preferentemente es aproximadamente 50 ppm. El contenido de ion cloruro del agua varía preferentemente de 150 a 250 ppm, más preferentemente varía de 160, 170, 180 o 190 a 210, 220, 230, o 240 ppm, y lo más preferentemente es aproximadamente 200 ppm. El contenido de clorito del agua varía preferentemente de 50 a 150 ppb, más preferentemente varía de 60, 70, 80 o 90 a 110, 120, 130, o 140 ppb, y lo más preferentemente es aproximadamente 100 ppb. El contenido de clorato del agua varía preferentemente de 0,5 a 1,5 ppm, más preferentemente varía de 0,6, 0,7, 0,8, o 0,9 a 1,1, 1,2, 1,3, o 1,4 ppb, y lo más preferentemente es aproximadamente 1 ppm.

[0060] Debido a su composición química y acidez, el cloro libre en el agua puede estar presente en la forma de ácido hipocloroso (HOCl) y cloro gaseoso (Cl_2). La cantidad relativa de HOCl y Cl_2 en el agua varía preferentemente de un 99,9 % de HOCl y un 0,1 % de Cl_2 a un 95 % de HOCl y un 5 % de Cl_2 , más preferentemente varía de un 99,5 % de HOCl y un 0,5 % de Cl_2 a un 98,5 % de HOCl y un 1,5 % de Cl_2 , y lo más preferentemente es aproximadamente un 99,3 % de HOCl y un 0,7 % de Cl_2 .

[0061] Debido a que el cloro libre en el agua está presente en la forma de HOCl y Cl_2 en los intervalos descritos anteriormente, el agua puede ser altamente estable tanto frente a la evaporación como frente a la autodescomposición. En un estado expuesto no agitado a una temperatura de 25 °C, el agua mantiene preferentemente el nivel de cloro durante un tiempo de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 días. En un estado expuesto agitado a una temperatura de 25 °C, el agua mantiene preferentemente el nivel de cloro durante un tiempo de 8, 12, 16, 20, o 24 horas. En un estado cerrado a una temperatura de 25 °C, el agua mantiene preferentemente aproximadamente un 90 % de cloro libre después de un tiempo de 3 meses, y aproximadamente un 85 % del cloro libre después de un tiempo de 12 meses. En estado cerrado a una temperatura de 30 °C, el agua mantiene preferentemente aproximadamente un 90 % del cloro libre después de un tiempo de 3 meses, y aproximadamente un 80 % del cloro libre después de un tiempo de 12 meses. En estado cerrado a una temperatura de 40 °C, el agua mantiene preferentemente aproximadamente un 90 % del cloro libre después de un tiempo de 3 meses, y aproximadamente un 85 % del cloro libre después de un tiempo de 12 meses.

Preparación del agua ácida electrolítica

[0062] El agua ácida electrolítica se puede preparar, por ejemplo, mediante el uso de los métodos y dispositivos de electrólisis que se describen en los documentos de Publicación PCT WO 2008/131936 y WO 2007/048772.

[0063] Ahora por referencia a la Figura 1, el dispositivo de electrólisis puede comprender una cámara de electrólisis 3 dividida en dos partes mediante una membrana 4, y un par de electrodos 1 y 2 dentro de dicha cámara.

- 5 **[0064]** Preferentemente, los dos electrodos del dispositivo son electrodos nanorrevestidos como se define posteriormente. Sin embargo, las ventajas en términos de bajo coste y eficacia del proceso de electrólisis, así como las ventajas en términos de estabilidad del agua a lo largo del tiempo, también se pueden obtener si solo uno de los dos electrodos está nanorrevestido como se define posteriormente.
- 10 **[0065]** Preferentemente, el dispositivo también comprende una membrana 4 adaptada para dividir la al menos una cámara en dos semicámaras, en el que la semicámara que contiene el ánodo se denomina semicámara del ánodo, y la semicámara que contiene el cátodo se denomina semicámara del cátodo. La membrana es ventajosamente una membrana de ultrafiltración que puede ocupar la cámara parcial o totalmente.
- 15 **[0066]** La membrana 4 puede ser del tipo usado en celdas electrolíticas convencionales, pero se basa preferentemente en tecnología de exclusión por tamaño a nanoescala. Preferentemente, la membrana está compuesta por material cerámico con porosidad abierta, revestida con nanopartículas metálicas, preferentemente nanopartículas de óxidos de circonio, itrio, aluminio o las mezclas de los mismos. Las nanopartículas metálicas usadas para preparar el revestimiento están preferentemente en forma de polvo. Con respecto a la distribución de
- 20 tamaño en el polvo, preferentemente una cantidad al menos igual a un 70 %, 75 %, o un 80 % en peso de las partículas que están presentes en el polvo, más preferentemente al menos igual a un 85 %, tiene un diámetro de partícula que varía de 30 a 100 nm, de 40 a 70 nm, o de 50 a 60 nm.
- [0067]** Al recurrir a partículas nanométricas para fabricar la membrana 4, se ha descubierto que el tamaño medio de
- 25 poro de la membrana final es extremadamente constante a lo largo del tiempo y adaptable de acuerdo a los requisitos de la forma en la que se va a procesar el agua. Preferentemente, el tamaño medio de poro es de aproximadamente 120 a aproximadamente 180 nm (promedio o mediana). La constancia del tamaño a lo largo del tiempo y la constancia de las propias dimensiones del poro son dos aspectos que diferencian la membrana cerámica que se describe aquí de las membranas textiles usadas convencionalmente en dispositivos equivalentes (que en
- 30 cambio están sujetas a un rápido deterioro a lo largo del tiempo). Es preferente que al menos un 50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 98 % o un 99 % de los poros tengan un diámetro entre 120 y 180 nm. Estos aspectos han mostrado un efecto positivo en la estabilidad del agua obtenida después de la electrólisis, donde este efecto se combina con, y aumenta, el efecto estabilizante producido por el uso de un electrodo como se ha definido anteriormente.
- 35 **[0068]** De forma importante, las características dimensionales de tamaño nanométrico de la membrana y los electrodos mejoran la cantidad de superficie activa por unidad de superficie geométrica, que crea una alta densidad de corriente aparente (es decir, la intensidad de corriente por unidad de superficie geométrica). Como resultado, se puede proporcionar una alta intensidad de corriente (amperios) y potencial eléctrico (tensión) a la solución, lo que imparte características químicas y biológicas únicas al agua. Preferentemente, el agua se produce al aplicar una
- 40 intensidad de corriente en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 39 amperios (24 a 18 voltios) a una solución diluida de cloruro sódico en agua desionizada. Al aplicar la alta intensidad de corriente, se puede conseguir una composición química con un bajo contenido de ion cloruro, bajo contenido de clorito y clorato, y alto contenido de ácido hipocloroso.
- 45 **[0069]** La cantidad de corriente aplicada al agua varía preferentemente de 30 a 120 amperios, más preferentemente varía de 40, 50 o 60 amperios a 90, 100, o 110 amperios, y lo más preferentemente es aproximadamente 80 amperios. La cantidad de tensión aplicada al agua varía preferentemente de 15 a 35 voltios, más preferentemente varía de 16, 17, o 18 voltios a 22, 23, o 24 voltios, y lo más preferentemente es aproximadamente 20 voltios.
- 50 **[0070]** En un dispositivo de electrólisis preferente, cada semicámara está conectada al exterior del dispositivo a través de:
- los orificios 7 y 8 dispuestos en la parte superior de la semicámara desde los cuales se introduce el agua que se somete a electrólisis, y
 - 55 - los orificios adicionales 5 y 6 dispuestos en la parte inferior de la semicámara que pueden actuar como descarga para las fracciones ácida y alcalina resultantes (denominadas "agua ácida" y "agua alcalescente" en la Figura 1). El segundo orificio de la parte inferior de cada semicámara se proporciona con medios de cierre (no se muestran) que se adaptan para evitar que el agua que aún no se ha separado abandone la semicámara y se adaptan para abrirse al final del proceso electrolítico.
- 60 **[0071]** Por referencia a la Figura 1, el mecanismo de operación del dispositivo que se ha descrito anteriormente proporcionado con todos los elementos esenciales y opcionales que se han enumerado implica por lo tanto el tratamiento del agua por introducción de la misma desde la parte superior, por medio de los conductos de entrada de agua, en las dos semicámaras de la cámara principal. Aquí, el agua, bajo la acción del cátodo y el ánodo conectados
- 65 previamente a los polos negativo y positivo de una fuente de tensión eléctrica, se divide en iones positivos y

negativos que, como se conoce, son atraídos por los respectivos polos opuestos. En el paso de una semicámara a la otra, la membrana nanoporosa actúa como un filtro para dichos iones y para cualquier partícula cargada, permitiendo solo el paso de las partículas de un tamaño lo suficientemente pequeño.

- 5 **[0072]** La entrada de agua a la unidad se puede caracterizar por su conductividad, medida preferentemente en $\mu\text{S/cm}$. De ese modo, por ejemplo, el agua se puede describir por la consistencia de la conductividad en la entrada de agua. Por ejemplo, la conductividad variaría en no más de 50, 20, 10, 5 o incluso $2 \mu\text{S/cm}$, o un 100, 50, 20 o 10 %. El agua también se puede describir por la conductividad de la propia agua. La conductividad puede variar de 0,5, 1,0 o $1,5 \mu\text{S/cm}$ a 50, 25, 10, 5 o incluso $3 \mu\text{S/cm}$, basándose en cualquier selección de extremos. La
- 10 conductividad varía preferentemente de 0,5 a 10 o de $0,5$ a $3 \mu\text{S/cm}$, y lo más preferentemente la conductividad es aproximadamente $2 \mu\text{S/cm}$. Se ha descubierto que controlando la consistencia de la conductividad, y por disminución de la conductividad a los valores preferentes, se puede obtener un agua electrolizada de una calidad mucho más consistente, con la reducción consecuente en la anchura línea media de RMN. Los tipos de agua adecuados para introducirse en la unidad incluyen agua de ósmosis inversa, agua desionizada, y agua destilada. Un
- 15 tipo de agua preferente debido a su conductividad constante es agua osmótica preparada mediante ósmosis inversa.

- [0073]** El agua contiene preferentemente cloruro sódico, o alguna otra sal del metal alcalino, para facilitar la electrólisis. El cloruro sódico es preferentemente de calidad farmacéutica. La cantidad de cloruro sódico contenida en el agua es tal que el agua obtiene un nivel específico de conductividad. La conductividad de la solución de
- 20 entrada varía preferentemente de $50 \mu\text{S/cm}$ a $100 \mu\text{S/cm}$, más preferentemente varía de $150 \mu\text{S/cm}$ a $200 \mu\text{S/cm}$, y lo más preferentemente es aproximadamente $200 \mu\text{S/cm}$.

- [0074]** También de importancia, el filtro evita la transmisión de metales pesados de una cámara a la otra. De ese modo, al introducir el agua en la cámara ácida o alcalina, se puede producir agua alcalina o ácida que no tiene
- 25 prácticamente ninguna contaminación de radicales metálicos (o al menos más allá de los límites de detección).

[0075] Un método de uso de tal unidad para preparar agua ácida electrolítica que tiene una anchura de línea media de RMN usando RMN ^{17}O de aproximadamente 45 a menos de 51 Hz comprende:

- 30 (a) proporcionar una unidad de electrólisis que comprende: (i) una cámara catódica, una cámara anódica, y un filtro que separa dichas cámaras (caracterizado preferentemente por una porosidad que permite que pasen las fracciones ionizadas de H_2O nanoagregada, tal como cuando la porosidad se caracteriza predominantemente por poros de aproximadamente 120 a aproximadamente 180 nm de diámetro (que tienen preferentemente un diámetro medio entre 120 y 180 nm)); y (ii) un cátodo situado en dicha cámara catódica y un ánodo situado en
- 35 dicha cámara anódica, en la que al menos uno de dichos ánodo y cátodo está revestido con un residuo de partículas en el que más de un 70 % en peso de dichas partículas tiene un diámetro de 40 a 100 nm;
- (b) introducir una solución de agua y un metal alcalino en una o ambas de dichas cámaras; y
- (c) aplicar un potencial eléctrico a dicho ánodo y dicho cátodo, durante un tiempo y en una extensión suficiente para producir agua ácida electrolizada que tiene un ancho de línea media de RMN usando ^{17}O de
- 40 aproximadamente 45 a menos de 51 Hz.

Construcción de un electrodo

- [0076]** De nuevo por referencia a la Figura 1, el dispositivo de electrólisis incluye los electrodos 1 y 2 que
- 45 comprenden un revestimiento superficial que comprende nanopartículas de uno o más metales. Preferentemente, los electrodos comprenden un núcleo está hecho de un material metálico, un material no metálico o las combinaciones de los mismos.

- [0077]** Si el núcleo está hecho de un material metálico, puede estar hecho, por ejemplo, de una aleación de titanio y platino o una aleación de acero y grafito. Si el núcleo está hecho de un material no metálico, puede estar hecho, por ejemplo, de grafito. El núcleo también puede comprender diferentes capas, tales como, por ejemplo, un núcleo hecho de grafito que está revestido con una capa externa de metal, por ejemplo titanio. El término "metal" se refiere tanto a un metal como a composiciones químicas que comprenden dicho metal, tales como sus óxidos. Un núcleo preferente está hecho de TiO_2 .
- 55

[0078] El electrodo se puede caracterizar con respecto a electrodos conocidos básicamente debido a la presencia de una cubierta nanométrica (también denominada en lo sucesivo en el presente documento revestimiento) que es extremadamente lisa, es decir, una capa para cubrir el núcleo que incluye nanopartículas metálicas.

- [0079]** Los metales de los que se pueden hacer las nanopartículas del revestimiento se seleccionan preferentemente entre uno o más de titanio, iridio, itrio, rutenio, cinc, circonio, platino, selenio, tantalio y los compuestos de los mismos. Algunos compuestos metálicos preferentes son óxidos de los metales mencionados. Un revestimiento preferente comprende ZrO_2 , ZnO , Ru_2O_3 , IrO_2 e Y_2O_3 , o TiO_2 , Pt/ZrO_2 , SnO_2 , Ta_2O_5 , e IrO_2 . Preferentemente, los diversos metales se usan en forma de polvo.
- 60

65

[0080] El revestimiento también puede comprender un material de vehículo no metálico, por ejemplo partículas de uno o más polímeros. El polímero puede ser sintético (tal como, por ejemplo, plásticos, polímeros acrílicos, etc.) o parcialmente sintético (tal como, por ejemplo, celulosas modificadas, almidones modificados, etc.). Las nanopartículas metálicas comprendidas en el revestimiento se usan preferentemente en forma de polvo. Con respecto a la distribución de tamaño en el polvo, preferentemente una cantidad al menos igual a un 70 %, 75 %, o un 80 % en peso de las partículas que están presentes en el polvo, más preferentemente al menos igual a un 85 %, tiene un diámetro de partícula que varía de 40 a 100 nm, de 50 a 90 nm, o de 60 a 80 nm.

[0081] El revestimiento del electrodo se puede proporcionar por medio de técnicas de nanotecnología que son conocidas por los expertos en la materia y se adaptan para producir una superficie lisa, por ejemplo mediante sinterización del polvo o las mezclas de nanopulvos metálicos.

[0082] Los metales individuales en forma de polvo se pueden aplicar al electrodo de modo que se produzca el revestimiento: 1) en forma de una mezcla preformada, y/o 2) en forma de capas discretas que se aplican secuencial y mutuamente superpuestas y en las que cada capa consiste en un metal individual, y/o 3) en forma de capas discretas que se aplican secuencial y mutuamente superpuestas y en las que cada capa consiste en dos o más metales pero no simultáneamente de todos los metales que están presentes en el revestimiento.

[0083] Preferentemente, el método comprende la etapa (A) de preparar el revestimiento del electrodo por sinterización de polvos de nanopartículas de uno o más metales como se han definido anteriormente directamente sobre el núcleo del electrodo. Preferentemente, la etapa (A) comprende que se lleven a cabo las siguientes etapas en el orden en el que se enumeran aquí:

(A1) preparar uno o más polvos de nanopartículas metálicas como se han definido anteriormente,
 (A2) disolver los uno o más polvos de nanopartículas en un disolvente adecuado y en al menos una cantidad tal que se pueda disolver todo el polvo que se va a aplicar, obteniendo una o más soluciones, y
 (A3) sinterizar las una o más soluciones obtenidas en la etapa precedente sobre una placa metálica, preferentemente pasivada en su superficie, lo que formará el núcleo del electrodo.

[0084] Preferentemente:

- los uno o más polvos de nanopartículas metálicas de la etapa (A1) es una combinación de polvos de ZrO_2 , ZnO , Ru_2O_3 , IrO_2 e Y_2O_3 , o TiO_2 , Pt/ZrO_2 , SnO_2 , Ta_2O_5 , e IrO_2 , obtenida ventajosamente mediante procesamiento químico hidrotérmico, y al menos un 70 %, 75 %, o un 80 % y más preferentemente al menos un 85 % en peso de las partículas en el polvo tienen un diámetro que varía de 60 a 80 nm;
- el disolvente de la etapa (A2) en el que se disuelve cada polvo es preferentemente una solución al 30 % en peso de ácido clorhídrico en agua, en al menos una cantidad tal que se puede disolver todo el polvo que se va a aplicar,
- la etapa (A3) consiste en sinterizar las soluciones acuosas de ácido clorhídrico obtenidas en la etapa (A2) en ambas superficies de una placa de TiO_2 que está pasivada en su superficie y tiene un grosor que varía de 0,15 a 0,35 mm, en la que la sinterización se puede producir de acuerdo con las etapas enumeradas a continuación en la Tabla 2:

Tabla 2: etapas de sinterización

Etapa	Solución	Dosificación por unidad de superficie	Tiempo de sinterización (min)	Temperatura de sinterización (°C)
1	IrO_2	0,2 g/m ²	45	450
2	Ru_2O_3	0,2 g/m ²	45	450
3	$\text{ZnO} + \text{Y}_2\text{O}_3$ (Y a 2 mol)	0,15 g/m	60	550
4	IrO_2	0,25 g/m ²	45	450
5	Ru_2O_3	0,25 g/m ²	60	550
6	$\text{ZrO}_2 + \text{Y}_2\text{O}_3$ (Y a 3 mol)	0,1 g/m ²	60	550
7	Ru_2O_3	0,15 g/m ²	60	550
8	IrO_2	0,15 g/m ²	60	550
9	$\text{IrO}_2 + \text{Ru}_2\text{O}_3$	0,15 g/m ² + 0,15 g/m ²	60	600
10	$\text{ZrO}_2 + \text{Y}_2\text{O}_3$ (Y a 3 mol)	0,1 g/m	60	600
11	$\text{IrO}_2 + \text{Ru}_2\text{O}_3$	0,15 g/m ² + 0,15 g/m ²	60	600

[0085] Se ha descubierto que recurrir a múltiples etapas de sinterización es particularmente útil con el fin de eliminar cualquier rugosidad de la superficie del electrodo y obtener una superficie extremadamente dura y lisa. Un electrodo como se ha definido anteriormente, usado como parte de un dispositivo para proporcionar la electrólisis de agua, produce las siguientes ventajas:

- electrólisis más eficaz, en la que se produce un menor consumo de sales tales como NaCl, usada convencionalmente para acelerar la electrólisis de fluidos de baja conductividad tales como agua; y descripción
- si los dos electrodos son electrodos de acuerdo con la descripción, la posibilidad de producir un cambio continuo de polaridad de los electrodos ("intercambio de polaridad"). El cambio repentino de polaridad permite que las partículas cargadas que están presentes en el fluido sometidas a la electrólisis circulen en ambas direcciones en lugar de solamente en una (forzadas por la carga de las partículas y por el signo intercambiable de los electrodos), evitando de ese modo la formación de masas productoras de depósitos a nivel de los electrodos y manteniendo de ese modo su superficie limpia y su eficacia al máximo nivel. Además, si se proporciona una membrana semipermeable en la celda electrolítica y divide las dos semicámaras anódica y catódica, el cambio de polaridad evita la obstrucción de los poros de dicha membrana, prolongando la vida del dispositivo;
- la presencia de un revestimiento nanométrico determina una acumulación de carga en el electrodo superior de más de un 100 % con respecto a los electrodos convencionales. Esto permite proporcionar una electrólisis cualitativa y cuantitativamente diferente a potenciales considerablemente mayores, con el efecto de, por ejemplo, reducir el tamaño de los agregados moleculares;
- la obtención de una consistencia, suavidad, lisura y densidad superficial muy elevadas, aspectos que evitan la solubilización del propio electrodo o la formación de sedimentos sobre su superficie, que se podrían producir a continuación en las fracciones de agua ácida y alcalina. Los mismos aspectos son también la base para la liberación básicamente nula de metales pesados y otros compuestos que constituyen la superficie y el núcleo del electrodo en las fracciones de agua ácida y alcalina. Como también se mencionará posteriormente en el presente documento, la ausencia de metales pesados en el agua conduce a una estabilidad extraordinaria de la misma a lo largo del tiempo, con conservación de características tales como ORP, pH y tamaño de agregado molecular. Esta estabilidad es desconocida para los productos equivalentes conocidos. Los mismos aspectos también son la base para el mínimo mantenimiento requerido por el electrodo, que se pueden cambiar con una frecuencia considerablemente menor que los electrodos conocidos, reduciendo costes y aumentando la facilidad de producción;
- la posibilidad de obtener efectos cuánticos (también conocidos en la bibliografía con el término "nanoefectos") por medio de las dimensiones nanométricas de las partículas del revestimiento. En resumen, cuando se alcanzan las dimensiones nanométricas, las propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas de la materia cambian radicalmente. Al reducir las dimensiones hasta que se alcanzan las dimensiones nanométricas habituales de los denominados agregados, debido al pequeño número de átomos que está presente en dicho agregado y a su reducido volumen, la discretización de los niveles de energía (cuantificación) se hace evidente en la estructura electrónica y depende del tamaño del agregado, conociéndose este fenómeno como "efecto de tamaño cuántico", y dependen del mismo características completamente nuevas, que contrastan con las que son habituales en los materiales a dimensiones ordinarias. En el presente caso, se ha obtenido el mejor rendimiento con polvos que tienen una distribución de tamaño centrada en un intervalo que varía de 60 a 80 nm como se ha indicado anteriormente. En su conjunto, los efectos descritos anteriormente producen la presencia simultánea de tres factores: estabilidad del agua resultante, facilidad de su producción (por ejemplo, gracias a los costes de mantenimiento inferiores y a la mayor durabilidad del dispositivo en su conjunto) y un aumento de su calidad (especialmente en términos de pureza y constancia de propiedades a lo largo del tiempo). En particular, el aumento en la calidad del agua se puede medir tanto en términos de uniformidad de las dimensiones de los agregados moleculares (mayor porcentaje de micromoléculas con respecto al número de agregados macromoleculares) como en términos de aumento de estabilidad a lo largo del tiempo de las propiedades dadas para el agua mediante la propia electrólisis (por encima de todo, pH, ORP y tamaño de agregado). El aumento de estabilidad consigue presumiblemente la conservación a lo largo del tiempo de las características superficiales estructurales de los electrodos revestidos con un nanorrevestimiento como se describe en el presente documento.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Objetivo

[0086] Determinar la eficacia de agua nanoagregada ácida (ANW) frente a varias cepas de bacterias, virus y hongos.

Actividad bacteriana

[0087] La actividad bacteriana se evaluó mediante el método de la UNI (Organización Italiana de Normalización) EN 1040 (ensayo de suspensión cuantitativa para la evaluación de la actividad bactericida básica de desinfectantes y

antisépticos químicos). De acuerdo con este método, una sustancia se clasifica como bactericida para un microorganismo específico si reduce la cuenta bacteriana en al menos 5- $\log_{10}$ después de 5 minutos en contacto a 20 °C. Se sometieron a ensayo soluciones de ANW a tres concentraciones diferentes (80 %, 50 %, y 25 %) frente a dos cepas de bacterias conocidas por causar infecciones oculares, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). La siguiente Tabla 3 muestra el efecto antibacteriano de las tres concentraciones diferentes de ANW, con los valores de reducción de viabilidad expresados como la reducción $\log_{10}$.

Tabla 3: efecto antibacteriano de ANW

Especie	Solución	Reducción de viabilidad		
		80 %	50 %	25 %
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	ANW	> 5,41	> 5,41	5,35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	ANW	> 5,48	< 4,10	< 4,10

10 [0088] Como se muestra en la Tabla 3, se pueden clasificar que la ANW es un bactericida frente a las dos cepas a una concentración de un 80 %.

[0089] También se evaluó la actividad bactericida frente a las dos mismas cepas de bacterias en presencia de un 5 % de sangre humana en el medio como interferencia de suciedad orgánica. La reducción de la viabilidad se evaluó después de 10, 30, 60 y 120 minutos de exposición a ANW pura a 31 °C. La siguiente Tabla 4 muestra el efecto antibacteriano de la ANW pura en cada punto de tiempo, con los valores de reducción de viabilidad expresados como la reducción $\log_{10}$.

Tabla 4: efecto antibacteriano de ANW en presencia de un 5 % de sangre humana

Especie	Solución	Reducción de viabilidad			
		10 min	30 min	60 min	120 min
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	ANW	> 5,6	> 5,6	> 5,6	> 5,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	ANW	> 5,6	> 5,6	> 5,6	> 5,6

20 [0090] Como se muestra en la Tabla 4, se demostró que la ANW pura tiene efecto bactericida frente a las dos cepas en el punto de tiempo más corto ensayado de 10 minutos.

[0091] También se evaluó la actividad bactericida frente a la bacteria *Propionibacterium acnes* en presencia de un 1 % de suero bovino fetal en el medio como interferencia de suciedad orgánica. La reducción de la viabilidad se evaluó después de 1, 5, 15 y 30 minutos de exposición a ANW pura a 31 °C. La siguiente Tabla 5 muestra el efecto antibacteriano de la ANW pura en cada punto de tiempo, con los valores de reducción de viabilidad expresados como la reducción $\log_{10}$.

Tabla 5: efecto antibacteriano de ANW en presencia de un 1 % de suero bovino fetal

Especie	Solución	Reducción de viabilidad			
		1 min	5 min	15 min	30 min
<i>Propionibacterium acnes</i> (ATCC 11827)	ANW	> 6,9	> 6,9	5,3	> 6,9

[0092] Como se muestra en la Tabla 5, se demostró que la ANW pura tiene efecto bactericida en el punto de tiempo más corto ensayado de 1 minuto.

35 Actividad fúngica

[0093] La actividad fúngica se evaluó con el método de UNI EN 1275 (ensayo de suspensión cuantitativo para la evaluación de la actividad fungicida básica de desinfectantes y antisépticos químicos). De acuerdo con este método, una sustancia se clasifica como fungicida para un microorganismo específico si reduce la cuenta de hongos en al menos 4- $\log_{10}$ después de 15 minutos de contacto a 20 °C. Se sometieron a ensayo las soluciones de ANW a tres concentraciones diferentes (80 %, 50 %, y 25 %) frente a dos cepas de hongos conocidas por causar infecciones, *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Aspergillus niger* (ATCC 16404). La siguiente Tabla 6 muestra el efecto antifúngico de las tres concentraciones diferentes de ANW, con los valores de reducción de viabilidad expresados como la reducción $\log_{10}$.

Tabla 6: efecto antifúngico de ANW

Especie	Solución	Reducción de viabilidad		
		80 %	50 %	25 %
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	ANW	> 4,37	< 3,09	< 3,09
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	ANW	< 3,12	< 3,12	< 3,12

[0094] Como se muestra en la Tabla 6, se puede clasificar que la ANW es un bactericida frente a *Candida albicans* (ATCC 10231) a una concentración de un 80 %.

5 Actividad viral

[0095] La actividad viral se evaluó frente al virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), el virus del Herpes Simple de tipo 1 (VHS-1), y el virus del Herpes Simple de tipo 2 (VHS-2) en presencia de un 5 % de suero bovino fetal en el medio como interferencia de suciedad orgánica. Para el VIH-1, la reducción de viabilidad se evaluó después de 10 minutos de exposición de ANW pura a 21,5 °C. Para VHS-1 y VHS-2, la reducción de viabilidad se evaluó después de 5 minutos de exposición a ANW pura a 35 °C. La siguiente Tabla 7 muestra el efecto antiviral de la ANW pura en cada virus, con los valores de reducción de viabilidad expresados como la reducción $\log_{10}$.

15 Tabla 7: efecto antiviral de ANW

Especie	Solución	Exposición	Reducción de viabilidad
VIH-1 (cepa HTLV-III _b)	ANW	10 min a 21,5 °C	> 4,5
VHS-1 (ATCC VR733)	ANW	5 min a 35 °C	< 5,5
VHS-2 (ATCC VR734)	ANW	5 min a 35 °C	4,25

[0096] Como se muestra en la Tabla 7, la ANW que puede inactivar los virus sometidos a ensayo.

EJEMPLO 2

20 Objetivo

[0097] Determinar la eficacia del agua nanoagregada ácida (ANW) en la estimulación de la curación corneal y la curación de cataratas.

25 Curación de ulceración corneal

[0098] La actividad de curación corneal se evaluó en un modelo de conejo *in vivo*. Se provocaron experimentalmente heridas oculares corneales en 8 conejos. A continuación se trataron los ojos izquierdo y derecho con ANW y solución salina, respectivamente, por aplicación de 100 ml de las soluciones 4 veces por día durante 14 días consecutivos. En los días 4º, 9º, y 14º después de la cirugía, se tomaron imágenes de cada herida con un microscopio de lámpara de hendidura y se calculó el área de cada herida con el software Topcon IMAGENET 2000. A continuación se usó el área de herida para calcular la tasa de curación de herida (WHR) usando la siguiente ecuación:

$$35 \quad \text{WHR} = 100(1 - (\text{área de herida en el punto temporal}) / (\text{área de herida inicial}))$$

[0099] La siguiente Tabla 8 muestra la Tasa de Curación de Herida de los ojos tratados con ANW y solución salina en los días 4, 9, y 14.

40 Tabla 8: efecto de curación de ulceración corneal de ANW y solución salina

	Tasa de Curación de Herida (WHR)		
	Día 4	Día 9	Día 14
ANW	77,78 ± 9,06	83,32 ± 12,23	87,20 ± 13,16
Solución salina	71,84 ± 19,38	63,45 ± 23,02	64,23 ± 28,28
Valor T	1,36	3,73	3,61
Valor P	> 0,05	< 0,05	< 0,05

[0100] Como se muestra en la Tabla 8, la ANW fue significativamente más eficaz que la solución salina en la

curación de la úlcera corneal en los dos últimos de los tres puntos de tiempo.

[0101] Las heridas también se observaron diariamente para la presencia del cierre de la herida. En el día 14, se observó que la mitad de las úlceras corneales tratadas con ANW se curaron, mientras que algunas córneas tratadas con solución salina aún presentaban una gran úlcera. Se tomaron fotografías a modo de ejemplo (no se muestran) de las heridas corneales en 3 de los conejos en el día 14.

[0102] Las heridas también se observaron diariamente para la presencia de infecciones e inflamación. Se observó que la ANW reducía la inflamación después de la lesión. Además, dos de los ojos tratados con solución salina se infectaron gravemente con hipopion, y la inflamación de estas córneas fue demasiado intensa para identificar la pupila. Se obtuvieron fotografías de imágenes histológicas a modo de ejemplo (no se muestran) de la inflamación en 2 de los conejos.

[0103] La evaluación histológica también se usó para observar la regeneración de la córnea y la formación de cicatrices. Se observó que la ANW aumentó la regeneración y redujo la formación de cicatrices en comparación con la solución salina. Además, se observaron deficiencias del epitelio en la totalidad de los ojos tratados con solución salina, y en ninguno de los ojos tratados con ANW. Se tomaron imágenes histológicas (no se muestran) que representan la formación de cicatrices de las heridas de la córnea en 3 de los conejos.

[0104] Las heridas también se observaron para la presencia de angiogénesis. Se observó neovascularización en un 35 % de las córneas tratadas con solución salina, y en ninguno de los ojos tratados con ANW. Se tomaron fotografías a modo de ejemplo (no se muestran) que representan la angiogénesis de 2 de los conejos.

Curación de cataratas

[0105] La actividad de curación de cataratas se evaluó en un modelo de rata *in vivo*. La catarata se indujo mediante inyección intraperitoneal de d-galactosa en 1 rata con una dosis de 10 g/kg por día (dos veces/día). A continuación se trataron los ojos izquierdo y derecho con ANW y solución salina, respectivamente, mediante la aplicación de 1 gota de las soluciones 4 veces por día durante 30 días consecutivos. En el día 30, se observó que la catarata tratada con ANW se había curado significativamente en comparación con la catarata tratada con solución salina. Se tomaron fotografías (no se muestran) que representan las cataratas en el día 30.

EJEMPLO 3

Objetivo

[0106] Determinar la seguridad del agua nanoagregada ácida (ANW) en aplicaciones sistémicas y tópicas.

Estudios *in vitro*

[0107] Se evaluó la citotoxicidad con el método de la ISO (Organización Internacional de Normalización) 10993-5. De acuerdo con este método, una sustancia se clasifica basándose en su efecto sobre un cultivo celular. Se aplicaron 100 µl de ANW pura a un cultivo de fibroblastos murinos L-929 y las células se evaluaron después de 24 horas de incubación a 37 °C. Se observaron algunas células malformadas después del periodo de incubación. Basándose en estos resultados, se definió la ANW como "ligeramente citotóxica" (grado 1 de 4).

[0108] Se evaluó la mutagenicidad con el método de OECD 471. De acuerdo con este método, una sustancia se clasifica basándose en su capacidad de inducir mutaciones puntuales en bacterias. Se estudiaron cinco cepas mutantes de *Salmonella typhimurium* (TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100, y TA 102) tanto en presencia como en ausencia de ANW. Basándose en los resultados de un ensayo de mutación inversa (ensayo de Ames), la sustancia ANW se definió como no mutagénica.

Estudios de toxicidad sistémica

[0109] Se evaluó la toxicidad aguda con el método de la ISO 10993-11, 2006, Evaluación Biológica de Dispositivos Médicos - Parte 11: Ensayos para Toxicidad Sistémica. De acuerdo con este método, una sustancia se clasifica como no tóxica si los animales inyectados con la sustancia no muestran una reacción biológica significativamente mayor que los animales tratados con un artículo de control. Se infectaron 10 ratones albinos suizos hembra por vía intraperitoneal con ANW o solución salina con una cantidad de 50 ml/kg. Se observaron los signos clínicos de los animales inmediatamente después de la inyección, y 4, 24, 48, y 72 ± 2 horas después de la inyección. La ANW no indujo una reacción biológica significativamente mayor que el control, y por lo tanto se clasificó como no tóxica.

Estudios de irritación de la piel

[0110] Se evaluó la irritación dérmica después de exposiciones agudas con el método de la ISO 10993-10. Se

aplicaron 0,5 ml de ANW pura con un parche sobre la piel afeitada de tres conejos albinos macho. El parche se mantuvo sobre la piel por medio de una tirita adhesiva no irritante durante 4 horas. Se observó la reacción de la piel después de la retirada del parche y 24, 48, y 72 horas después de la retirada. No se observó ningún signo de eritema o edema. Basándose en estos resultados, se determinó que la ANW no es irritante para la piel, con un Índice de Irritación de la Piel de 0,00.

[0111] También se evaluó la irritación dérmica después de exposición repetida con el método de la ISO 10993-10. Se trataron tres ratones macho de Nueva Zelanda 5 días a la semana durante 4 semanas con dos administraciones diarias consecutivas de 5 ml de ANW pura o solución salina como control aplicadas con un parche durante una hora. Se observó la reacción de la piel antes y después de cada aplicación a lo largo del periodo de 4 semanas completo. No se observó ningún signo de eritema o edema. Además, después del sacrificio, no se detectaron signos de inflamación en las imágenes histológicas. Basándose en estos resultados, se determinó que la ANW no exhibe ninguna irritación significativa en la piel.

15 Estudios de sensibilización de la piel

[0112] Se evaluó la hipersensibilidad de la piel de tipo retrasado con el método de la ISO 10993-10: Ensayo de Maximización en Cobaya. El ensayo usó 15 cobayas Hartley hembra albinas (10 tratadas y 5 controles). La fase de inyección (Día 0) se llevó a cabo por administración de tres inyecciones intradérmicas de 0,1 ml a cada animal: (a) adyuvante de Freund completo, (b) ANW pura (ensayo) o solución salina (control), (c) ANW (ensayo) o solución salina (control) mezclados conjuntamente con adyuvante de Freund completo. A continuación se realizó un masaje de piel con 1 ml de SLS al 10 % en el Día 6. La fase de inducción (Día 7) se llevó a cabo por aplicación de 1 ml del ensayo o el control, dejado en su lugar durante 48 horas con un parche oclusivo. El desafío se llevó a cabo en el Día 21 mediante la aplicación a cada animal (tanto tratado como de control) de vendajes con 1 ml de ANW en el lado derecho y 1 ml de solución salina en el lado izquierdo, dejado en su lugar durante 24 horas.

[0113] Las evaluaciones se llevaron a cabo en el día 23° (24 horas después del parche y la retirada) y en el día 24° (48 horas después del parche y la retirada). Se evaluó la intensidad de eritema y/o edema de acuerdo con la escala de Magnusson y Kligman de 0 a 3.

[0114] No se observó ninguna anomalía en los animales tratados o de control. Basándose en estos resultados, se determinó que ANW no exhibe potencial de dermatitis de contacto retrasada.

Estudios de irritación ocular

[0115] Se evaluó la irritación ocular con el método de la ISO 10993-10. En un primer experimento, se trataron tres conejos blancos de Nueva Zelanda por instilación de 0,1 ml de ANW pura en el ojo izquierdo, dejando el ojo derecho sin tratar como control. Los ojos se examinaron 1, 24, 48 y 72 horas después de la instilación mediante tinción de fluoresceína y observación en una lámpara de hendidura. No se observó ningún signo de irritación en ninguno de los ojos. Basándose en estos resultados, se determinó que la ANW no es irritante para el tejido ocular de los conejos Blancos de Nueva Zelanda.

[0116] En un segundo experimento, se evaluó de nuevo la irritación ocular con el método de la ISO 10993-10. Se trataron tres conejos blancos de Nueva Zelanda por instilación de 0,1 ml de ANW pura en el ojo izquierdo como ensayo, e instilación de 0,1 ml de agua que contenía NaCl (solución salina) en el ojo derecho como control. El tratamiento se repitió durante 30 días consecutivos. No se observó ningún signo de irritación en ninguno de los ojos de ensayo o control en ninguno de los puntos de observación. Basándose en estos resultados, se determinó que la ANW artículo de ensayo no es irritante para el tejido ocular de los conejos Blancos de Nueva Zelanda.

50 Resumen de los estudios de toxicología

[0117] La siguiente Tabla 9 muestra una sinopsis de los estudios de seguridad informados anteriormente en el Ejemplo 3.

Tabla 9: sinopsis de los estudios de seguridad de ANW

Efecto	Método	Resultados
Citotoxicidad	Fibroblastos de ratón L-929 <i>in vitro</i>	Ligeramente citotóxica (grado 1 de 4)
Irritación de piel aguda	Exposición aguda en conejos	No irritante
Irritación de piel repetida	Exposición repetida en conejos	No irritante
Hipersensibilidad retrasada	Ensayo de maximización en cobayas	Sin sensibilización
Irritación ocular primaria	Administración aguda en conejos	No irritante

Efecto	Método	Resultados
Irritación ocular repetida	Administración repetida en conejos	No irritante
Genotoxicidad	Ensayo de Ames	No mutagénica
Toxicidad sistémica aguda	Dosificación i.p. en ratones	No tóxica hasta 50 ml/kg i.p.

EJEMPLO 4

Objetivo

5

[0118] Determinar la eficacia del agua nanoagregada ácida (ANW) para modular la actividad del sistema inmune. Estudio *in vitro* de proliferación de PBMC

10 **[0119]** La capacidad de la ANW para inhibir la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se evaluó en un modelo celular *in vitro* usando 12 lotes de PCMC. En el experimento, 4 de los lotes se expusieron a betametasona (10 nM), un esteroide glucocorticoide con propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras, 4 de los lotes se expusieron a una dilución 1:10 de ANW, y los 4 lotes restantes se expusieron a una dilución 1:20 de ANW. La Tabla 10 muestra a continuación el efecto de inhibición que se midió para cada uno de los 12 lotes.

15

Tabla 10: inhibición de la proliferación de PBMC

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Promedio
Betametasona (10 nM)	87,7 %	85,7 %	79,4 %	88,5 %	85,3 %
Agua nanoagregada ácida (1:10)	39,9 %	29,0 %	19,3 %	16,6 %	26,2 %
Agua nanoagregada ácida (1:20)	17,3 %	22,0 %	4,0 %	7,0 %	12,6 %

[0120] Como se muestra en la Tabla 10, la ANW inhibió la proliferación de PBMC para ambas diluciones. Se ha mostrado previamente que estas diluciones no son significativamente tóxicas en este tipo de células *in vitro*.

20 Estudio *in vitro* de la activación de linfocitos T

[0121] La capacidad de la ANW para modular citoquinas inmunorreguladoras se evaluó en un modelo celular *in vitro* usando PBMC de 4 donantes de sangre estimulados con derivados de proteína purificada de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD), un antígeno Th1 prototípico. En el experimento, los lotes de células PBMC se estimularon con PPD solo, PPD más betametasona (10 nM), y PPD más Agua Nanoagregada Ácida (dilución 1:10). La activación de linfocitos T se midió al someter a ensayo los niveles de tres citoquinas: IL-10 (expresada en linfocitos T), IFN-gamma (expresada en células Th-1), e IL-4 (expresada en células Th-2). La Figura 3 muestra los niveles de cada citoquina en comparación con PBMC no estimuladas.

30 **[0122]** Como se muestra en la Figura 3, la ANW reguló positivamente la producción de IL-10 mediante PMBC estimulados de forma estadísticamente significativa (ensayo T: $p < 0,05$). La interleuquina IL-10 es una citoquina inmunorreguladora importante. Su función biológica principal es limitar y terminar las respuestas inflamatorias, y regular la diferenciación y la proliferación de varias células inmunes. La insuficiencia de IL-10 se considera como patofisiológicamente relevante en trastornos inflamatorios caracterizados por un patrón de citoquina de tipo 1 tal como psoriasis. De ese modo, las propiedades inmunomoduladoras de ANW y, específicamente, las propiedades activadoras de IL-10 de la ANW, sugieren que la ANW se puede usar como agente terapéutico directo para varias enfermedades de la piel.

EJEMPLO 5

40

Objetivo

[0123] Comparar la estabilidad del agua nanoagregada ácida (ANW) con la estabilidad informada de otras aguas electrolizadas de pH, ORP, y composición similares.

45

Comparación de ANW con Agua Oxidante Electrolizada (EO) de Soo-Voo Len

50 **[0124]** La estabilidad de la ANW en condiciones de apertura y cierre a 25 °C se comparó con la estabilidad del agua EO que se informa en el artículo "Effects of Storage Conditions and pH on Chlorine Loss in Electrolyzed Oxidizing (EO) Water" - Journal of Agricultural and Food Chemistry - 2002, 50, 209-212 de Soo-Voon Len, *et al.*

[0125] En Soo-Voo Len, el agua de electrolizada con un pH ácido (2,5-2,6), ORP > 1000 mV (1020-1120), y un

contenido de cloro libre de ~50 ppm (53-56 ppm) se generó con un dispositivo ROX-20TA fabricado por Hoshizaki Electric Inc. (Aichi, Japón) usando una intensidad de corriente de 14 amperios y 7,4 voltios. El artículo informa que en condiciones de apertura a 25 °C, el cloro en el agua de electrolizada se perdía completamente después de 30 horas cuando se agitaba, y después de 100 horas cuando no se agitaba. Además, como se observa en la Figura 1 del artículo, el cloro libre se perdió casi completamente después de 10 horas en condiciones de apertura, agitación, y luz difusa. El artículo también informa que en condiciones de oscuridad y cierre a 25 °C, el cloro total en el agua electrolizada disminuyó en aproximadamente un 40 % después de 1400 horas (aproximadamente 2 meses).

[0126] En comparación, la ANW almacenada en condiciones de apertura a 25 °C sin agitación perdió completamente el cloro después de 240 horas (10 días), tiempo más que dos veces mayor que el agua EO en Soo-Voo Len (100 horas). Además, la ANW almacenada en condiciones de apertura a 25 °C sin agitación y luz perdió completamente el cloro después de 24 horas, tiempo más de dos veces mayor que el agua EO en Soo-Voo Len (10 horas). Finalmente, en la ANW almacenada en condiciones de cierre a 25 °C perdió un 8,44 % de cloro libre después de 3 meses, menos de una cuarta parte de la cantidad que perdió el agua EO en Soo-Voo Len después de aproximadamente 2 meses (40 %).

Comparación de ANW con Agua Oxidante Electrolizada (EO) de Shun-Yao Hsu

[0127] La estabilidad de la ANW en condiciones de cierre a aproximadamente 30 °C se comparó con la estabilidad del agua EO que se informa en el artículo "Effects of storage conditions on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water" - Journal of Food Engineering 65 (2004) 465-471 de Shun-Yao Hsu, *et al.*

[0128] En Shun-Yao Hsu, el agua electrolizada de la "formulación J" tenía un pH ácido (2,61), ORP = 1147 mV, y un contenido de cloro libre de 56 ppm. El artículo informa que en condiciones de cierre a 25-30 °C, el cloro libre en el agua electrolizada era de 43 ppm después de 21 días, una pérdida de un 23 %. En comparación, las muestras de ANW almacenadas en condiciones de cierre a 25 °C, 30 °C, y 40 °C sin agitación perdieron un 8,44 %, un 8,64 %, y un 15,43 % de cloro libre después de 3 meses y un 12,14 %, un 19,13 %, y un 18,31 % de cloro libre después de 1 año, respectivamente.

EJEMPLO 6

[0129] Se sometieron a ensayo las propiedades y la composición del Agua Nanoagregada Ácida y se descubrió que tenían las especificaciones que se informa a continuación en la Tabla 11. También se analizaron las propiedades y la composición del Agua Nanoagregada Ácida que se informan posteriormente en la Tabla 12.

Tabla 11: especificaciones del agua ácida

Ensayo	Método	Especificación
Apariencia	Simple vista	Líquido
Olor	Olfato	Característico
Color	Simple vista	Incolora
pH	Como tal @ 25 °C mediante pHmetro Mettler Toledo SevenMulti - Determinación Potenciométrica (Ph Eur. 2.2.3 - Ed. Actual)	< 3,00
Potencial de oxidorreducción ORP (mV)	Como tal @ 25 °C mediante electrodo redox de combinación Mettler Toledo (P/N 51343200) Valoración Potenciométrica (Ph Eur. 2.2.20 - Ed. Actual)	> 1100,0
Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Como tal @ 25 °C	< 1300
Ensayo de cloro total (mg/l o ppm)	Método internacional M37-07 Método Espectrofotométrico fuente APAT IRSA CNR HandBook Volumen 2 - Ref 4080	40,0-70,0
Ensayo de cloro total (mg/l o ppm)	Método internacional M37-07 Método Espectrofotométrico fuente HandBook APAT IRSA CNR Volumen 2 - Ref 4080	40,0-70,0
Ensayo de cloro total (mg/l o ppm)	Método Interno M37-07 Método Yodométrico fuente HandBook APAT IRSA CNR Volumen 2 - Ref 4080	40,0-70,0
Ensayo de cloro ((mg/l o ppm)	Método Interno M05-08 Método Espectrofotométrico fuente HandBook APAT IRSA CNR Volumen 2 - Ref 4090	< 200,0
Cloritos (mg/l o ppb))	EPA 300.1, 1997 (en forma de ClO_2)	< 100
Cloratos (mg/l o ppm)	EPA 300.1, 1997	<1

Ensayo	Método	Especificación
RMN ^{17}O (Hz) ancho de línea @ 50 %	Espectrómetro de RMN ^{17}O	< 50
Metales pesados [Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb, Sn]	Método ICP	< 10 ppm
Itrio (Método ICP)	Mediante EPA 200,8 1994 (límite de detección de 0,1 mg/l)	< 0,1 ppm
Cinc (Método ICP)	Mediante EPA 200,8 1994 (límite de detección de 0,1 mg/l)	< 0,1 ppm
Iridio (Método ICP)	Mediante EPA 200,8 1994 (límite de detección de 0,1 mg/l)	< 0,1 ppm
Titanio (Método ICP)	Mediante EPA 200,8 1994 (límite de detección de 0,1 mg/l)	< 0,1 ppm
Zirconio (Método ICP)	Mediante EPA 200,8 1994 (límite de detección de 0,1 mg/l)	< 0,1 ppm
Rutenio (Método ICP)	Mediante EPA 200,8 1994 (límite de detección de 0,1 mg/l)	< 0,1 ppm

Tabla 12: resultados del ensayo de agua ácida

	ANW	ANW	ANW
	LOT LCOVI/57	LOT LCOX/5	LOT LCOX/1
Apariencia	Líquido incoloro con ligero olor a cloro (como una piscina)	Igual	Igual
Ensayo de cloro libre (mg/l) Método Espectrofotométrico	53,1	48,6	49,9
Ensayo de cloro total (mg/l) Método Espectrofotométrico	52,1	48,6	49,0
Ensayo de cloro total (mg/l) Método Yodométrico	60,6	54,9	56,7
Ensayo de cloro (mg/l) UNI 24012 (Método Mercurimétrico)	138	194,0	183,4
Cloritos mg/l (en forma de ClO_2) mediante EPA 300.1 1997 (límite de detección de 100 mg/l)	< 100	100	< 100
Cloratos mg/l mediante EPA 300.1 1997 (límite de detección de 0,1 mg/l)	1,20	1,5	0,9
pH (como tal mediante pHmetro Mettler Toledo Met Rohm 744)	2,59	2,71	2,81
ORP mediante electrodo redox de combinación Mettler Toledo PT4805-60-88TE-S7/120	1151,8	1121,7	1110,5
RMN ^{17}O (ancho de línea @ 50 % - Hz)	45,76	45,33	46,07
Metales pesados (Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb, Sn)	< 10 ppm	< 10 ppm	< 10 ppm

EJEMPLO 6

5

[0130] La estabilidad de las composiciones de Agua Nanoagregada Ácida que contienen diferentes cantidades de ion cloruro se sometieron a ensayo tanto en almacenamiento como al aire libre. La composición de bajo contenido de cloruro contenía menos de 200 ppm de cloruro, y la composición de alto contenido de cloruro contenía 1100 ppm de cloruro.

10

[0131] Para someter a ensayo la estabilidad de almacenamiento, las composiciones se almacenaron en condiciones de cierre a 25 °C y humedad relativa de un 60 %, y no se agitaron o expusieron a luz difusa. Después de 3 y 12 meses, la composición de bajo contenido de cloruro tuvo una pérdida de cloro libre de un 8,44 % y un 12,14 %, respectivamente. Por el contrario, las composiciones de alto contenido de cloruro tuvieron una pérdida de cloro libre de un 27,4 % después de solo 3 meses.

15

[0132] Para evaluar la estabilidad al aire libre, las dos composiciones se mantuvieron abiertas, en agitación, y

expuestas a la luz durante 24 horas a una temperatura de 30 °C. Como se ilustra en la Figura 5, la composición de alto contenido de cloruro perdió el cloro libre a una velocidad mayor que la composición de bajo contenido de cloruro.

5 **[0133]** Estos resultados demuestran que la estabilidad de la ANW depende del cloro que permanece como HClO, lo que previene tanto la evaporación como la descomposición.

[0134] A partir de la descripción anterior, será evidente que se pueden realizar variaciones y modificaciones en la invención que se describe en el presente documento para adoptarla a diversos usos y condiciones. Tales
10 realizaciones también están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

[0135] La enumeración de un listado de elementos en cualquier definición de una variable en el presente documento incluye las definiciones de esa variable como cualquier elemento o combinación individual (o subcombinación) de los elementos listados. La enumeración de una realización en el presente documento incluye esa realización como
15 realización individual o en combinación con cualquier otra realización o parte de la misma.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de agua ácida que tiene un potencial de oxidación reducción (ORP) mayor de 1100 mV para su uso en el tratamiento de una catarata en un paciente animal,
5 en donde la composición es para administración tópica a un ojo de dicho paciente.
2. Composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de agua ácida que tiene un potencial de oxidación reducción (ORP) mayor de 1100 mV para su uso en el tratamiento de una neovascularización corneal en un paciente animal, en donde la composición es para administración tópica a un ojo de dicho paciente.
10
3. La composición para el uso de una de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicha agua ácida tiene un pH de 0,5 a 5,0, o en donde dicha agua ácida tiene una anchura de línea media de RMN usando ^{17}O de 42 a 60 Hz, y un pH de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5,0.
- 15 4. La composición para el uso de una de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicha administración comprende echar gotas de dicha composición directamente en dicho ojo.
5. La composición para el uso de una de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicha administración comprende aplicar dicha composición a dicho ojo con una gasa.
20
6. La composición para el uso de una de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicha administración comprende aplicar dicha composición a dicho ojo de 1 a 20 veces al día, durante al menos 14 días.
7. La composición para el uso de una de las reivindicaciones 1-6, en donde el agua ácida es agua ácida electrolítica
25 que comprende cloro libre, en donde:
 - a. de un 95 % a un 99,9 % de dicho cloro libre está presente en forma de ácido hipocloroso;
 - b. dicha agua tiene un pH de 1,0 a 4,0; y
 - c. dicha agua tiene un ORP mayor de 1100 mV.
- 30 8. La composición de la reivindicación 7 en la que el agua ácida es agua ácida electrolítica que comprende cloro libre, en donde:
 - a. de un 90 % a un 99,9 % de dicho cloro libre está presente en la forma de ácido hipocloroso;
 - 35 b. dicha agua tiene un pH de 1,0 a 4,0; y
 - c. dicha agua tiene un ORP mayor de 1100 mV.
9. La composición de la reivindicación 7, en la que la cantidad relativa de HOCl y Cl_2 es de un 99,9 % de HOCl y un 0,1 % de Cl_2 a un 95 % de HOCl y un 5 % de Cl_2 , o en la que la cantidad relativa de HOCl y Cl_2 es de un 99,5 % de
40 HOCl y un 0,5 % de Cl_2 a un 98,5 % de HOCl a un 1,5 % de Cl_2 .
10. La composición de una de las reivindicaciones 7 u 8, en la que el agua ácida electrolítica tiene una anchura de línea media de RMN usando ^{17}O de 42 a 60 Hz.
- 45 11. La composición de una de las reivindicaciones 7-9, en la que el agua ácida electrolítica tiene una conductividad de 1200 a 1400 $\mu\text{S}/\text{cm}$.
12. La composición de una de las reivindicaciones 7-9, en la que el agua ácida electrolítica mantiene un 90 % de dicho cloro libre después de un periodo de almacenamiento de 3 meses a temperatura ambiente, o en la que dicha
50 agua mantiene un 80 % de dicho cloro libre después de un periodo de almacenamiento de 3 meses a temperatura ambiente.

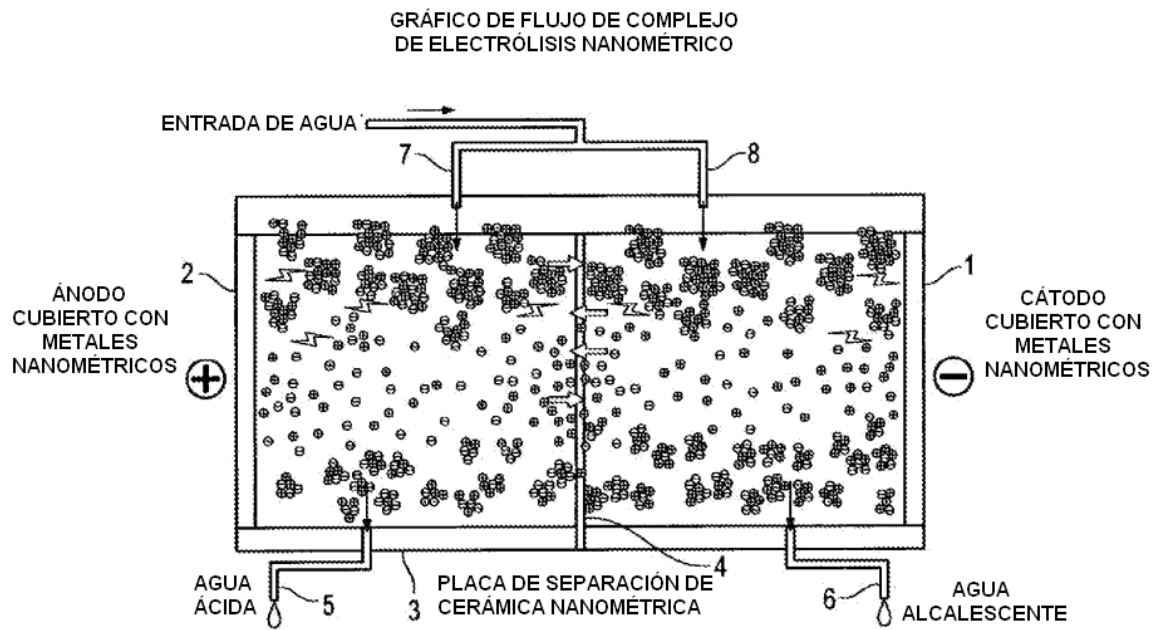


Figura 1

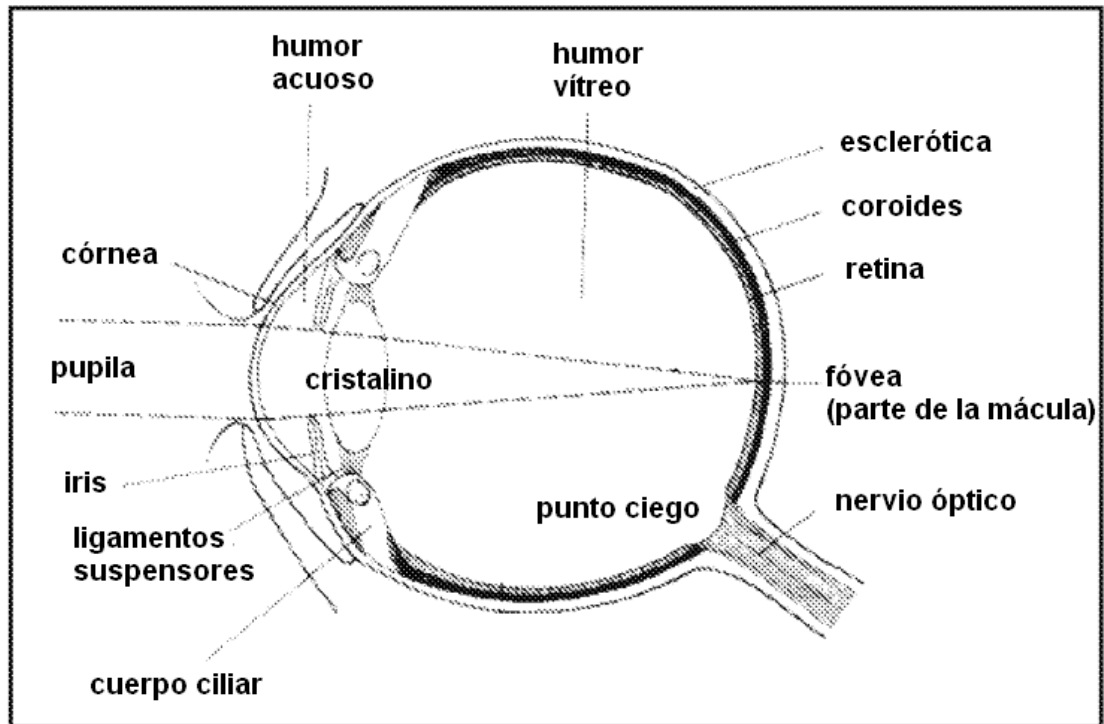


Figura 2

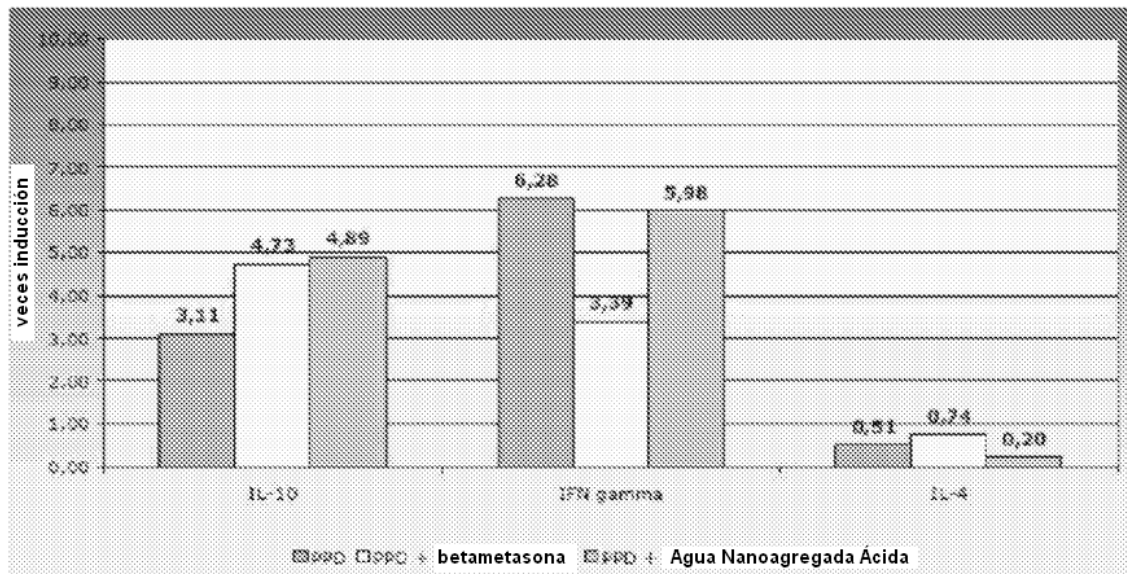


Figura 3

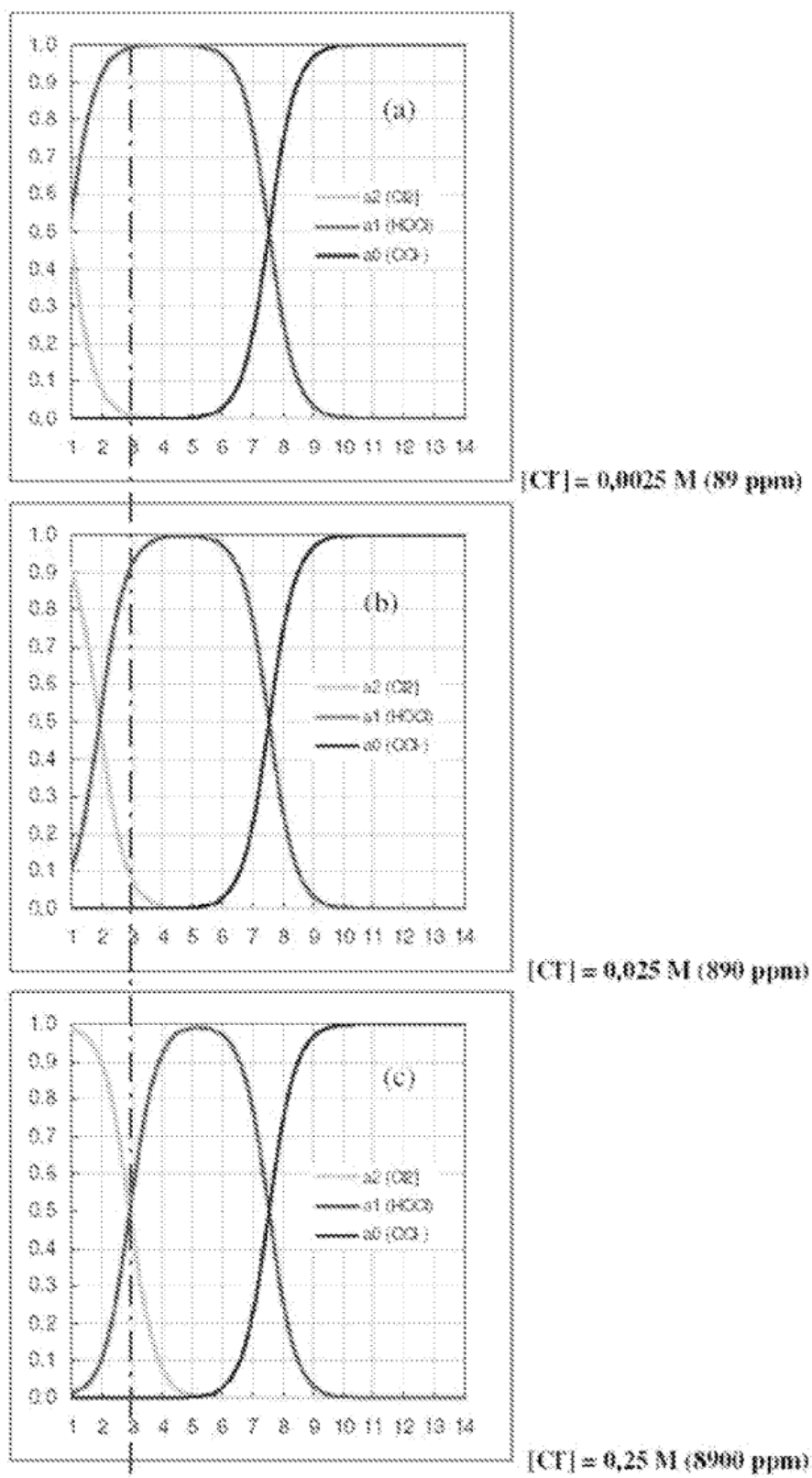


Figura 4

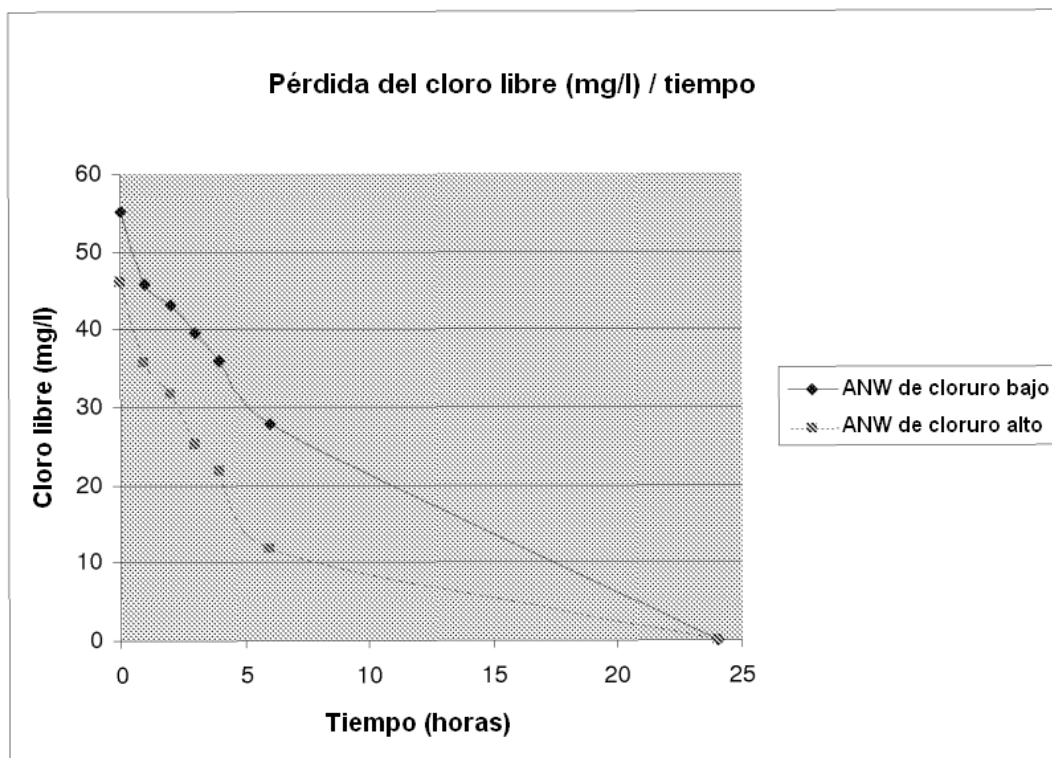


Figura 5

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2004012748 A [0004]
- WO 2001054704 A [0004]
- JP 19970040444 B [0009]
- US 2006275502 A1 [0010]
- WO 2008131936 A [0062]
- WO 2007048772 A [0062]

10

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **SHIMMURA et al.** Acidic electrolysed water in the disinfection of the ocular surface. *Experimental Eye Research*, January 2000, vol. 70 (1), 1-6 [0008]
- **SHUN-YAO HSU.** Effects of storage conditions on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Engineering*, 2004, vol. 65, 465-471 [0012] [0127]
- **SOO-VOON LEN.** Effects of Storage Conditions and pH on Chloride Loss in Electrolyzed Oxidizing (EO) Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50, 209-212 [0011]
- **SOO-VOON LEN.** Effects of Storage Conditions and pH on Chlorine Loss in Electrolyzed Oxidizing (EO) Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50, 209-212 [0124]

15