



283 891

MEMORIA DESCRIPTIVA

PARA UNA PATENTE DE INVENCION POR VEINTE AÑOS EN ESPAÑA,
A FAVOR DE SOCIÉTÉ EGEMA (S.A.R.L.), DE NACIONALIDAD FRAN-
CESA, DOMICILIADA EN PARÍS (FRANCIA) 32, rue Eugène Fla-
chat,

sobre:

“ PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE COMPUESTOS DE PROPIEDADES
BACTERICIDAS, VIRULICIDAS, ANTIPARASITARIAS Y CITOTÓXICAS ”

La presente invención se refiere a un procedimiento pa-
ra la obtención de compuestos de propiedades bactericidas, vi-
rulicidas, antiparasitarias y citotóxicas, así como las combi-
naciones obtenidas con ayuda de este procedimiento.

5.

Se ha descubierto que la asociación de un enediciol y --

283891



iones de un metal de la serie de transición en presencia de oxígeno molecular, se comporta, en fase acuosa, como un sistema óxido-reductor, en el que el metal se reduce y oxida alternativamente, continuando este ciclo en tanto el ácido ascórbico se encuentre en una concentración suficiente.

5.

Cada rotación, debido a las reacciones en cadena, lleva en sí la formación transitoria de radicales libres, en particular radicales libres hidroxilos, es decir, entidades químicas a las que se les atribuye la acción biológica de las radiaciones ionizantes por efecto indirecto.

10.

Tal sistema lleva también a concebir que la asociación tiene propiedades que son las de las radiaciones ionizantes.

Efectivamente, los efectos esperados se han puesto de manifiesto, in vitro en sustancias diversas y in vivo en los microorganismos y mamíferos.

15.

Entre los enérgicos utilizables para la puesta en práctica del procedimiento conforme a la invención, se puede citar el ácido ascórbico, el ácido dihidroximaléico, los reductones, etc... prefiriéndose siempre el ácido ascórbico debido a su carencia total de toxicidad y a su escaso costo de fabricación; puede utilizarse en forma libre o en forma de sal hidrosoluble.

20.

Entre los elementos de la serie de transición utilizables conforme a la invención, se pueden citar el cobre, el hierro, el estaño, el cobalto y el manganeso, que pueden utilizarse en el procedimiento bajo forma de sales, en especial de sales hidrosolubles. Se prefieren el cobre y el hierro. No obstante, la quelación del hierro por ciertos agentes aumenta considerablemente la reactividad de la composición, mientras que para los otros iones de la serie de transición, la quelación por los mismos agentes puede tener eventualmente un efecto inhibitorio.

30.

283891



El uso de hierro quelatado presenta, principalmente para las aplicaciones terapéuticas, ventajas prácticas, evitando reacciones parásitas y permitiendo la obtención de preparados de pH neutro.

5. De esta forma, los sistemas en los que el hierro ha sido quelatado por el ácido etileno diamino tetracético, el ácido ciclohexano diamino tetracético, los polifosfatos son potencializados; en cambio, la actividad catalítica del cobre se ve inhibida por el ácido etileno diamino tetracético, en la misma forma que por la cistina, la histidina y la penicilamina.

10. Según se trate de inhibir o, por el contrario de potencializar la preparación, la relación óptima entre el ion metálico y el agente quelador, debe estar próximo a la relación equimolecular.

15. En cuanto a la relación entre el ácido ascórbico y el ion metálico, puede variar dentro de límites muy amplios, por ejemplo de 40/1 a 1/40, habiendo probado la experiencia que el efecto de la disminución de la concentración de uno de los constituyentes, se ve compensado, al menos parcialmente, por aumento de la concentración del otro.

20. La combinación realizada en el momento de la puesta en práctica del procedimiento conforme a la invención, puede, en virtud de sus propiedades bacteriocidas, virulicidas y antiparasitarias, recibir numerosas aplicaciones, entre las que se puede citar en primer lugar la depuración biológica del agua potable.

25. En este ejemplo de aplicación, el enéjico elegido es el ácido ascórbico, o bien una de sus sales, y el ion metálico es el cobre bajo forma de una sal soluble en el agua. Teóricamente tiene poca importancia que el ion cobre puesto en reacción
- 30.

283891



se presente bajo la forma de ion cuproso o cúprico. Sin embargo, se refieren los derivados cúpricos debido a su mayor estabilidad y mejor solubilidad, siendo el preferente el sulfato cúprico cristalizado pentahidratado $\text{SO}_4\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. La presencia simultánea en el agua convenientemente aireada, del ácido ascórbico y de iones de cobre, en cualquier dosis que sea, asegura un efecto microbicida, virulicida y antiparasitario, según lo han demostrado las experiencias. Sin embargo, para obtener un efecto práctico, la concentración de iones cobre en el agua no debe descender por debajo de 10^{-5} M.

Conviene que el ácido ascórbico sea el constituyente predominante, debido a las siguientes razones:- En primer lugar, el ácido ascórbico atóxico sustituye ventajosamente al cobre, que es preferible mantener a una concentración inferior a la admitida habitualmente para agua potable. En segundo lugar, el aumento de la concentración en ácido ascórbico aumenta la duración de la eficacia de la combinación depuradora, que puede alcanzar entonces varias horas. Si la absorción del agua de alimentación se hace antes que la combinación haya perdido su actividad, se puede detener ésta, añadiendo agua, antes de la absorción, un quelador de cobre tal como la histidina, la cistina, la penicilamina o el ácido etileno diamino tetracético (EDTA), una sal sódica de éste o un quelato metálico que tenga una constante de disociación superior a la del quelato de cobre. Utilizando este quelador en proporciones sensiblemente equimoleculares a las del cobre, impide los procesos de óxido-reducción, terminando con la activación de oxígeno molecular.

Teniendo en cuenta estos hechos experimentales, se ha encontrado que una combinación depuradora particularmente satisfactoria, resultaba de la reacción del ácido ascórbico y de una

283891



sal cúprica, tal como el sulfato de cobre, en una relación molecular de 50/1 aproximadamente.

5. Para agua medianamente sucia, esta combinación se utiliza preferentemente en razón de 0'2 milimoléculas por litro de ácido ascórbico, pudiendo duplicarse esta dosis para aguas muy sucias. Pasados 10 minutos, esta combinación asegura su disolución en el agua; y una depuración biológica completa de la misma. Para destruir la actividad de la combinación se puede entonces disolver en ella un quelador, en cantidad molecular o superior a la del cobre disuelto.

10. La combinación anterior puede prepararse en forma de composición apta para su utilización para depurar un litro de agua, presentándose esta composición bien en solución, bien en polvo o en comprimidos conteniendo eventualmente un vehículo inerte, bien en forma de una combinación de estos últimos.

15. Esta composición se formula en la forma siguiente (la concentración molar de los constituyentes en el agua que se va a depurar se indica igualmente).

	Constituyente	Pesos	Concentración molar
20.	Sulfato cúprico ($SO_4Cu, 5H_2O$)	1,66 mg	$0,066 \times 10^{-4} M$
	Ácido ascórbico	35'2 "	$2 \times 10^{-4} M$

25. Al mismo tiempo que esta composición, el quelador puede hacerse comercial en forma de una dosis separada destinada a añadirse a un litro de agua para detener la actividad de esta composición. La dosis de quelador puede formarse ventajosamente, bien con 3'5 mg de sal bisódica del EDTA cristalizado con dos moléculas de agua, bien con 3'2 mg de cistina o 2 mg de his

233391



tidina, presentada en solución, polvo, granulado o comprimidos.

Los siguientes ejemplos ponen de manifiesto las experiencias llevadas a la práctica, y puestas de manifiesto a través de los resultados enunciados.

5. EJEMPLO 1

La reacción de 2'49 mg de SO_4Cu , 5 H_2O y de 55'2 mg de ácido ascórbico, permiten obtener la esterilización total de - un litro de agua de manantial (pH 8), en menos de 10 minutos, y en el que se han echado previamente, bien 10^5 Escherichia coli, bien 10^6 MK_{50} del virus de la poliomelitis.

10.

Una dosis 10 veces menor o 100 veces menos de sulfato de cobre, en presencia de la dosis anteriormente indicada de ácido ascórbico, tiene una fuerte actividad virulicida y microbicida, pero no permite la obtención de una total esterilización en 10 minutos, en las condiciones experimentales determinadas.

15.

EJEMPLO 2

Si se fija en 3'32 mg/litro la dosis de sulfato de cobre utilizado, se comprueba que la dosis mínima de ácido ascórbico que se necesita para obtener la esterilización total en 10 minutos, frente a la Escherichia coli y el virus de la poliomelitis, está comprendida entre 17 y 9 mg por litro.

20.

EJEMPLO 3

Dentro de ciertos límites, es posible obtener el efecto que se pretende (esterilización en 10 minutos, en las condiciones experimentales determinadas), bien disminuyendo la dosis de ácido ascórbico pero aumentando la dosis de sulfato de cobre, - bien, por el contrario, disminuyendo la dosis de sulfato de cobre, pero aumentando la dosis de ácido ascórbico.

25.

De esta forma, utilizando la mezcla de 1 mg de sulfato de cobre y 35'2 mg de ácido ascórbico, se destruyen en 10 minu-

30.

283891



tas las bacterias introducidas, en un 94 %, pero el uso de la mezcla de 1 mg de sulfato de cobre y de 40 mg de ácido ascórbico, permite la obtención de la total esterilización en 10 minutos.

5. Inversamente, el uso de la mezcla de 2'49 mg de sulfato de cobre y de 9 mg de ácido ascórbico, no destruye totalmente la Escherichia coli en 10 minutos, mientras que se obtiene la esterilización total, si la dosis de ácido ascórbico se mantiene en 9 mg, pero la dosis de sulfato de cobre se eleva a 3 mg.

10. EJEMPLO 4

El aumento de la dosis de ácido ascórbico tiene como efecto la prolongación del tiempo en que se manifiesta la actividad microbicida y virulicida del sistema ácido ascórbico-cobre.

15. De esta forma, si se pone en un litro de agua de manantial que no contenga bacterias o virus, la dosis fija de sulfato de cobre de 3'32 mg, y por otra parte, en experimentos distintos, dosis en aumento de ácido ascórbico, y se observa la actividad microbicida actual en este agua, en los momentos más y más alejados del momento de la adición de reactivos, mediante la introducción de Escherichia coli y determinación del número de bacterias capaces de reproducirse después de 10 minutos de su presencia en este agua, se encuentra que para 9 mg de ácido ascórbico se puede obtener aún una destrucción de un 50 % aproximadamente de las bacterias, 2 horas después de la introducción de los reactivos. Para 18 mg de ácido ascórbico, se observa este efecto unas 3 horas después de haber puesto los reactivos. Para 35'2 mg de ácido ascórbico, unas 5 horas después de haber puesto los reactivos.

283891



EJEMPLO 5

La presencia de materias orgánicas en el agua, para enfrentarse a los radicales libres, disminuye la eficacia bacteri-
cida y virulicida del sistema ácido ascórbico-cobre, pero el u-
so de 1'25 mg de sulfato de cobre y de 17'6 mg de ácido ascórbi-
co por litro, permite obtener aún la esterilización total en 10
minutos, de 100,000 Escherichia coli y de 10^6 M_{50} del virus
de la poliomeilitis, en agua de manantial conteniendo 10 mg de -
serumalbúmina por litro.

10. EJEMPLO 6

Una dosis de 1'66 mg de sulfato de cobre y de 35'2 mg de
ácido ascórbico, es una dosis media de un margen de eficacia --
conveniente para asegurar la depuración biológica de agua airea-
da, que tenga las características químicas y organolépticas de
agua potable. Esta dosis permite asegurar la destrucción total
en 10 minutos en un litro, de por lo menos 10^6 de las siguien-
tes bacterias:

- Escherichia coli
- Bacilo subtilis (formas vegetativas)
- Estreptococo fecal
- Salmonella typhi
- Salmonella paratyphi A
- Salmonella paratyphi B
- Sarcina flava
- Vibrio cólera
- Shigella disenteria
- Shigella flexneri
- Proteus vulgaris
- Estafilococo aureus

30. de 10^2 de los parásitos y virus siguientes:-

283891



Anaeba disenteria

Virus de la vacuna

de 10^7 DI_{50} de los virus siguientes:-

Virus policelítico

5. Virus de la gripe A y B

Virus de la herpes

El sistema se muestra, por consiguiente, activo sobre todas las formas vegetativas de los microorganismos estudiados hasta aquí.

10. No obstante hay que señalar que las dosis citadas anteriormente han resultado ser insuficientes para que no pudieran germinar las esporas del Bacillus subtilis.

EJEMPLO 7

15. La adición de 1.56 mg de cistina ó de 1 mg de histidina, ó de 2.79 mg de sal disódica del ácido etileno diamino tetracético (EDTA disódico, $2 H_2O$), de 2.04 mg de ácido etileno diamino tetracético ó de 2.49 mg de quelato cálcico del ácido etileno diaminotetracético ó de 2.8 mg de sal sodio de este último, es decir, concentraciones equimoleculares a las del cobre, inhibe instantáneamente y de forma definitiva, la actividad virulí-
20. oida y microbicida del sistema: ácido ascórbico-cobre, interrumpiendo el ciclo de óxido-reducción.

De estos ejemplos, resulta que el modo operatorio siguiente, es conveniente para asegurar la depuración biológica
25. de agua que presenta las características químicas y organolépticas del agua potable.

Para un litro de agua empuada, se añade simultáneamente, o de forma sucesiva, 1.56 mg de sulfato cúbrico cristalizado ($SO_4 Cu, 5H_2O$) y 35.2 mg de ácido ascórbico.

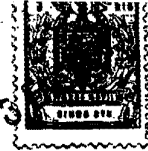
30. Una vez que se ha asegurado la completa disolución, se

283891



- espera 10 minutos, tiempo mínimo, al cabo del cual la depuración biológica del agua puede considerarse como conveniente. En este momento, se añaden, o bien 3'5 mg de sal disódica de ácido etileno diamino tetracético (EDTA disódico, $2 H_2O$), es decir una cantidad ligeramente superior a la cantidad equimolecular respecto al cobre, o bien 3'2 mg de cistina, ó 2'0 mg de histidina, dosis dobles que las necesarias para quelatar el cobre producido por la preparación; una vez que la disolución de estos productos queda asegurada, el agua es potable. Después,
5. basta con esperar más de diez minutos, antes de la adición del quelador, y la actividad depuradora se manifiesta durante varias horas. Se tendrá cuidado de prolongar esta acción tanto como sea posible, cada vez que la calidad biológica del agua se suponga que es demasiado mala.
10. No hay inconveniente en doblar la dosis de ácido ascórbico y de cobre, cuando la calidad bacteriológica del agua sea muy mala, o si parece rica en materia orgánica. En este caso, conviene igualmente doblar la dosis de quelador, en el momento de su adición, antes de consumir el agua.
15. El uso de tales dosis de cobre (0'42 mg de ion de cobre por litro) no puede provocar molestias tóxicas, incluso en el caso de un consumo excesivo de agua tratada y de un uso prolongado. Puede incluso considerarse como benéfica esta aportación suficiente de cobre, que es indispensable para el buen equilibrio fisiológico.
20. El uso de los queladores citados anteriormente en las proporciones indicadas, no presenta inconvenientes, incluso en el caso de un consumo excesivo o prolongado del agua tratada.
25. La persistencia en el agua tratada, de los productos resultantes de la auto-oxidación del ácido ascórbico, o la persis
- 30.

283891



tencia del ácido ascórbico mismo, no son inconveniente, incluso en el caso de un consumo excesivo o prolongado de este agua, y puede incluso considerarse como benéfico, en el caso de la persistencia de cierta cantidad de ácido ascórbico no transformado.

5.

Conforme a lo indicado anteriormente, se pueden someter a determinadas condiciones los preparados de uso fácil, no solamente para depurar volúmenes de agua determinados, sino también preparados destinados a estos tratamientos antisépticos externos, lavado de boca, gárgaras, colirios, lavados vaginales, etc..., y limpieza de heridas.

10.

En el caso de la asociación cobre-ácido ascórbico, las concentraciones relativas por litro, de 2'32 mg de sulfato de cobre pentahidratado, y de 70'4 mg de ácido ascórbico, han resultado ser suficientes para hacer gárgaras, cuando se trata de anginas de estreptococos.

15.

Quando se trata de utilizar externamente el sistema quelato de hierro del etileno diamina tetracetato de sodio-ácido ascórbico, las concentraciones que siguen han resultado particularmente interesantes: para un litro; Fe (II) Na₂ EDTA, 390 mg y ascorbato de sodio 792'44 mg.

20.

Bien entendido, la invención no se limita a los procedimientos descritos, los cuales se facilitan únicamente a manera de ejemplos.

25.

Se ha dicho anteriormente que la combinación resultante de la puesta en reacción, en presencia de oxígeno molecular, de un enediol y de iones de un metal de la serie de transición, presenta propiedades radiomiméticas, es decir, propiedades análogas a los efectos, sobre las células, de las radiaciones ionizantes, propiedades que se traducen en una acción citotóxica,

30

283891



- susceptibles de aplicarse ventajosamente, por vía interna, en el tratamiento de proliferaciones celulares tumorales o no, o para la destrucción activa de tejidos más particularmente sensibles, en especial de la médula ósea.
5. La acción citotóxica, radiomimética de una preparación obtenida conforme a la invención, mediante la reacción de ácido ascórbico y de iones ferrosos, en proporciones equimoleculares y en presencia de ácido etileno-diamino-tetracético o de sales de este último, se pone de manifiesto mediante los resultados de la experiencia que se exponen a continuación.
10. Las concentraciones respectivas de 1 milimola por litro para el quelato de hierro del etileno diamino tetracetato de sodio, y de 1 milimola por litro para el ascorbato de sodio, se han puesto de manifiesto como particularmente interesantes, bien 390 mg por litro para Fe (II) Na₂ EDTA y 198'11 mg por litro para el ascorbato monosódico.
15. La DL₅₀ en el ratón con 30 días para esta combinación, es de 0'59 milimola de cada uno de los constituyentes por kg. de peso, mientras que la actividad farmacológica de la asociación se manifiesta ya con dosis de cincuenta a cien veces menores. De esta manera, las propiedades radiomiméticas y radiosensibilizantes se han podido poner en evidencia in vivo en el ratón, y en especial sobre la mortalidad los alcances hematológicos y celulares.
20. - Los efectos radiomiméticos de la preparación se manifiestan en las dosis sub-letales, del orden en kilogramo de ratón, de 0'1 milimola de cada uno de los constituyentes, mediante un alcance celular que toca selectivamente las células radio sensibles y que se ha puesto en evidencia notablemente por:
25. a) una actividad leucopénica, que es máxima entre el quin-
- 30.

283891



to y el séptimo día después de la inyección parenteral de la -
preparación, y puede alcanzar el 50 % en lo concerniente al --
conjunto de los elementos de la serie blanca;

- b) una inhibición de la síntesis de los anticuerpos;
- 5. c) una disminución de la coagulabilidad sanguínea.

- Los efectos radiosensibilizantes se han demostrado en el ra-
tón, sobre una línea cuya sensibilidad es conocida, testimonien-
do los resultados siguientes obtenidos, después de una irradia-
ción de 550 - - - (rayos gamma, cobalto 60):

- 10. ratones irradiados, porcentaje de mortalidad 20
- ratones tratados e irradiados, porcentaje de mortalidad 70.

Las diferentes composiciones obtenidas conforme al pro-
cedimiento de la invención, con uso terapéutico o no, pueden -
formularse notablemente, bien en forma de polvo, con o sin adi-
15. ción de un soporte inerte, bien en forma de una solución acuosa
previamente preparada o para preparar en el momento de sumi-
nistrarla. De esta forma, en particular, la asociación ácido
ascórbico-sulfato de cobre pentahidratado, se formula ventajo-
samente en forma de polvo, partiendo del cual, se pueden prepa-
20. rar en el momento de su utilización, soluciones para lavados,
pinturas farmacéuticas e instilaciones, en el caso de aplica-
ción externa.

- 25. La combinación ácido ascórbico-etileno-diamino-tetrace-
tato ferroso, se presenta preferentemente en ampollas secas, -
precintadas o cerradas herméticamente en ausencia de oxígeno o
en solución acuosa, en particular para el uso interno.

NOTA

En resumen: la invención recae sobre las siguientes rei-
vindicações:

- 30. 1ª.- Procedimiento para la obtención de compuestos de -

283891



propiedades bactericidas, virulicidas, antiparasitarias y citotóxicas, caracterizado por la reacción de un enediol y de iones de un metal de la serie de transición, en un medio conteniendo oxígeno molecular.

5. 2ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el enediol utilizado es el ácido ascórbico, en forma de ácido libre o de sal hidrosoluble.

10. 3ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el metal transición utilizado preferentemente es el cobre o el hierro.

4ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque los iones cobre utilizados reaccionan en forma de sulfato cúprico pentahidratado cristalizado.

15. 5ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la relación molecular del enediol a los iones metálicos está entre 40/1 y 1/40 aproximadamente.

20. 6ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque se añade a la mezcla de reacción un quelador del metal utilizado, que permite, bien elevar (caso particular del hierro), bien inhibir las propiedades catalíticas (por ejemplo en el caso del cobre).

25. 7ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque los agentes de quelación utilizados para potencializar la actividad del hierro son el ácido etileno diamino tetracético, el ácido ciclohexano diamino tetracético, o sus sales y los polifosfatos.

30. 8ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el agente quelador que inhibe las propiedades catalíticas es la histidina, la cistina, la penicilamina, el ácido etileno tetracético o sus sales, en el caso de cualquier o-



283891

tro metal distinto del hierro.

9ª.- Procedimiento que comprende la depuración biológica del agua potable, caracterizado en que se mezcla al agua convenientemente aireada, ácido ascórbico y sulfato cúprico cristalizado.

5. 10ª.- Procedimiento, según la reivindicación 9ª caracteriza do porque la relación molecular del ácido ascórbico al sulfato de cobre es de 30/1 aproximadamente, utilizándose la mezcla de ácido ascórbico-sulfato cúprico, a razón de 0,2 milimolas aproximadamente por litro de ácido ascórbico.

10. 11ª.- Procedimiento, según la reivindicación 9ª, caracterizado porque el quelador de los iones de cobre se añade a la mezcla de reacción, siendo el ácido etileno-diamino-tetracético el quelador utilizado, o bien una sal de este ácido, la histidina, la cistina o la penicilamina.

15. 12ª.- PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE COMPUESTOS DE PROPIEDADES BACTERICIDAS, VIRULICIDAS, ANTIPARASITARIAS Y CITOTOXICAS.

Según se describe en esta memoria que consta de quince hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, = 3 ENE 1963

CARLOS FERRANDEZ CANDELAS

P.P.

CARLOS FERRANDEZ CANDELAS