

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 050**

51 Int. Cl.:

A61K 36/18 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)
A23L 33/115 (2006.01)
A23L 2/44 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/015 (2006.01)
A61K 31/341 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2019 PCT/IB2019/000659**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2020 WO20012242**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2019 E 19833784 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024 EP 3820493**

54 Título: **Composición para la inactivación de bacterias grampositivas y esporas bacterianas y métodos de fabricación y uso de la misma**

30 Prioridad:

10.07.2018 US 201862695867 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.12.2024

73 Titular/es:

**RESORCIX LTD. (100.0%)
The Hadassah Medical CenterHebrew University
Biotechnology Park (JBP)
Jerusalem, IL**

72 Inventor/es:

**KORCHIA-MAOR, YEHOASHUA y
SINAI, LIOR**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 993 050 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

Composición para la inactivación de bacterias grampositivas y esporas bacterianas y métodos de fabricación y uso de la misma

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

- 5 La presente solicitud reivindica prioridad a partir de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos no. 62/695867, presentada el 10 de julio de 2019.

Antecedentes

10 Las bacterias grampositivas son una amenaza potencial ya que están asociadas a enfermedades humanas y al deterioro de los alimentos. Determinados géneros de bacterias grampositivas, tales como *Bacillus* y *Clostridium*, pueden formar estructuras muy resistentes y latentes llamadas esporas. Las características únicas de las esporas las convierten en los únicos contaminantes potenciales que sobreviven y crecen en determinados alimentos procesados industrialmente, tales como los productos alimenticios pasteurizados. Por ejemplo, las esporas de *Alicyclobacillus* spp son los únicos organismos que sobreviven a la pasteurización de los zumos de fruta y que son capaces de crecer en el entorno de pH ácido de tales zumos. Además de provocar el deterioro de los alimentos, las bacterias grampositivas también pueden ser patógenas para el ser humano. 15 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y los formadores de esporas, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum*, son amenazas importantes para la industria alimentaria.

Descripción

20 Los presentes inventores han descubierto que una composición particular preparada a partir de resina obtenida de especies de la planta *Copaifera* es capaz de controlar no sólo las bacterias grampositivas en general, sino también, sorprendentemente, de controlar el crecimiento de esporas de tales bacterias. Además, a diferencia de las resinas obtenidas a partir de especies *Copaifera*, que no son adecuadas para su uso en la industria de producción de alimentos porque imparten un sabor amargo a los alimentos, las composiciones reivindicadas actualmente pueden utilizarse, por ejemplo, para controlar bacterias grampositivas, incluidas las bacterias grampositivas productoras de esporas, sin impartir dicho sabor. Esta composición, su producción y su uso se describen con más detalle a continuación. 25

30 Se ha comprobado que la composición aquí reivindicada mata bacterias grampositivas asociadas con el deterioro de los alimentos, incluidos patógenos Gram-positivos como *Listeriamonocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). También se ha observado que la composición mata bacterias grampositivas en forma de esporas. Las bacterias formadoras de esporas representan un problema especial para la industria alimentaria. Existe una clara asociación entre las bacterias del suelo formadoras de esporas y la contaminación de los alimentos. Los formadores de esporas implicados pertenecen tanto a los grupos filogenéticos de microorganismos estrictamente anaerobios ("los clostridios") como a los aerobios (el género *Bacillus* y géneros afines). Se han propuesto varias razones para explicar por qué los formadores de esporas se han convertido en un problema en la industria alimentaria, y la mayoría de las explicaciones están relacionadas con algunas características generales de las esporas: su presencia ubicua en el suelo; su resistencia al calor en procedimientos industriales comunes tales como la pasteurización; los caracteres adhesivos de determinadas esporas que facilitan su fijación a los equipos de procesado; y/o su capacidad para germinar y crecer en condiciones favorables. 35

40 Las características concertadas de las esporas y las células vegetativas de determinadas especies transmitidas por el suelo las convierten en potenciales contaminantes únicos que sobreviven y crecen en determinados alimentos procesados industrialmente. Algunos de ellos sólo se han convertido en motivo de preocupación recientemente, lo que podría ser el resultado de la creciente tolerancia, adaptación o resistencia de las esporas o células vegetativas de determinadas especies formadoras de esporas a condiciones o tratamientos que anteriormente se suponía que detenían el crecimiento (bajas temperaturas y pH bajo) o inactivaban todo el material vivo (tratamiento térmico ultraalto (UHT) y esterilización comercial). 45

50 Las bacterias formadoras de esporas causan dos tipos de problemas en la industria alimentaria. En primer lugar, pueden ser patógenos transmitidos por los alimentos, tales como *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum*. En segundo lugar, aunque estas bacterias formadoras de esporas no sean patógenas en sí mismas, pueden provocar una reducción de la vida útil y el deterioro de los alimentos. El deterioro microbiano de los alimentos suele manifestarse por cambios en la textura o la aparición de sabores extraños. Un ejemplo relevante son las esporas de *Alicyclobacillus*, un género de bacterias deteriorantes, que causan la contaminación de zumos y otros productos de bebidas que no pueden ser fácilmente contaminadas por otros microbios debido a su alto contenido en ácido. Durante las cinco décadas transcurridas desde que se aisló la primera especie de

Alicyclobacillus en 1967, el *Alicyclobacillus* se ha convertido en un importante problema para las industrias mundiales de zumos y bebidas. Estas bacterias formadoras de esporas pueden sobrevivir a los procedimientos de pasteurización utilizados comercialmente, y pueden germinar en un medio ácido. Hasta la fecha, se ha aislado este tipo de bacteria en muchos tipos de zumos y bebidas y en casi todos los segmentos de las líneas de producción de zumos y bebidas. Hoy en día, la demanda de zumos y productos de bebidas seguros y de alta calidad sigue aumentando a gran velocidad en todo el mundo. Sin embargo, con el desarrollo de los fabricantes de zumos y bebidas especialmente, la contaminación por *Alicyclobacillus* se ha convertido en una preocupación y un reto importantes. El deterioro del zumo de fruta por *Alicyclobacillus* se caracteriza por un olor característico a medicamento o antiséptico atribuido al guayacol, un subproducto metabólico de la bacteria.

5

10

15

20

Tanto las bacterias patógenas como las deteriorantes pueden estar presentes en las materias primas alimentarias, pero el tratamiento térmico tiende a reducir drásticamente la carga bacteriana. Después de la transformación, la mayoría de los alimentos corren el riesgo de volver a contaminarse antes del envasado, la distribución y el consumo final, cuando los alimentos pueden estar expuestos a agentes patógenos en el entorno de manipulación de alimentos. En el caso de los patógenos tolerantes al frío, principalmente diversas especies de *Listeria* y *Bacillus cereus*, pueden crecer en los alimentos durante su distribución y almacenamiento hasta su consumo final. Cuantos más patógenos de este tipo crezcan en un producto alimentario, mayor será el riesgo de infección entre los consumidores de dicho producto. Esto es especialmente preocupante en el caso de las carnes y los productos lácteos listos para el consumo, ya que el usuario no calienta ni procesa de nuevo estos alimentos antes de consumirlos. En estos casos, el riesgo más probable procede de especies de *Listeria* que crecen bien en refrigeración.

25

Los documentos US 2013/280392; Souza et al. *Molecules*, vol. 16, no. 11, 18 nov 2011, pp. 9611-9619; Da Trindade et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 19:1511, 18 May 2018, pp. 1-33; WO 2005/110446; Santos et al., *J. Inv. Path.*, 109:3, 17 Dec 2011, pp. 265-268; Pinto et al., *J. Br. Chem. Soc.*, 11:4, 1 Aug. 2000, pp. 355-360; y Morelli et al., *Ind. Crops and Prod.*, 70:21, March 2015, pp. 134-141, todos caracterizan diversos aceites de copaiba o sus usos, pero ninguno divulga un método de extracción que utilice una mezcla de etanol y agua, y ninguno describe una composición tal como la que se menciona en las presentes reivindicaciones.

30

La invención cuya protección se solicita se define en las reivindicaciones adjuntas. Se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, una composición en cuestión que comprende (a) ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico, ácido copálico, y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, y (b) opcionalmente, beta-cariofileno (BCP), siendo la proporción de dicho ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico, ácido copálico y ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, si están presentes, tomados en conjunto, y dicho beta-cariofileno, cuando el beta-cariofileno está presente, de al menos 1:1 en peso. En algunas realizaciones, la composición comprende ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico. En algunas realizaciones, la composición está sustancialmente libre de BCP.

35

40

En algunas realizaciones, la proporción del ácido crolequínico, el ácido hardwickiico, el ácido kolavénico, el ácido copálico y el ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, si están presentes, tomados en conjunto, con respecto al beta-cariofileno es de al menos 1.1:1, al menos 1.2:1, al menos 1.3:1, al menos 1.4:1, al menos 1.5:1, al menos 1.6:1, al menos 1.7:1, al menos 1.8:1, al menos 1.9:1, al menos 2:1, al menos 2.1:1, al menos 2.2:1, al menos 2.3:1, al menos 2.4:1, al menos 2.5:1, al menos 2.6:1, al menos 2.7, al menos 2.8, al menos 2.9:1, o al menos 3.0:1 en peso.

45

En algunas realizaciones, la proporción del ácido crolequínico, el ácido hardwickiico, el ácido kolavénico, el ácido copálico y el ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, si están presentes, tomados en conjunto, con respecto al beta-cariofileno no es superior a 100:1 en peso. En algunas realizaciones, la proporción de dicho ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico, ácido copálico y ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, si están presentes, tomados en conjunto, y dicho beta-cariofileno no es superior a 90:1, no superior a 80:1, no superior a 70:1, no superior a 60:1, no superior a 50:1, no superior a 40:1 no superior a 30:1, no superior a 20:1, no superior a 10:1, no superior a 9:1, no superior a 8:1, no superior a 7:1, no superior a 6:1, no superior a 5:1, no superior a 4:1, o no superior a 3:1 en peso.

50

En algunas realizaciones, el ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico constituye al menos el 7 % en peso de la cantidad de ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico tomados en conjunto. En algunas realizaciones, el ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico constituye al menos el 10 % en peso de la cantidad de ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico tomados en conjunto.

En algunas realizaciones, la composición es activa contra las esporas de *Alicyclobacillus*.

55

En algunas realizaciones, la composición está sustancialmente libre de hexano y diclorometano.

También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, un método de preparación de una composición como se ha mencionado anteriormente, cuya composición tiene, en relación con la concentración de ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico tomados juntos en la resina de copaiba obtenida de *Copaifera*, una concentración reducida de beta-cariofileno (BCP), comprendiendo el método extraer la resina obtenida de *Copaifera* con una mezcla de agua y etanol, y recoger la fracción superior obtenida de la extracción, con lo que se obtiene la composición. En algunas realizaciones, la composición es activa contra las esporas de *Alicyclobacillus*.

En algunas realizaciones, la resina de copaiba se obtiene de *Copaifera officinalis*.

En algunas realizaciones, la composición es activa contra las esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

En algunas realizaciones, la proporción entre etanol y agua en la mezcla es de al menos 1:1 en peso. En algunas realizaciones, la proporción entre etanol y agua en la mezcla es de al menos 1.1:1, al menos 1.2:1, al menos 1.3:1, al menos 1.4:1, al menos 1.5:1, al menos 1.6:1, al menos 1.7:1, al menos 1.8:1, al menos 1.9:1, al menos 2:1, al menos 2.1:1, al menos 2.2:1, al menos 2.3:1, al menos 2.4:1, al menos 2.5:1, al menos 2.6:1, al menos 2.7:1, al menos 2.8:1, al menos 2.9:1, o al menos 3:1 en peso.

En algunas realizaciones, la proporción de etanol a agua en la mezcla no es mayor que 4:1, no mayor que 3.9:1, no mayor que 3.8:1, no mayor que 3.7:1, no mayor que 3.6:1, no mayor que 3.5:1, no mayor que 3.4:1, no mayor que 3.3:1, no mayor que 3.2:1, o no mayor que 3.1:1 en peso.

En algunas realizaciones, la mezcla de etanol y agua contiene NaOH en una concentración de 0.01 a 0.125 molar. En algunas realizaciones la concentración de NaOH es de al menos 0.02 M, al menos 0.03 M, al menos 0.04 M, al menos 0.05 M, al menos 0.06 M, al menos 0.07 M, al menos 0.08 M, al menos 0.09 M, al menos 1.0 M, al menos 1.1 M o al menos 1.2 M.

En algunas realizaciones, la mezcla de etanol y agua contiene HCl en una concentración de 0.01 a 0.25 molar. En algunas realizaciones, la concentración de HCl es de al menos 0.1 molar, al menos 0.2 molar, al menos 0.3 molar, al menos 0.4 molar, al menos 0.5 molar, al menos 0.6 molar, al menos 0.7 molar, al menos 0.8 molar, al menos 0.9 molar, al menos 1.0 molar, al menos 1.1 molar, al menos 1.2 molar o al menos 0.125 molar.

En algunas realizaciones, la proporción entre la mezcla de etanol y agua y la resina copaiba es de al menos 3:1 en peso.

En algunas realizaciones, la proporción entre la mezcla de etanol y agua y la resina copaiba es de al menos 3.5:1, al menos 4:1, al menos 4.5:1, al menos 5:1, al menos 5.5:1 o al menos 6:1 en peso.

En algunas realizaciones, el método comprende además la eliminación de al menos parte del agua y el etanol de la fracción superior recogida.

En algunas realizaciones, la fracción superior contiene ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico, ácido copálico y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, y la proporción de dicho ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico (cuando está presente), ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico, tomados en conjunto, y dicho BCP en dicha fracción superior es de al menos 1:1 en peso. En algunas realizaciones, la proporción de dicho ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico, tomados en conjunto, con respecto a dicho BCP en dicha fracción superior es de al menos 1.1:1, al menos 1.2:1, al menos 1.3:1, al menos 1.4:1, al menos 1.5:1, al menos 1.6:1, al menos 1.7:1, al menos 1.8:1, al menos 1.9:1, al menos 2:1, al menos 2.1:1, al menos 2.2:1, al menos 2.3:1, al menos 2.4:1 o al menos 2.5:1 en peso.

En algunas realizaciones, el método comprende además separar por cromatografía el BCP residual de los diterpenos presentes en la fracción superior y recoger los diterpenos.

También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, un método para preparar una composición que es activa contra las esporas de *Alicyclobacillus* y tiene una concentración reducida de beta-cariofileno (BCP) en relación con la concentración de BCP en la resina de copaiba obtenida de *Copaifera*, el método comprende extraer la resina obtenida de *Copaifera* con una mezcla de agua y etanol, y recoger la fracción superior obtenida de la extracción. En este contexto, el término "activo contra las esporas de *Alicyclobacillus*" significa que, cuando se agrega a una concentración de 5 µg/ml a una muestra de zumo de manzana que tenga una turbidez no mayor que 1 unidad nefelométrica de turbidez (NTU), medida de acuerdo con la norma 180.1 de la EPA (publicado en agosto de 1993), y que contenga 10⁴ esporas de *Alicyclobacillus*/ml, y mantenida después a 37 °C, la composición impide el rebrote de *Alicyclobacillus* durante al menos cuatro días, determinado por medición de la densidad óptica a 600 nm.

En algunas realizaciones, la resina de copaiba se obtiene de *Copaifera officinalis*.

En algunas realizaciones, la composición es activa contra las esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

En algunas realizaciones, la proporción entre etanol y agua en la mezcla es de al menos 1:1 en peso. En algunas realizaciones, la proporción entre etanol y agua en la mezcla es de al menos 1.1:1, al menos 1.2:1, al menos 1.3:1, al menos 1.4:1, al menos 1.5:1, al menos 1.6:1, al menos 1.7:1, al menos 1.8:1, al menos 1.9:1, al menos 2:1, al menos 2.1:1, al menos 2.2:1, al menos 2.3:1, al menos 2.4:1, al menos 2.5:1, al menos 2.6:1, al menos 2.7:1, al menos 2.8:1, al menos 2.9:1, o al menos 3:1 en peso.

En algunas realizaciones, la proporción entre etanol y agua en la mezcla no es mayor que 4:1, no mayor que 3.9:1, no mayor que 3.8:1, no mayor que 3.7:1, no mayor que 3.6:1, no mayor que 3.5:1, no mayor que 3.4:1, no mayor que 3.3:1, no mayor que 3.2:1, o no mayor que 3.1:1 en peso.

En algunas realizaciones, la mezcla de etanol y agua contiene NaOH en una concentración de 0.01 a 0.125 molar. En algunas realizaciones la concentración de NaOH es de al menos 0.02 M, al menos 0.03 M, al menos 0.04 M, al menos 0.05 M, al menos 0.06 M, al menos 0.07 M, al menos 0.08 M, al menos 0.09 M, al menos 1.0 M, al menos 1.1 M o al menos 1.2 M.

En algunas realizaciones, la mezcla de etanol y agua contiene HCl en una concentración de 0.01 a 0.25 molar. En algunas realizaciones, la concentración de HCl es de al menos 0.1 molar, al menos 0.2 molar, al menos 0.3 molar, al menos 0.4 molar, al menos 0.5 molar, al menos 0.6 molar, al menos 0.7 molar, al menos 0.8 molar, al menos 0.9 molar, al menos 1.0 molar, al menos 1.1 molar, al menos 1.2 molar o al menos 0.125 molar.

En algunas realizaciones, la proporción entre la mezcla de etanol y agua y la resina copaiba es de al menos 3:1 en peso.

En algunas realizaciones, la proporción entre la mezcla de etanol y agua y la resina copaiba es de al menos 3.5:1, al menos 4:1, al menos 4.5:1, al menos 5:1, al menos 5.5:1 o al menos 6:1 en peso.

En algunas realizaciones, el método comprende además la eliminación de al menos parte del agua y el etanol de la fracción superior recogida.

En algunas realizaciones, la fracción superior contiene ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico, ácido copálico y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxiharwickiico, y la proporción de dicho ácido 7-alfa-acetoxiharwickiico (si está presente), ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico, tomados en conjunto, con respecto a dicho BCP en dicha fracción superior es de al menos 1:1 en peso. En algunas realizaciones, la proporción de dicho ácido 7-alfa-acetoxidurvíico (si está presente), ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico, tomados en conjunto, con respecto a dicho BCP en dicha fracción superior es de al menos 1.1:1, al menos 1.2:1, al menos 1.3:1, al menos 1.4:1, al menos 1.5:1, al menos 1.6:1, al menos 1.7:1, al menos 1.8:1, al menos 1.9:1, al menos 2:1, al menos 2.1:1, al menos 2.2:1, al menos 2.3:1, al menos 2.4:1 o al menos 2.5:1 en peso.

En algunas realizaciones, el método comprende además separar por cromatografía el BCP residual de los diterpenos presentes en la fracción superior y recoger los diterpenos.

También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, una composición en cuestión, preparada por extracción como se describe en el presente documento, es decir, por un método que comprende la extracción de resina obtenida de *Copaifera* con una mezcla de agua y etanol, y la recogida de la fracción superior obtenida de la extracción. En algunas realizaciones, la composición es activa contra las esporas de *Alicyclobacillus*. En algunas realizaciones, la composición tiene una concentración reducida de beta-cariofileno (BCP) en relación con la concentración de BCP en la resina de copaiba obtenida de *Copaifera*. En algunas realizaciones, la resina de copaiba se obtiene de *Copaifera officinalis*.

En algunas realizaciones, la composición es activa contra las esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

En algunas realizaciones, la proporción entre etanol y agua en la mezcla es de al menos 1:1 en peso. En algunas realizaciones, la proporción entre etanol y agua en la mezcla es de al menos 1.1:1, al menos 1.2:1, al menos 1.3:1, al menos 1.4:1, al menos 1.5:1, al menos 1.6:1, al menos 1.7:1, al menos 1.8:1, al menos 1.9:1, al menos 2:1, al menos 2.1:1, al menos 2.2:1, al menos 2.3:1, al menos 2.4:1, al menos 2.5:1, al menos 2.6:1, al menos 2.7:1, al menos 2.8:1, al menos 2.9:1, o al menos 3:1 en peso.

ES 2 993 050 T3

En algunas realizaciones, la proporción entre etanol y agua en la mezcla no es mayor que 4:1, no mayor que 3.9:1, no mayor que 3.8:1, no mayor que 3.7:1, no mayor que 3.6:1, no mayor que 3.5:1, no mayor que 3.4:1, no mayor que 3.3:1, no mayor que 3.2:1, o no mayor que 3.1:1 en peso.

5 En algunas realizaciones, la mezcla de etanol y agua contiene NaOH en una concentración de 0.01 a 0.125 molar. En algunas realizaciones la concentración de NaOH es de al menos 0.02 M, al menos 0.03 M, al menos 0.04 M, al menos 0.05 M, al menos 0.06 M, al menos 0.07 M, al menos 0.08 M, al menos 0.09 M, al menos 1.0 M, al menos 1.1 M o al menos 1.2 M.

10 En algunas realizaciones, la mezcla de etanol y agua contiene HCl en una concentración de 0.01 a 0.25 molar. En algunas realizaciones, la concentración de HCl es de al menos 0.1 molar, al menos 0.2 molar, al menos 0.3 molar, al menos 0.4 molar, al menos 0.5 molar, al menos 0.6 molar, al menos 0.7 molar, al menos 0.8 molar, al menos 0.9 molar, al menos 1.0 molar, al menos 1.1 molar, al menos 1.2 molar o al menos 0.125 molar.

En algunas realizaciones, la proporción entre la mezcla de etanol y agua y la resina copaiba es de al menos 3:1 en peso.

15 En algunas realizaciones, la proporción entre la mezcla de etanol y agua y la resina copaiba es de al menos 3.5:1, al menos 4:1, al menos 4.5:1, al menos 5:1, al menos 5.5:1 o al menos 6:1 en peso.

En algunas realizaciones, el método comprende además la eliminación de al menos parte del agua y el etanol de la fracción superior recogida.

20 En algunas realizaciones, la fracción superior contiene ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico, ácido copálico y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxiharwickiico, y la proporción de dicho ácido 7-alfa-acetoxiharwickiico (si está presente), ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico, tomados en conjunto, a dicho BCP en dicha fracción superior es de al menos 1:1 en peso. En algunas realizaciones, la proporción de dicho ácido 7-alfa-acetoxidurvíico (si está presente), ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico, tomados en conjunto, con respecto a dicho BCP en dicha fracción superior es de al menos 1.1:1, al menos 1.2:1, al menos 1.3:1, al menos 1.4:1, al menos 1.5:1, al menos 1.6:1, al menos 1.7:1, al menos 1.8:1, al menos 1.9:1, al menos 2:1, al menos 2.1:1, al menos 2.2:1, al menos 2.3:1, al menos 2.4:1 o al menos 2.5:1 en peso.

En algunas realizaciones, el método comprende además separar por cromatografía el BCP residual de los diterpenos presentes en la fracción superior y recoger los diterpenos.

30 También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, un método comprendiendo el método agregar a una bebida una composición que comprende (a) ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico, y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxidhardwickiico, y (b) opcionalmente, beta-cariofileno, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 5 unidades nefelométricas de turbidez (NTU), medida de acuerdo con el método no. 180.1 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, publicado en agosto de 1993. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 4 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 3 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 2 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 1 NTU. En algunas realizaciones, el método sirve para potenciar la eficacia de la pasteurización de la bebida. En algunas realizaciones, la composición es activa contra las esporas de *Alicyclobacillus*. En algunas realizaciones, la composición es activa contra las esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. En algunas realizaciones, la composición tiene una concentración reducida de beta-cariofileno (BCP) en relación con la concentración de BCP en la resina de copaiba obtenida de *Copaifera*. En algunas realizaciones, la resina de copaiba procede de *Copaifera officinalis*. En algunas realizaciones, la proporción del ácido 7-alfa-acetoxidarwickiico (si está presente), el ácido crolequínico, el ácido hardwickiico, el ácido kolavénico y el ácido copálico, tomados en conjunto, con respecto al beta-cariofileno, cuando el beta-cariofileno está presente, es de al menos 1:1 en peso. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida en una concentración de al menos 1.25 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida a una concentración de al menos 2.5 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida a una concentración de al menos 3.75 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida a una concentración de al menos 5.0 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida a una concentración no mayor que 5.0 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se deja en contacto con la bebida durante al menos dos días, al menos tres días, al menos cuatro días o al menos cinco días. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida antes de la pasteurización. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida después de la pasteurización. En algunas realizaciones, la

bebida es ácida. En algunas realizaciones, la bebida tiene un pH en el intervalo de 3 a 6. En algunas realizaciones, la bebida es un zumo de fruta. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de manzana. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de uva. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de melocotón. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de sandía. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de naranja claro. En algunas realizaciones, la composición es una composición como la descrita anteriormente. En algunas realizaciones, la composición se ha preparado mediante un método como el descrito antes en el presente documento.

También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, un método que comprende agregar a una bebida una composición que se ha preparado extrayendo resina *Copaifera* con una mezcla de agua y etanol, y recogiendo la fracción superior obtenida de la extracción para obtener la composición. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 5 unidades nefelométricas de turbidez (NTU), medida de acuerdo con el método no. 180.1 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, publicado en agosto de 1993. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 4 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 3 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 2 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 1 NTU. En algunas realizaciones, el método sirve para potenciar la eficacia de la pasteurización de la bebida. En algunas realizaciones, el método sirve para controlar el crecimiento de bacterias grampositivas, incluidas las esporas de bacterias grampositivas, en la bebida. En algunas realizaciones, la composición es activa contra las esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. En algunas realizaciones, la composición tiene una concentración reducida de beta-cariofileno (BCP) en relación con la concentración de BCP en la resina de copaiba obtenida de *Copaifera*. En algunas realizaciones, la resina de copaiba procede de *Copaifera officinalis*. En algunas realizaciones, la composición comprende (a) ácido crolequinico, ácido hardwickiico, ácido copálico ácido kolavénico y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, y (b) opcionalmente, beta-cariofileno. En algunas realizaciones, la proporción del ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico (si está presente), el ácido crolequinico, el ácido hardwickiico, el ácido kolavénico y el ácido copálico, tomados en conjunto, con respecto al beta-cariofileno, cuando el beta-cariofileno está presente, es de al menos 1:1 en peso. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida en una concentración de al menos 1.25 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida a una concentración de al menos 2.5 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida a una concentración de al menos 3.75 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida a una concentración de al menos 5.0 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida a una concentración no mayor que 5.0 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se deja en contacto con la bebida durante al menos dos días, al menos tres días, al menos cuatro días o al menos cinco días. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida antes de la pasteurización. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida después de la pasteurización. En algunas realizaciones, la bebida es ácida. En algunas realizaciones, la bebida es zumo de fruta. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de manzana. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de uva. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de melocotón. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de sandía. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de naranja claro. En algunas realizaciones, la composición es una composición como la descrita anteriormente. En algunas realizaciones, la composición se ha preparado mediante un método como el descrito antes en el presente documento.

También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, una bebida en un recipiente, la bebida que contiene una composición que comprende (a) ácido crolequinico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico, ácido copálico, y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, y (b) opcionalmente, beta-cariofileno, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la bebida es una bebida clara. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 5 unidades nefelométricas de turbidez (NTU), medida de acuerdo con el método no. 180.1 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, publicado en agosto de 1993. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 4 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 3 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 2 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 1 NTU. En algunas realizaciones, la composición está presente en la bebida en una concentración de al menos 1.25 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición está presente en la bebida a una concentración de al menos 2.5 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición está presente en la bebida a una concentración de al menos 3.75 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición está presente en la bebida a una concentración de al menos 5.0 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición está presente en la bebida a una concentración no mayor que 5.0 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la bebida es ácida. En algunas realizaciones, la bebida es un zumo

de fruta. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de manzana. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de uva. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de melocotón. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de sandía. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de naranja claro. En algunas realizaciones, la composición es una composición como la descrita anteriormente.

5 En algunas realizaciones, la composición se ha preparado mediante un método como el descrito antes en el presente documento.

También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, una bebida en un recipiente, conteniendo la bebida una composición preparada mediante la extracción de resina *Copaifera* con una mezcla de agua y etanol, y recogiendo la fracción superior obtenida de la extracción para obtener la composición.

10 En algunas realizaciones, la bebida es una bebida clara. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 5 unidades nefelométricas de turbidez (NTU), medida de acuerdo con el método no. 180.1 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, publicado en agosto de 1993. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 4 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 3 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 2 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 1 NTU. En algunas realizaciones, la composición comprende (a) ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico, ácido copálico y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, y (b) opcionalmente, beta-cariofileno, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición está presente en la bebida en una concentración de al menos 1.25 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición está presente en la bebida a una concentración de al menos 2.5 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición está presente en la bebida a una concentración de al menos 3.75 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición está presente en la bebida a una concentración de al menos 5.0 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición está presente en la bebida a una concentración no mayor que 5.0 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la bebida es ácida. En algunas realizaciones, la bebida es zumo de fruta. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de manzana. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de uva. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de melocotón. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de sandía. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de naranja claro. En algunas realizaciones, la composición es una composición como la descrita anteriormente. En algunas realizaciones, la composición se ha preparado mediante un método como el descrito antes en el presente documento.

20

25

30

También se proporciona, de acuerdo con una realización de la invención, un método para controlar el crecimiento de bacterias grampositivas, incluyendo esporas de bacterias grampositivas, en una bebida, que comprende agregar a la bebida una composición que comprende (a) ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico, ácido copálico, y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, y (b) opcionalmente, beta-cariofileno, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la bebida es una bebida clara. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 5 unidades nefelométricas de turbidez (NTU), medida de acuerdo con el método no. 180.1 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, publicado en agosto de 1993. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 4 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 3 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 2 NTU. En algunas realizaciones, la bebida tiene una turbidez no mayor que 1 NTU. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida en una concentración de al menos 1.25 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida a una concentración de al menos 2.5 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida a una concentración de al menos 3.75 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida a una concentración de al menos 5.0 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida a una concentración no mayor que 5.0 microgramos de composición por ml de bebida. En algunas realizaciones, la composición se deja en contacto con la bebida durante al menos dos días, al menos tres días, al menos cuatro días o al menos cinco días. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida antes de la pasteurización. En algunas realizaciones, la composición se agrega a la bebida después de la pasteurización. En algunas realizaciones, la bebida es ácida. En algunas realizaciones, la bebida es un zumo de fruta. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de manzana. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de uva. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de melocotón. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de sandía. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de naranja claro. En algunas realizaciones, el zumo de fruta es zumo de sandía. En algunas realizaciones, la composición es una composición como la descrita anteriormente. En algunas realizaciones, la composición se ha preparado mediante un método como el descrito antes en el presente documento.

35

40

45

50

55

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones de la invención se entenderán mejor en conjunción con las figuras, en las que:

5 La figura 1A muestra los perfiles de elución por HPLC de la resina de copaiba en bruto y de un extracto superior obtenido a partir de esta; la figura 1B muestra los perfiles de elución por HPLC de los extractos superior e inferior obtenidos a partir de esta;

La figura 2 muestra un perfil de elución por HPLC para un extracto obtenido a partir de resina de copaiba;

La figura 3 muestra los perfiles de elución por HPLC para el extracto obtenido de la resina de copaiba a valores de pH crecientes;

10 La figura 4 muestra los perfiles de elución por HPLC para el extracto obtenido de la resina de copaiba a valores de pH decrecientes;

La figura 5 muestra un perfil de elución por HPLC para un extracto obtenido a partir de resina de copaiba, con los siete picos principales etiquetados 1-7;

La figura 6 muestra un espectrograma de masas del material correspondiente al pico 3 de la figura 5;

15 La figura 7 muestra un espectrograma de masas para el material correspondiente al pico 3 de la figura 5, tras la metilación;

La figura 8 muestra un espectrograma de masas de un material correspondiente al pico 4 de la figura 5, tras la metilación;

La figura 9 muestra un espectrograma de masas de un material correspondiente al pico 4 de la figura 5, tras la metilación;

20 La figura 10 muestra un espectrograma de masas para el material correspondiente al pico 6 de la figura 5, tras la metilación;

La figura 11 muestra un espectrograma de masas para el material correspondiente al pico 7 de la figura 5, tras la metilación;

25 La figura 12 muestra un espectrograma de masas para el material correspondiente al pico 7 de la figura 5, tras la metilación;

La figura 13 muestra el efecto de la fracción 1 sobre el crecimiento de cuatro cepas bacterianas formadoras de esporas, medido por densidad óptica a 600 nm;

La figura 14 muestra el efecto de la fracción 1 sobre las esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo de manzana comercial, medido por densidad óptica a 600 nm;

30 La figura 15 muestra el efecto de la fracción 1 sobre la cepa DP-L861 de *Listeria monocytogenes* en medio de infusión cerebro-corazón, medido por densidad óptica a 600 nm; y

La figura 16 muestra los perfiles de elución por HPLC para extractos superiores obtenidos de diferentes fuentes de resina en bruto de copaiba.

Discusión detallada

35 Como se ha señalado, de acuerdo con una realización de la invención se proporciona un método de preparación de una composición que es activa contra las esporas de *Alicyclobacillus* y tiene una concentración reducida de beta-cariofileno en relación con la resina de copaiba obtenida de *Copaifera*. El método comprende la extracción de resina obtenida de *Copaifera* con una mezcla de agua y etanol. Por lo general, la mezcla de etanol y agua contendrá entre un 50 % y un 80 % de etanol en peso, y se utilizarán entre uno y diez volúmenes de la mezcla
40 por volumen de resina *Copaifera*. A continuación se ofrece un ejemplo de extracción. Cuando se deja que las fases se separen el tiempo suficiente (normalmente unos 20 minutos), se obtienen dos fracciones, una superior y otra inferior. Se ha comprobado que la fracción superior, a veces denominada en el presente documento "Fracción 1", mata bacterias grampositivas, incluidos patógenos bacterianos asociados a los alimentos como *Listeriamonocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, así como bacterias
45 en forma de esporas.

El análisis de la fracción 1, detallado a continuación, muestra que contiene cinco compuestos diterpénicos antibacterianos diferentes: ácido 7-alfa-acetoxiharwickiico, ácido crolequinico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico. Esto sugiere que la posibilidad de que cualquier bacteria desarrolle resistencia contra la fracción 1 es extremadamente baja. Además, se comprobó que la fracción 1 es resistente al calor, permaneciendo activa incluso tras un tratamiento térmico de 121 °C durante 15 minutos.

Debido a esta resistencia al calor, las composiciones actualmente descritas pueden agregarse a zumos de frutas y otras bebidas claras antes de la pasteurización para evitar el crecimiento de esporas que sobreviven a la pasteurización, aunque es posible agregarlas después de la pasteurización. Se ha comprobado que la mezcla de la composición en la bebida ayuda a la eficacia de la composición, y se espera que cuando se utilice a escala industrial, se empleen medios de mezcla adecuados, tanto si la composición se agrega a la bebida de forma continua, por ejemplo, a medida que la bebida pasa por un conducto, como si la composición se agrega por lotes. A menudo, cuando se preparan bebidas a escala industrial, se mezcla un concentrado de bebida en agua, a veces con ingredientes adicionales, y en lo sucesivo se pasteuriza. Una composición de acuerdo con las realizaciones de la presente invención puede agregarse a la bebida durante esta fase de mezcla, de modo que la composición se mezcle con la bebida; a los efectos presentes, la adición de la composición en esta etapa constituye la adición de la composición a la bebida, y la mezcla resultante constituye la bebida a la que se ha añadido la composición. También se apreciará que la composición puede agregarse a una gran cantidad de bebida, por ejemplo, a una cuba que contenga varios cientos o incluso miles de litros de bebida, o puede agregarse a recipientes individuales que contengan la bebida, por ejemplo, a una botella, cartón u otro envase que contenga, por ejemplo, 2000, 1000, 500, 330 o 250 ml de bebida.

A los efectos presentes, cuando se hace referencia a una bebida clara, significa que la bebida (a) tiene una turbidez no mayor que 3 unidades nefelométricas de turbidez (NTU), medida de acuerdo con el método no. 180.1 de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos, publicado en agosto de 1993.

Además de los zumos de fruta claros, tales como el zumo de manzana claro, el zumo de uva claro, el zumo de melocotón claro y el zumo de sandía claro, las bebidas claras incluyen, por ejemplo, los téis helados que cumplen el criterio de turbidez y las bebidas azucaradas comercializadas actualmente en Israel como "agua de frutas". Estas bebidas suelen ser ácidas y contienen azúcar, por ejemplo fructosa, que puede servir de nutriente para las bacterias. De este modo, un ejemplo de bebida de este tipo tiene un 94 % de agua, fructosa, aromas, citrato de sodio y ácidos comestibles tales como el ácido fosfórico y el ácido cítrico.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de las realizaciones de la invención.

Ejemplo 1: extracción líquido-líquido de aceite de *Copaifera officinalis*

Las resinas de copaiba (también llamadas a veces aceites de copaiba) se producen por exudación de los troncos de árboles pertenecientes al género *Copaifera*. Las resinas tienen un olor característico a bálsamo y un sabor aromático, amargo y acre. Los estudios farmacológicos han demostrado que las resinas de copaiba tienen actividad antimicrobiana. Las resinas están compuestas principalmente por sesquiterpenos, que aportan su olor y sabor característicos, y diterpenos, que poseen la actividad antimicrobiana. El sesquiterpeno, beta-cariofileno, es la molécula más abundante en las resinas de Copaiba, constituyendo aproximadamente el 40 % en peso de las resinas. En los presentes ejemplos se utilizó resina obtenida de *Copaifera officinalis* cultivada en el norte de Brasil, en los estados de Acre (AC), Amazonas (AM), Pará (PA) y Rondonia (RO).

Se mezcló una mezcla de etanol al 75 % en agua con resina de copaiba en bruto obtenida de *Copaifera officinalis*, en una proporción 5:1 entre etanol/agua y resina de copaiba p/p, durante 20 minutos. La mezcla resultante se dejaba reposar hasta que se formaban dos fases distintas; normalmente era suficiente un periodo de dos a doce horas. La fase inferior tenía un color amarillo similar al del aceite de copaiba en bruto, y la fase superior (denominada en lo que sigue "fracción 1") era clara e incolora. Como se explicará más adelante, en relación con la resina en bruto, la fracción 1 está enriquecida en diterpenos y contiene cantidades relativamente bajas de sesquiterpenos. La eliminación del etanol y el agua de la fracción 1 indicó que se recuperaron unos 250 mg de material por cada gramo de resina en bruto utilizada.

Se obtuvieron resultados similares con un procedimiento a escala: se extrajeron 1000 g de resina de *Copaifera officinalis* utilizando 5 litros de etanol al 75 % en agua, mezclando los líquidos durante 30 minutos y dejándolos reposar durante varias horas para lograr la separación de fases. La eliminación de los disolventes de la fase superior produjo 25 g de material.

Se obtuvieron resultados similares con resina de copaiba obtenida de otras fuentes de *Copaifera*.

Ejemplo 2:

Las muestras de la resina de copaiba en bruto, fracción 1, y la fracción inferior (10 mg/ml) se sometieron cada una a cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) utilizando un sistema Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific) y una columna Phenomenex C-18 (4.6 x 250 mm) Luna. Las muestras se disolvieron en acetonitrilo al 90 % en agua con ácido fosfórico al 1 % y se inyectaron a un caudal de 1 ml/min. La temperatura de la columna fue de 22 °C y la detección se realizó a 210 nm. Las condiciones finales utilizadas para la HPLC analítica fueron las siguientes:

Tiempo	% de 90 % de acetonitrilo en agua con 1 % de ácido fosfórico	% Agua
0	100	0
20 min	90	10
70 min	90	10

Los resultados, presentados en la figura 1, mostraron que, en relación con la resina en bruto y en relación con la fracción inferior, la fracción 1 estaba enriquecida en materiales que eluían en los primeros 20 minutos, y era más pobre en materiales que eluían en lo sucesivo. En ésta y en todas las demás figuras que muestran los perfiles de elución, los números a lo largo de los ejes indican el tiempo en minutos.

El perfil de elución para el material obtenido en la extracción a escala descrita anteriormente fue sustancialmente el mismo, como se muestra en la figura 2.

La figura 16 muestra el perfil de elución de HPLC para fases superiores obtenidas bajo las mismas condiciones de extracción y condiciones de HPLC que las usadas para *Copaifera officinalis*, después extraídas de resina de otras especies de *Copaifera*.

Ejemplo 3: Efectos del pH

Se descubrió que el aumento del pH de la mezcla de extracción mediante la adición de NaOH, hasta una concentración de 0.125 molar de NaOH, aumentaba el rendimiento de la fracción 1, manteniendo al mismo tiempo un perfil de elución RP-HPLC similar en las condiciones descritas en el ejemplo 2, como se muestra en la figura 3.

La disminución del pH de la mezcla de extracción mediante la adición de HCl, hasta una concentración de 0.25 molar de HCl, también aumentó el rendimiento de la fracción 1, y disminuyó significativamente la presencia de beta-cariofileno en la misma, como se muestra en el perfil de elución de RP-HPLC obtenido en las condiciones descritas en el ejemplo 2, que se muestra en la figura 4.

Ejemplo 4: Identificación de los componentes principales de la fracción 1

Los siete componentes principales de la fracción 1 (véase la figura 5) fueron identificados como sigue:

En primer lugar, se recogió una cantidad de cada componente de la fracción 1 mediante RP-HPLC semipreparativa, utilizando un sistema Dionex UltiMate 3000 y una columna Phenomenex C-18 (10 x 250 mm) Luna. Cada muestra se disolvió en acetonitrilo al 90 % en agua con ácido fórmico al 0.05 % y se inyectó a un caudal de 5 ml/min. La temperatura de la columna fue de 22 °C y la detección se realizó a 210 nm. Las condiciones finales utilizadas para la HPLC semipreparativa fueron las siguientes:

Tiempo	% de 90 % de acetonitrilo en agua con 0.05 % de ácido fórmico	% de Agua
0	100	0
20 min	90	10
70 min	90	10

A continuación, cada fracción recogida se purificó mediante RP-HPLC como se describe en el ejemplo 2. Se comprobó la actividad de las siete fracciones contra las esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, tal como se describe a continuación. A continuación, se identificaron los compuestos de las cuatro fracciones más activas mediante espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (RMN):

- 5 Pico 3: El compuesto aislado se sometió a espectrometría de masas (MS), que mostró un componente principal con una proporción masa/carga (m/z) de 397.15 $[M+Na]^+$ (véase la figura 6). Según la masa exacta, 374.22 g/mol, la fórmula molecular se predijo como $C_{22}H_{30}O_6$.

- 10 Tras la metilación del compuesto con trimetilsilildiazometano (TMS-diazometano, procedimiento descrito por *Hashimoto et al., Chem. Pharm. Bull.* 1981, 29, 1475-1478), el compuesto metilado se sometió a cromatografía de gases-MS (GC-MS). El análisis del patrón de fragmentación MS/MS mostró un pico menor con m/z 388.22 (correspondiente a la molécula metilada) y un pico hijo con m/z 346.21 (véase la figura 7).

El análisis de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear 1H - ^{13}C y bidimensional (2D-RMN) del ácido libre (véase la siguiente tabla, que presenta los resultados de la ^{13}C -RMN) permitió determinar la estructura de la molécula. El compuesto aislado resultó ser el ácido 7- α -acetoxihardwickiico.

Posición	^{13}C RMN δ_c (ppm)	J	Posición	^{13}C RMN δ_c (ppm)	J
1	17.3		13	125.29	
2	27.45		14	111.06	6.28 s
3	140.15	6.88 d	15	143.00	7.23 s
4	141.46		16	138.59	7.38 s
5	36.97		17	12.17	0.96 s
6	38.26		18	21.63	
7	74.75	5.23	19	170.72	1.47 s
8	38.49		20	19.73	1.05 s
9	39.27		CO ₂ Me	169.83	2.1 s
10	46.53		MeCO ₂	22.27	
11	39.63		Disolvente (CDCl ₃)	77.16	
12	18.52				

15

Pico 4:

- 20 El material de esta fracción se metiló con TMS-diazometano. El análisis por GC-MS (condiciones descritas a continuación, aplicables a éste y a los otros ejemplos en el presente documento) del material metilado mostró que este pico aislado de HPLC contiene de hecho dos compuestos. El primer pico del cromatograma GC-MS (tiempo de retención 26.9 min) tenía el siguiente patrón de fragmentación: m/z 332, 273, 237, 205, 177, 96 (véase la figura 8); este patrón de fragmentación es coherente con el éster metílico del ácido crolequinico. El segundo pico se detectó a los 27.1 min y mostró el siguiente patrón de fragmentación: m/z 330, 283, 235, 203, 139, 96 (véase la figura 9). Por comparación con los espectros de la base de datos del Instituto Nacional de Normas y Tecnología, este compuesto se identificó como hardwickiato de metilo, el éster metílico del ácido hardwickiico. Además, según las masas exactas de los dos ésteres metílicos correspondientes, 332.2346 g/mol y 330.2189 g/mol, las fórmulas moleculares previstas de los compuestos metilados eran respectivamente $C_{21}H_{32}O_3$ y $C_{21}H_{30}O_3$. Las estructuras predichas para los ácidos libres se confirmaron mediante 1H , ^{13}C y 2D-RMN, véase la siguiente tabla, que proporciona datos para una mezcla de ácido crolequinico y ácido hardwickiico en una proporción molar aproximada de 3:7.
- 25

Posición	¹³ C RMN δ _c (ppm)	¹ H RMN δ _H (ppm)	Posición	¹³ C RMN δ _c (ppm)	¹ H RMN δ _H (ppm)
1	17.6	1.30-1.82	12	18.33	2.12-2.27 2.27-2.37
2	27.64	2.12-2.27 2.27-2.37	13	125.73	
3	140.31	6.85	14	111.14	6.26
4	141.36		15	142.88	7.35
5	37.75		16	138.54	7.20
6	35.96	2.43, 1.17	17	16.18	0.84
7	27.42	1.30-1.82	18	170.80	
8	36.40	1.30-1.82	19	20.6	1.26
9	38.96		20	18.44	0.76
10	46.82	1.30-1.82	Disolvente (CDCl ₃)	77.16	7.26
11	38.76	1.30-1.82			

De este modo, la fracción aislada perteneciente al pico 4 contiene una mezcla de ácido crolequínico y ácido hardwickiico en una proporción entre aproximadamente 1:2 respectivamente.

- 5 Cromatógrafo de gases: Agilent GC 7890B, entrada de muestra GC (fuente de inyección muestreador PAL, tamaño de inyección 1 microlitro), temperatura del horno inicial 50 °C, tiempo de mantenimiento 3 min, subida 10 °C/minuto a 280 °C, tiempo de mantenimiento 10 min, subida 20 °C/minuto a 300 °C, tiempo de mantenimiento 7 min, modo de entrada SS split, gas portador helio, calentador 250 °C, proporción split 10:1, flujo split 10 ml/min, temperatura de la línea de transferencia 280 °C, Agilent DB-5ms DuraGuard 30 m x 250 micrómetros x 0.25 micrómetros (+ 10 m de protector), flujo 1 ml/min.
- 10 Espectrometría de masas: Espectrómetro Agilent 7200 Q-TOF, modo de ionización EI, temperatura de la fuente 230 °C, energía EI 70 eV, temperatura del cuadrupolo 150 °C, retardo del disolvente 5 min, intervalo de masas 40-700 amu, tasa de adquisición 5 espectros/segundo, umbral 100 recuentos.

Pico 6:

- 15 La fracción correspondiente al pico 6 se metiló utilizando TMS-diazometano. El análisis GC-MS del compuesto metilado dio como resultado un patrón de fragmentación MS que mostraba un ion molecular a m/z 318 correspondiente a la fórmula C₂₁H₃₄O₂ (véase la figura 10). Análisis de los espectros ¹H-¹³C y 2D-RMN (véase tabla a continuación) del compuesto no metilado, y comparación con los valores reportados en la literatura (Pacheco, *Molecules* 2009, 14(3), pp.1245- 1262; Salah, *J. Agr. & Food Chem.* 2003, 51(26), pp.7607-7610) indicaron que el compuesto aislado era ácido kolavénico.

Posición	¹ H RMN δ _H (ppm)	¹³ C RMN δ _c (ppm)	¹³ C RMN δ _c (ppm), Ref ⁽²⁾	¹³ C RMN δ _c (ppm), Ref ⁽³⁾
Disolvente	CDCl ₃	CDCl ₃	CDCl ₃	CDCl ₃
1		18.45	17.3	18.7
2		27.59	27.5	27.3

3	5.19 (t)	120.55	120.5	120.8
4		144.61	144.5	144.8
5		38.91	38.3	38.6
6		36.4	36.4	37.2
7		27.02	26.9	27.8
8		36.4	36.4	36.7
9		38.33	38.4	39.2
10		46.62	46.6	46.9
11		35.03	35.0	35.3
12		36.91	36.9	36.7
13		/	164.4	164.9
14	5.7 (s)	/	114.9	115.1
15		/	172.0	171.9
16	2.17 (s)	19.57	19.5	19.8
17	0.81 (d)	16.1	15.9	16.3
18	1.59 (s)	18.14	18.3	18.3
19	1.00 (s)	20.08	20.0	20.3
20	0.73 (s)	18.43	17.9	18.6

Pico 7:

La fracción correspondiente al pico 7 se metiló utilizando TMS-diazometano. El análisis GC-MS del compuesto metilado dio como resultado un patrón de fragmentación MS que mostraba un ion molecular a m/z 318.25 (véase la figura 11) que sugería la fórmula molecular $C_{21}H_{34}O_2$. Por comparación del patrón de fragmentación con los datos del NIST, se determinó que correspondía a copalato de metilo, el éster metílico del ácido copálico. Este resultado se confirmó mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). El patrón de fragmentación mostró un pico principal con un m/z 607 correspondiente al dímero desprotonado del ácido copálico (véase la figura 12).

10 Ejemplo 5: Comparación de las cantidades relativas de componentes en la resina de copaiba en bruto y en la fracción 1

Utilizando RP-HPLC analítica como se describió anteriormente, y utilizando el software Chromeleon 7.0 (Thermo Fisher Scientific) para calcular las áreas bajo la curva para los picos, se encontraron las siguientes cantidades relativas de cada uno de los cinco ácidos enumerados anteriormente y beta-cariofileno, aunque se apreciará que estos números proporcionan sólo una aproximación para las cantidades relativas de estos seis componentes:

Compuesto	% de oleoresina de copaiba en bruto	% de la fracción 1
Ácido 7- α -acetoxihardwickiico	1.02	3.65
Ácido hardwickiico + ácido crolequínico	2.79	6.03
Ácido kolavénico	4.14	6.89
Ácido copálico	9.07	15.51
beta cariofileno	33.94	12.58

Se apreciará que, en vista de la presente divulgación, la RP-HPLC puede utilizarse para determinar la idoneidad de una muestra dada de resina Copaifera para la extracción con el fin de obtener una composición como la descrita en el presente documento.

Ejemplo 6: análisis de las fracciones recogidas en el ejemplo 4

5 Las fracciones recogidas en el ejemplo 4, así como la fracción 1 y la nisina, un conservante actualmente de uso común en la industria, fueron sometidas a pruebas de actividad incubándolas durante los tiempos indicados en la siguiente tabla con *Alicyclobacillus acidoterrestris* (número de catálogo JCM 21547, Colección de Cultivos IAM no. 15086) en zumo de manzana. La concentración inhibitoria mínima (MIC) se determinó mediante mediciones de la densidad óptica a 600 nm y mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (CFU) de la siguiente manera: tras cuatro días de incubación a 37 °C, las muestras de zumo se diluyeron en serie en incrementos de 10 veces (10 veces, 100 veces, 1000 veces, etc.) y se sembraron en agar de dextrosa de patata (PDA). Las placas se incubaron a 45 °C durante al menos 48 horas y se contaron las colonias para determinar las CFU/ml. La MIC encontrada se indica en la tabla.

Muestra	MIC (µg/ml) en zumo de manzana 100 % 2 días de incubación	MIC (µg/ml) en zumo de manzana 100 % 3 días de incubación	MIC (µg/ml) en zumo de manzana 100 % 5 días de incubación	MIC (µg/ml) en zumo de manzana al 100 % 7 días de incubación
Fracción 1	1.25	1.25	1.25	1.25
1	5	5	5	5
2	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
3	2.5	5	5	5
4	1.25	1.25	1.25	1.25
5	5	5	5	5
6	1.25	1.25	1.25	1.25
7	1.25	1.25	1.25	1.25
Nisin	10	10	Sin actividad	Sin actividad

15 **Ejemplo 7**

La fracción 1 se probó contra cuatro cepas bacterianas formadoras de esporas: *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis* (PY79). Se provocó la revivificación de las esporas de estas cepas (10⁴ esporas/ml) inoculándolas en caldo Luria-Bertani (LB) a 37 °C. Al cabo de una hora, se añadió la fracción 1 en una concentración de 5 µg de fracción 1 por ml de caldo. La absorbancia a una densidad óptica de 600 nm (OD600) representa el crecimiento. En la figura 13 se puede observar que, en comparación con las esporas no tratadas (control), las esporas tratadas fueron eliminadas por la fracción 1, como indica la disminución de la OD600.

Ejemplo 8

25 La fracción 1 se probó contra esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (JCM 21547) en zumo de manzana comercial. El zumo se suplementó con la fracción 1 a una concentración de 5 µg/ml, se contaminó agregando 10⁴ de esporas/ml y se incubó a 37 °C. La fracción 1 bloqueó el crecimiento de las esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, tal como indica la medición de la OD600 a lo largo de siete días (véase la figura 14).

En comparación, la resina en bruto de copaiba de la que se derivó la fracción 1 alcanzó un nivel similar de actividad sólo a una concentración de 20 microgramos/ml.

Las fracciones mostradas en la figura 16 fueron probadas de manera similar y se encontró que todas tenían actividad contra *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

También se probó la actividad de la fracción 1 contra *Alicyclobacillus acidoterrestris* en otras bebidas claras y resultó ser activa.

5 **Ejemplo 9**

La fracción 1 se probó contra la cepa DP-L861 de *Listeria monocytogenes* en medio de infusión de cerebro y corazón a 4 °C. El cultivo se diluyó en una OD600 de 0.05 y se trató con la fracción 1 a una concentración de 15 µg/ml y se incubó a 4 °C durante 7 días. La fracción 1 bloqueó el crecimiento de *Listeria monocytogenes* a temperatura de refrigeración, según determinaron las mediciones de OD600, véase la figura 15.

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición en cuestión que comprende (a) ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico, ácido copálico y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxiharwickiico, y (b) beta-cariofileno (BCP), la proporción de dicho ácido crolequínico, el ácido crolequínico, el ácido hardwickiico, el ácido kolavénico, el ácido copálico y el ácido 7-alfa-acetoxiharwickiico, si están presentes, tomados en conjunto, con respecto a dicho beta-cariofileno, cuando el beta-cariofileno está presente, sea de al menos 1.1:1 en peso, y la composición está sustancialmente libre de hexano y diclorometano.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la proporción del ácido crolequínico, el ácido hardwickiico, el ácido kolavénico, el ácido copálico y el ácido 7-alfa-acetoxiharwickiico, si están presentes, tomados en conjunto, con respecto al beta-cariofileno es de al menos 1.2:1 en peso.
3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la proporción del ácido crolequínico, el ácido hardwickiico, el ácido kolavénico, el ácido copálico y el ácido 7-alfa-acetoxiharwickiico, si están presentes, tomados en conjunto, con respecto al beta-cariofileno no es superior a 100:1 en peso.
4. Un método de preparación de una composición, comprendiendo el método la extracción de resina obtenida de *Copaifera* con una mezcla de agua y etanol, y la recogida de la fracción superior obtenida de la extracción, y, opcionalmente, la eliminación de al menos parte del agua y el etanol de la fracción superior recogida, con lo que se obtiene la composición.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la resina de copaiba se obtiene de *Copaifera officinalis*.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en el que (1) la proporción del etanol a agua en la mezcla es (a) al menos 1:1, en peso, y/o (b) no más de 4:1 en peso; (2) la mezcla de etanol y agua contiene (a) NaOH en una concentración de 0.01 a 0.125 molar, o (b) HCl en una concentración de 0.01 a 0.25 molar; y/o (3) la proporción de la mezcla de etanol y agua a resina copaiba es al menos 3:1 en peso.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la fracción superior contiene ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico, ácido copálico y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxiharwickiico, y la proporción de dicho ácido 7-alfa-acetoxiharwickiico (cuando está presente), ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico, tomados en conjunto, con respecto a dicho BCP en dicha fracción superior es de al menos 1.1:1 en peso.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la composición es una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición tiene, en relación con la concentración de ácido 7-alfa-acetoxiharwickiico, ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico tomados en conjunto en la resina de copaiba obtenida de *Copaifera*, una concentración reducida de beta-cariofileno (BCP).
9. Una composición en cuestión, preparada por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.
10. Un método, que comprende agregar a una bebida una composición que (i) comprende (a) ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico y ácido copálico, y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxiharwickiico, y (b) beta-cariofileno, y/o (ii) se ha preparado extrayendo resina *Copaifera* con una mezcla de agua y etanol, y recogiendo la fracción superior obtenida de la extracción para obtener la composición.
11. El método de la reivindicación 10, en el que la composición es una composición como se recita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 9 y/o ha sido preparada por un método un método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.
12. El método de la reivindicación 10 u 11, en el que al menos uno de los siguientes es cierto: (a) la bebida tiene una turbidez no mayor que 5 unidades nefelométricas de turbidez (NTU), no mayor que 4 NTU, no mayor que 3 NTU, no mayor que 2 NTU, o no mayor que 1 NTU, medida de acuerdo con el método no. 180.1 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, publicado en agosto de 1993; (b) el método sirve para potenciar la eficacia de la pasteurización de la bebida y/o para controlar el crecimiento de bacterias grampositivas, incluidas las esporas de bacterias grampositivas, en una bebida; (c) la composición se agrega a la bebida en una concentración de al menos 1.25 microgramos de composición por ml de bebida; (d) la composición se deja en contacto con la bebida durante al menos dos días; (e) la bebida tiene un pH en el intervalo de 3 a 6; (f) la bebida es un zumo de fruta, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en zumo de manzana, zumo de uva, zumo de melocotón, zumo de sandía y zumo de naranja claro; (f) tiene una concentración reducida de beta-cariofileno (BCP) en relación con la concentración de BCP en la resina de copaiba obtenida de *Copaifera*; (g) la composición comprende (i) ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido

copálico ácido kolavénico y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, y (ii) beta-cariofileno, y la proporción del ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico (si está presente), el ácido crolequínico, el ácido hardwickiico, el ácido kolavénico y el ácido copálico, tomados en conjunto, con respecto al beta-cariofileno, cuando el beta-cariofileno está presente, es de al menos 1.1:1 en peso.

- 5 13. Una bebida en un recipiente, la bebida que contiene una composición que (i) comprende (a) ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido kolavénico, ácido copálico y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxihardwickiico, y (b) beta-cariofileno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 9; y/o (ii) se ha preparado extrayendo resina *Copaifera* con una mezcla de agua y etanol, y recogiendo la fracción superior obtenida de la extracción para obtener la composición.
- 10 14. La bebida de la reivindicación 13, en la que se cumple al menos una de las siguientes condiciones: (a) la bebida tiene una turbidez no mayor que 5 unidades nefelométricas de turbidez (NTU), no mayor que 4 NTU, no mayor que 3 NTU, no mayor que 2 NTU, o no mayor que 1 NTU, medida de acuerdo con el método no. 180.1 de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos, publicado en agosto de 1993; (b) la composición está presente en la bebida (1) en una concentración de al menos 1.25 microgramos de composición por ml de bebida, al menos 2.5 microgramos de composición por ml de bebida, al menos 3.75 microgramos de composición por ml de bebida, o al menos 5.0 microgramos de composición por ml de bebida, y/o (2) una concentración no mayor que 5.0 microgramos de composición por ml de bebida; (c) la bebida es ácida y/o un zumo de fruta, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en zumo de manzana, zumo de uva, zumo de melocotón, zumo de sandía y zumo de naranja claro; (d) la composición se ha preparado mediante un método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11.
- 15 15. Un método para controlar el crecimiento de bacterias grampositivas, incluyendo esporas de bacterias grampositivas, en una bebida, que comprende agregar a la bebida una composición que comprende (a) ácido crolequínico, ácido hardwickiico, ácido copálico ácido kolavénico y, opcionalmente, ácido 7-alfa-acetoxidhardwickiico, y (b) beta-cariofileno; y opcionalmente donde al menos uno de los siguientes es cierto:
- 25 (1) la composición se agrega a la bebida (a) a una concentración de al menos 1.25 microgramos de composición por ml de bebida, y/o (b) a una concentración de no más de 5.0 microgramos de composición por ml de bebida; (2) se permite que la composición esté en contacto con la bebida durante al menos dos días; (3) la bebida es ácida y/o un zumo de fruta, seleccionado opcionalmente del grupo que consiste en zumo de manzana, zumo de uva, zumo de melocotón, zumo de sandía y zumo de naranja claro; (4) la bebida tiene una turbidez no mayor que 5 unidades nefelométricas de turbidez (NTU), medida de acuerdo con el método no. 180.1 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, publicado en agosto de 1993; (5) la composición (a) es una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 9 y/o (b) ha sido preparada por un método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.
- 30

FIGURA 1A

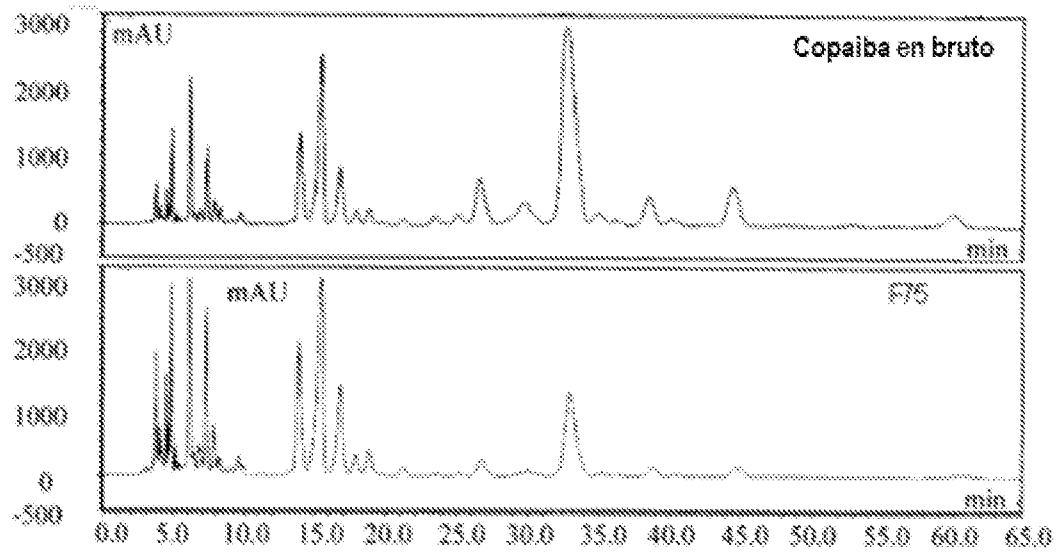


FIGURA 1B

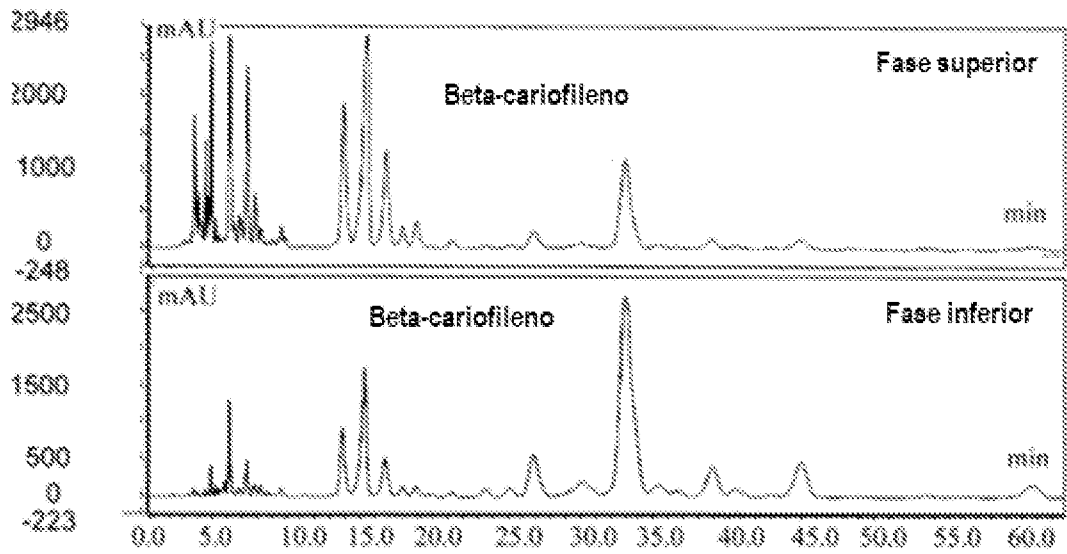


FIGURA 5

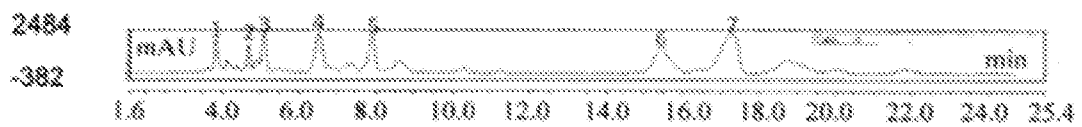


FIGURA 2

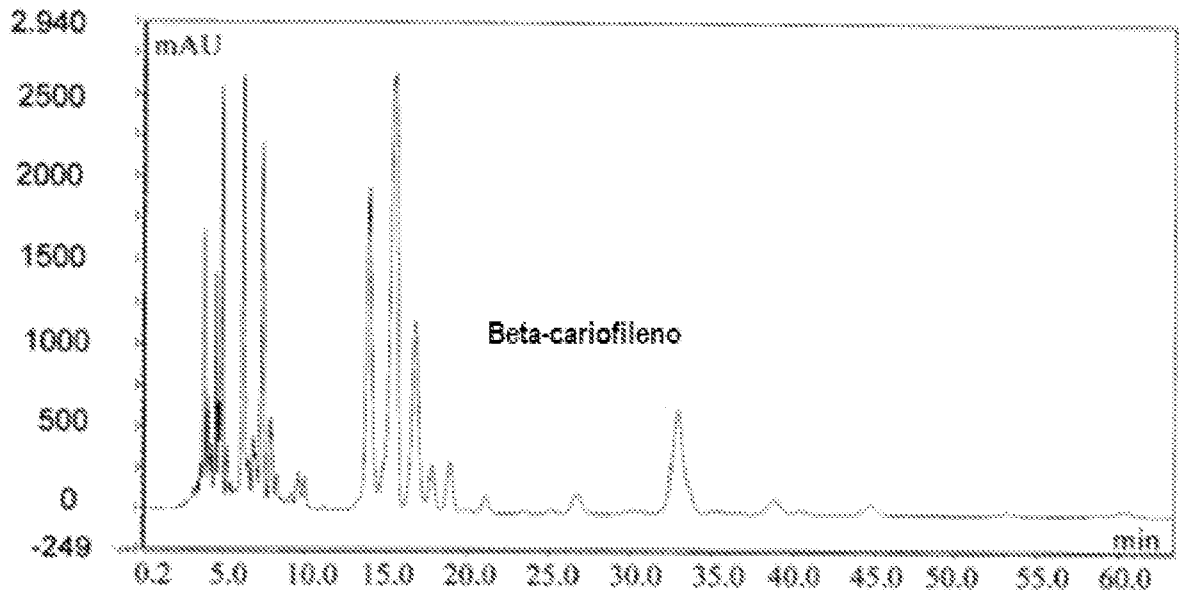


FIGURA 3

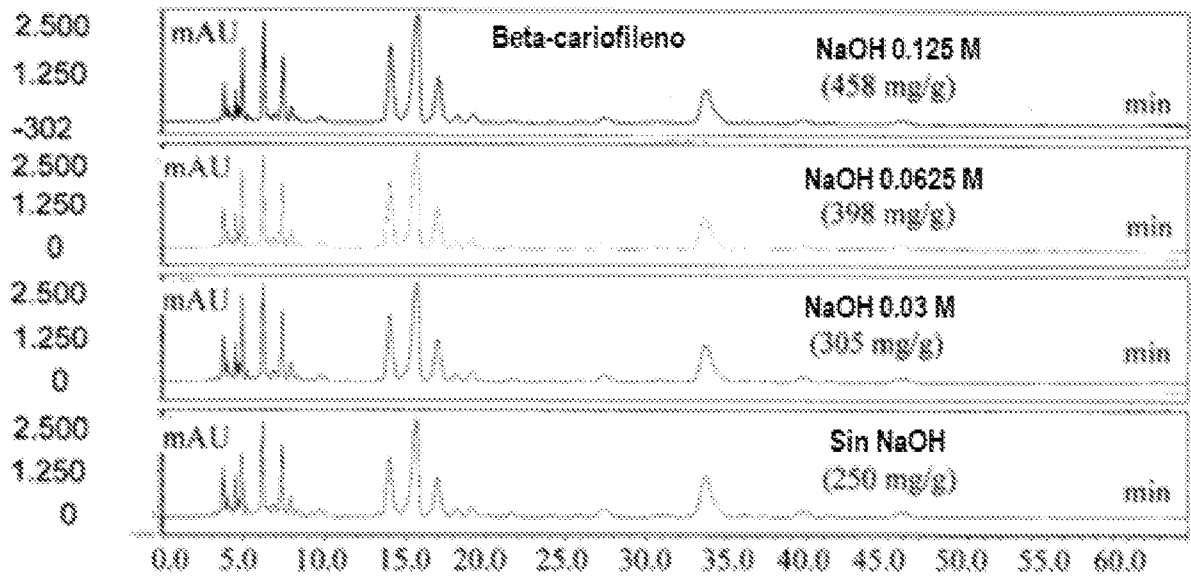


FIGURA 4

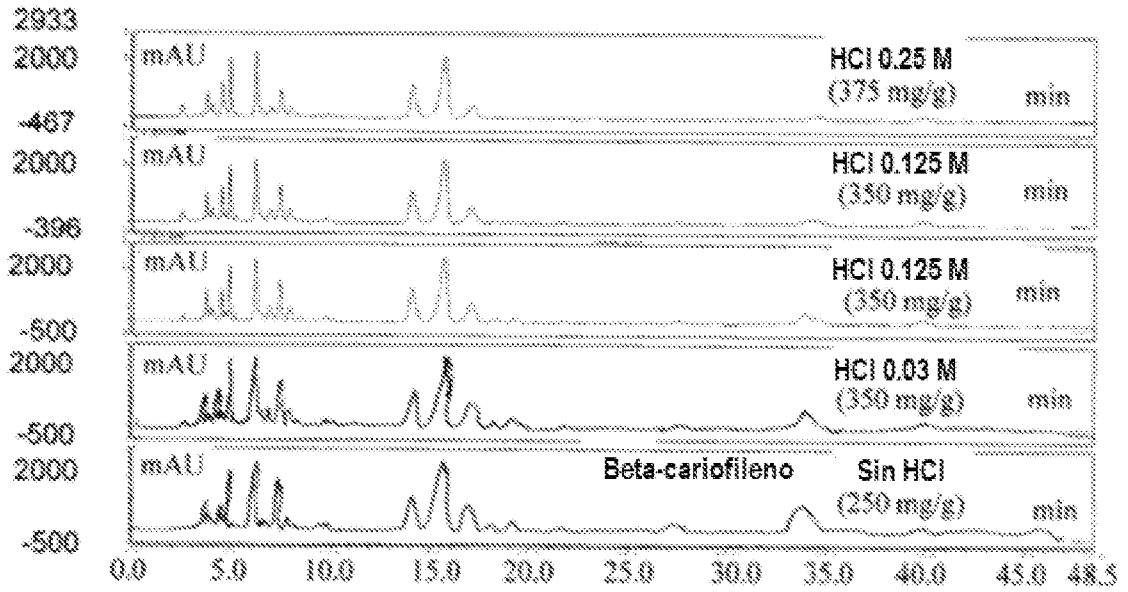


FIGURA 6

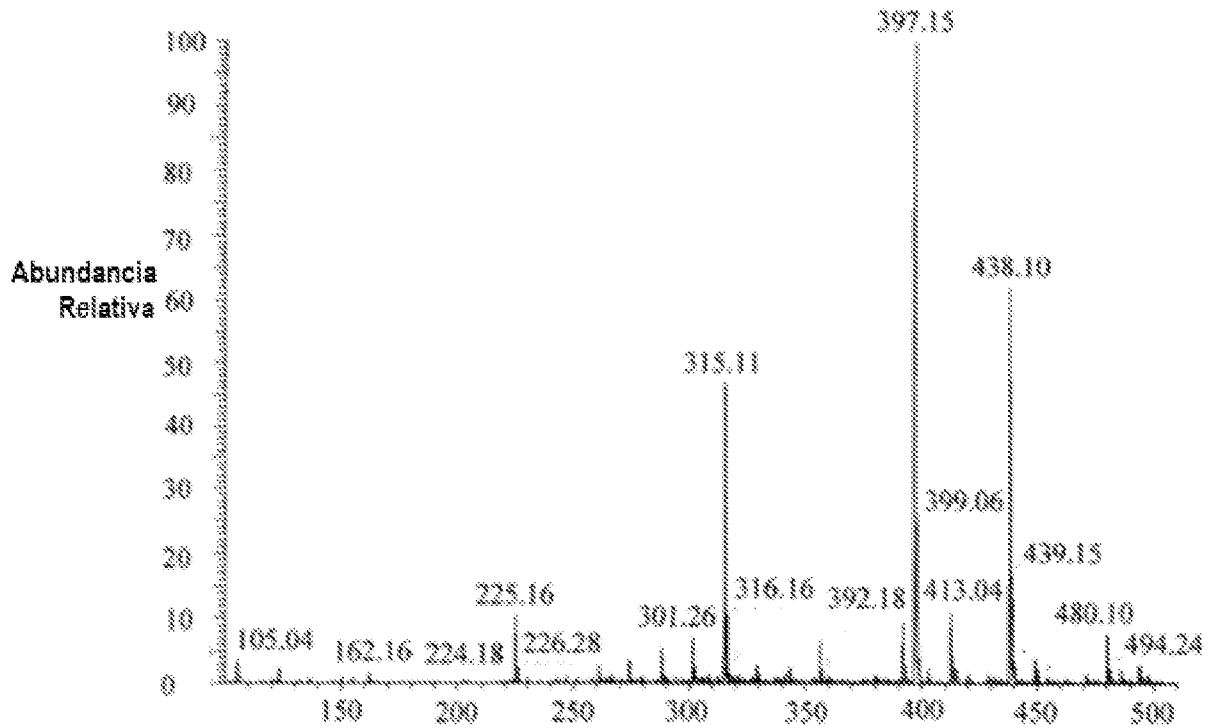


FIGURA 7

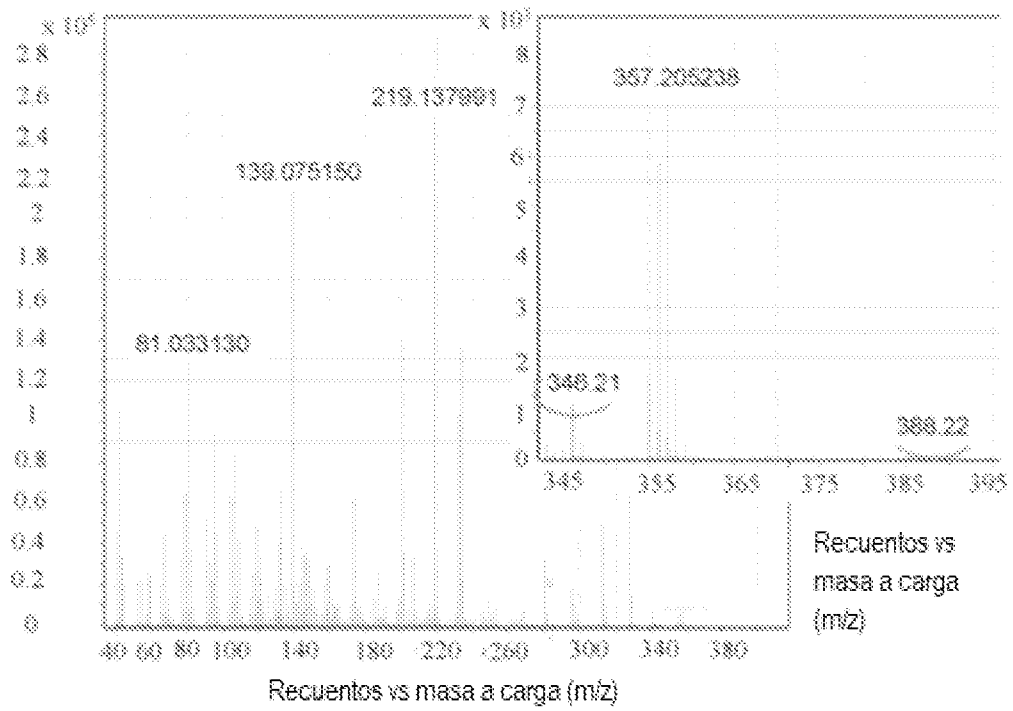


FIGURA 10

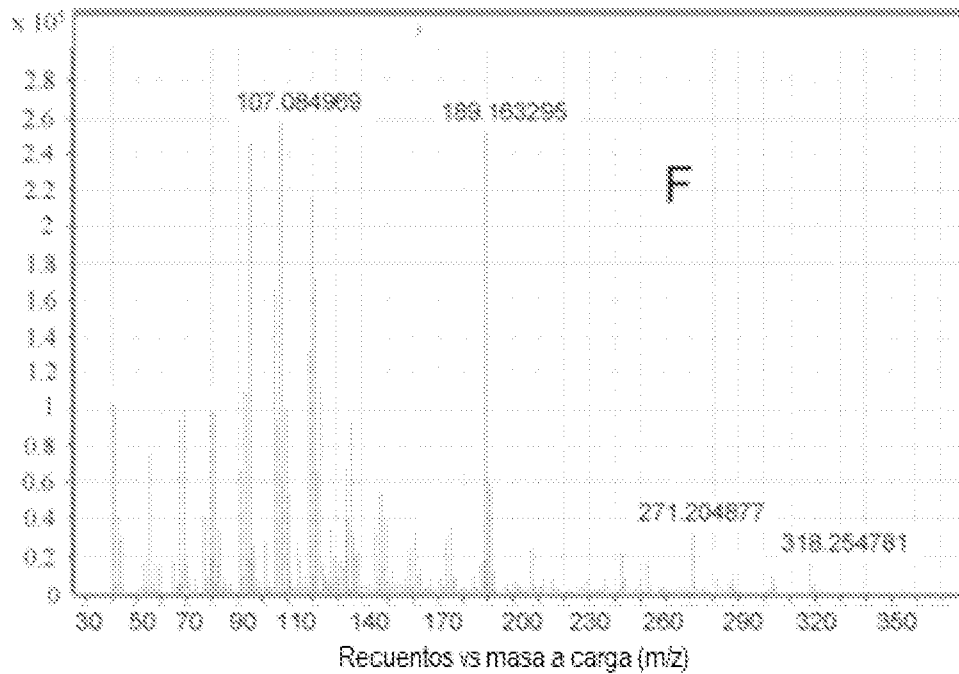


FIGURA 8

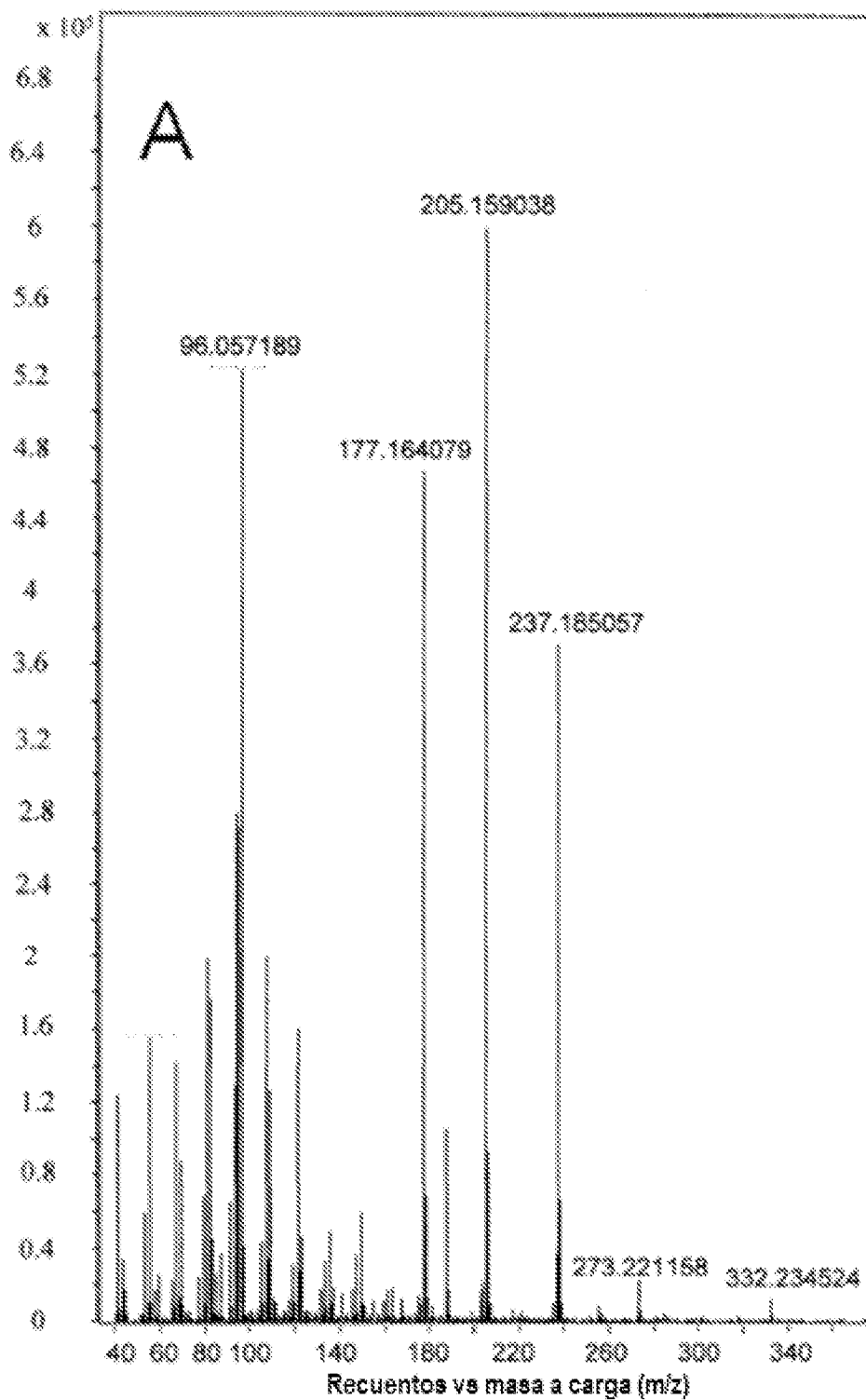


FIGURA 9

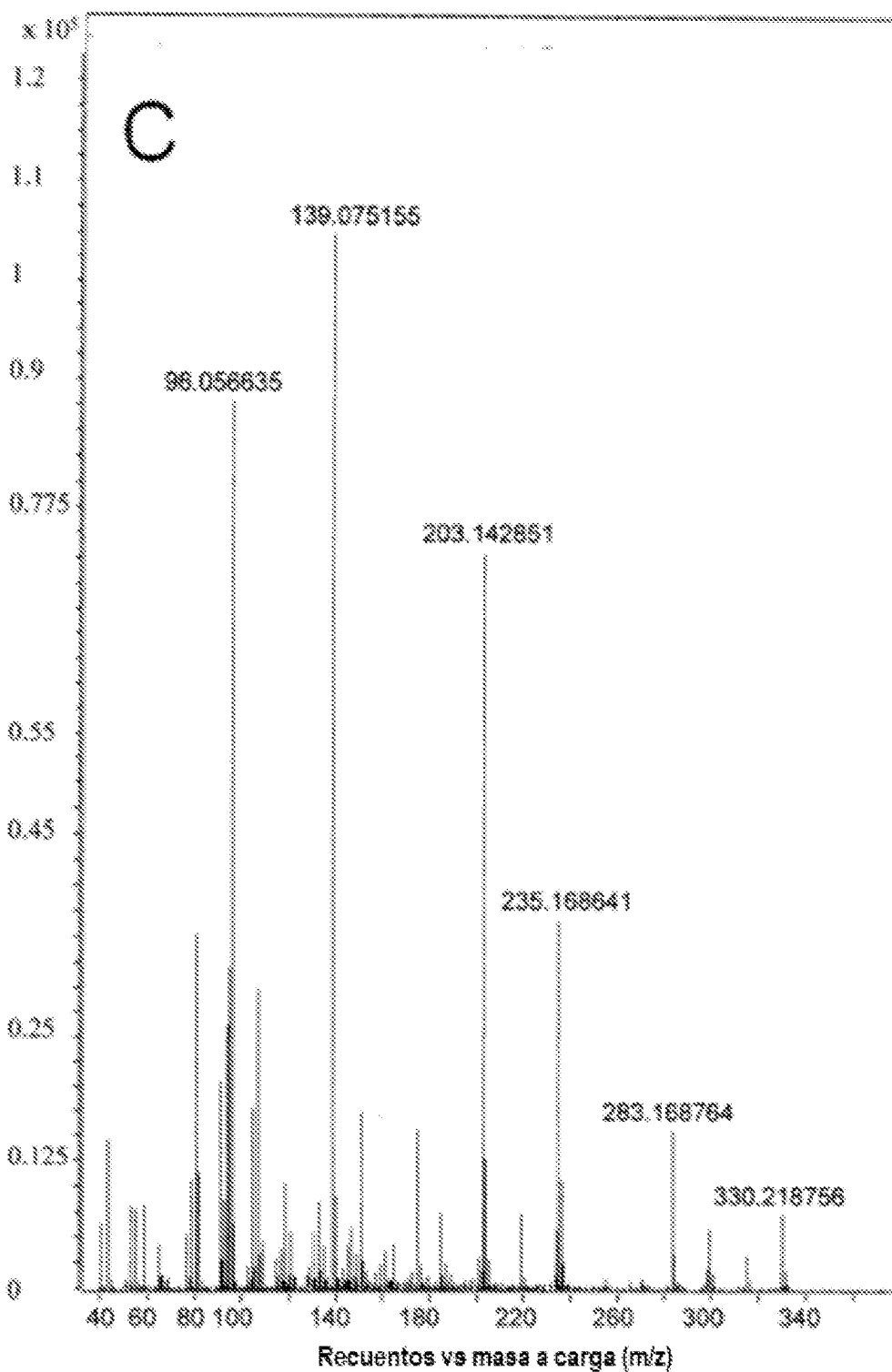


FIGURA 11

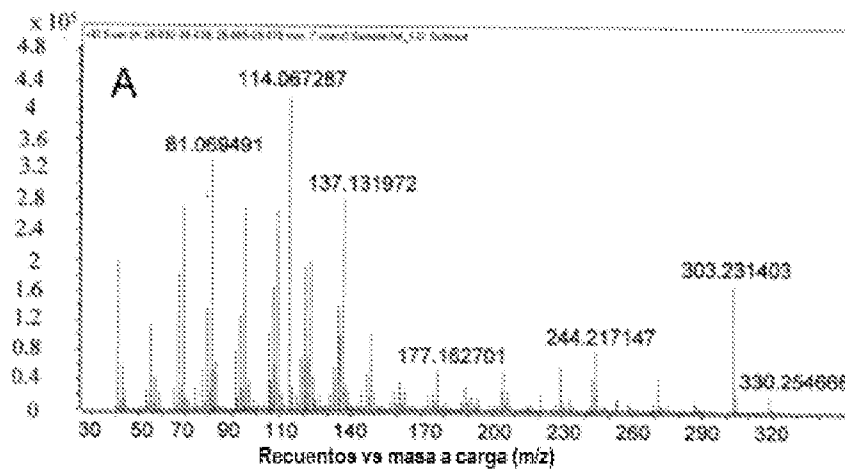


FIGURA 12

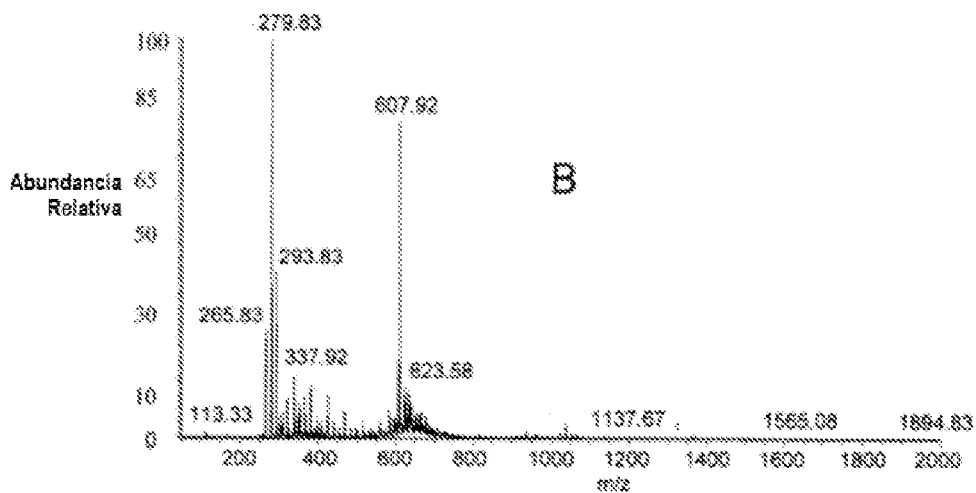


FIGURA 13

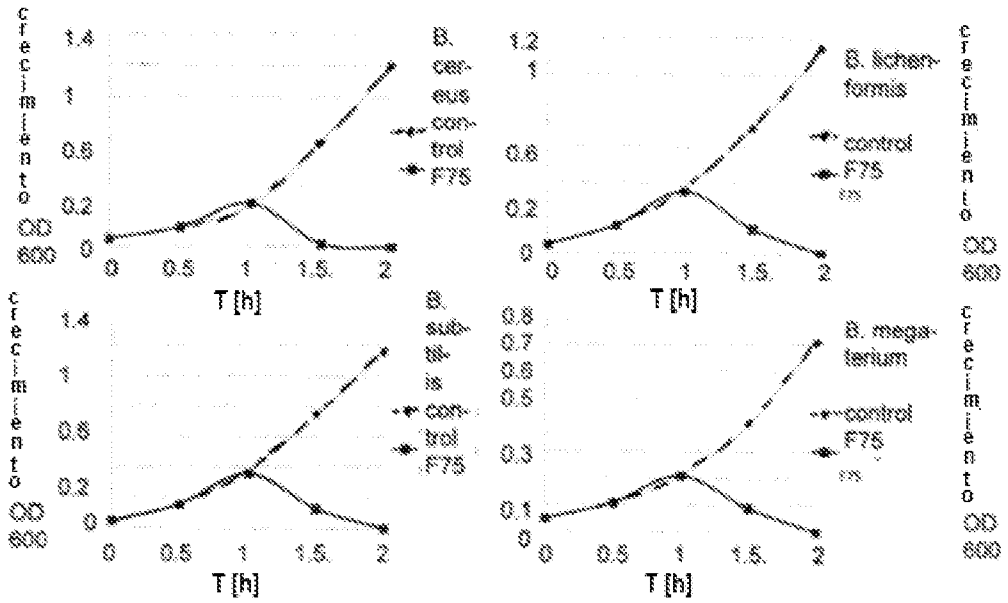


FIGURA 14

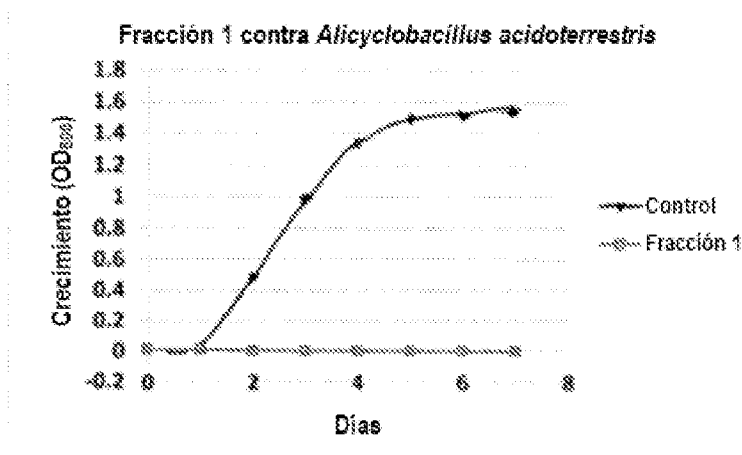


FIGURA 15

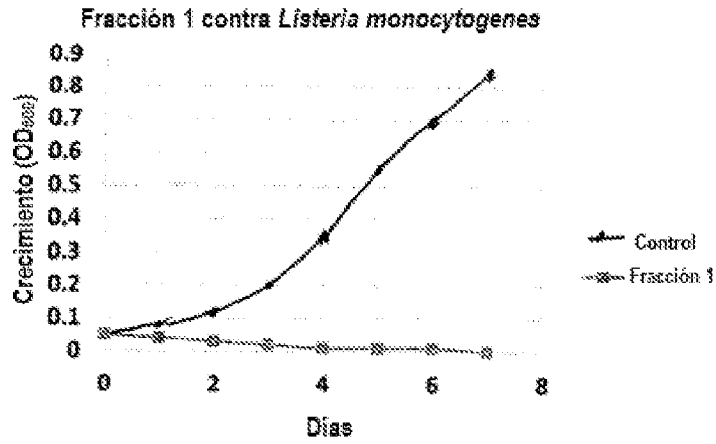


FIGURA 16

