

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 432**

51 Int. Cl.:

**A61Q 17/00** (2006.01)

**A61Q 11/00** (2006.01)

**A61Q 19/00** (2006.01)

**A61K 8/97** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2009 E 09804284 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2367525**

54 Título: **Composición que comprende saponinas**

30 Prioridad:

**23.12.2008 FR 0807412**

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

**28.06.2016**

73 Titular/es:

**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NICE  
(50.0%)**

**Hôpital de Cimez 4 avenue Reine Victoria, BP  
1179**

**06003 Nice Cedex 1, FR y**

**UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**MADINIER, ISABELLE y  
GÉRIBALDI, MIREILLE**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

**ES 2 575 432 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 que comprende saponinas

5 **[0001]** La presente invención se refiere a una composición que comprende saponinas. Dicha composición es particularmente útil como enjuague bucal, principalmente en individuos que presentan una sequedad bucal. Del mismo modo es útil para la higiene de la piel, de las mucosas, de las uñas o del cabello, en el tratamiento de la sequedad cutánea y/o de la sequedad de las mucosas, y en el tratamiento de las micosis, en concreto cutáneas o genitales.

10 **[0002]** En la actualidad, los enjuagues bucales se utilizan como antisépticos bucales, como productos de uso regular en la higiene bucodental diaria, o en caso de operación quirúrgica o de infecciones bucodentales.

15 **[0003]** Los enjuagues bucales conocidos, denominados antisépticos, contienen diversos ingredientes, principalmente antisépticos de espectro amplio, detergentes de síntesis o principios activos que actúan frente a los síntomas de las infecciones o inflamaciones bucodentales. Los detergentes y los antisépticos, como por ejemplo el etanol, el fenol, la hexetidina, la clorhexidina y los amonios cuaternarios, inhiben el desarrollo o destruyen las bacterias de la biopelícula oral y las *Candida*, y principalmente *C. albicans* (*Candida albicans*), que es el mayor hongo patógeno de la biopelícula y a menudo se asocia con la boca seca. Dichos enjuagues bucales se utilizan también en caso de sequedad bucal.

20 **[0004]** Sin embargo, dichos enjuagues bucales antisépticos presentan grandes inconvenientes. En efecto, de manera sorprendente, gracias a dos estudios clínicos, las solicitantes han puesto de manifiesto que su uso regular es una causa de la sequedad bucal. Ahora bien, la sequedad bucal favorece las candidiasis orales y las caries dentales. Del mismo modo, las solicitantes han puesto de manifiesto una asociación entre la sequedad bucal y la colonización de las prótesis dentales por parte de los hongos.

25 **[0005]** Los enjuagues bucales antisépticos del estado de la técnica únicamente son adecuados en indicaciones muy limitadas, en preoperatorios y posoperatorios, y en infecciones agudas de las mucosas. Por el contrario, no están adaptados para un uso regular de duración prolongada. Sin embargo, las solicitantes han puesto de manifiesto que su uso, el cual no debe superar nunca las dos semanas, es a menudo mucho más largo, incluso diario sin limitación de duración. Un uso prolongado desequilibra la biopelícula, principalmente la biopelícula oral. En concreto, han observado un uso iatrogénico superior a las dos semanas en un 34 % de 90 enfermos crónicos (edad media 44 años), y en un 27 % de 60 personas de edad avanzada hospitalizadas (edad media 85 años). En concreto, las solicitantes han identificado que la relación entre la sequedad bucal y los enjuagues bucales antisépticos conocidos proviene del hecho de que dichos enjuagues bucales contienen principios activos que destruyen al mismo tiempo las bacterias de la biopelícula bucodental sana y que alteran los polisacáridos de dicha biopelícula sana, comprendiendo glicoproteínas los polisacáridos. No obstante, dichos polisacáridos tienen la propiedad de fijar un gran número de moléculas del agua, y garantizan la hidratación y la viscosidad de la biopelícula.

30 **[0006]** Las solicitantes han identificado que los principios activos antimicrobianos utilizados en los enjuagues bucales son esencialmente etanol, taninos, amonios cuaternarios, biguanidas, aceites esenciales e iones bicarbonatos, solos o en combinación.

35 **[0007]** Las solicitantes también concluyen a partir de dichos estudios que el fenómeno de la boca seca provocado por los enjuagues bucales antisépticos y otros medicamentos se autoalimenta a causa de dichos tratamientos. En efecto, la proliferación de las *Candida*, favorecida por la falta de (proteo)glucanos fisiológicos, provoca una acidificación del medio bucal. Las *Candida* producen entonces proteasas activas en medio ácido, que hidrolizan la parte proteica de las mucinas y las proteínas ricas en prolina de la salina y de la biopelícula oral. La proliferación de las *Candida* provoca y mantiene una inflamación de las mucosas con aumento de la permeabilidad de las mucosas a los medicamentos. En total, la asociación entre enjuagues bucales antisépticos y candidiasis oral destruye las glicoproteínas de la biopelícula oral por un ataque simultáneo de los glúcidos (antisépticos) y de las proteínas (proteasas de las *Candida*).

40 **[0008]** Existen tratamientos antifúngicos en caso de candidiasis oral, principalmente los polienos y los azoles. Sin embargo, las *Candida* desarrollan resistencia frente a dichos tratamientos.

45 **[0009]** Asimismo, no existe tratamiento antifúngico que respete la biopelícula sana de la zona tratada y que no tenga un efecto secundario nocivo para la zona tratada.

50 **[0010]** El problema que la invención se propone resolver consiste en obtener una composición que no presente los inconvenientes asociados a los enjuagues bucales del estado de la técnica, y en concreto que pueda usarse de manera regular y prolongada sin provocar sequedad bucal, que sea eficaz contra las candidiasis orales. Más ampliamente, la invención se propone proporcionar una nueva composición que permita luchar contra el

desarrollo de las candidiasis, en concreto orales, cutáneas y genitales, y/o contra la sequedad bucal en el marco de una higiene regular o de tratamientos farmacéuticos o dermatológicos prolongados, de poco coste.

5 **[0011]** La solución propuesta de la invención a este problema que se plantea tiene como primer objeto una composición que comprende un extracto de una planta solidago (*Solidago*) que comprende saponinas y está sustancialmente libre de taninos, no habiendo sido sometidas las saponinas a lisis alcalina si el extracto de planta consiste en saponinas purificadas.

10 **[0012]** De forma ventajosa, la composición no comprende taninos; la composición se presenta en forma de enjuague bucal, dentífrico, gel, crema, leche, polvos, loción, pulverizador, jabón o cápsulas, y preferiblemente en forma de enjuague bucal.

**[0013]** La invención tiene como segundo objeto el uso cosmético de una composición que comprende un extracto de una planta solidago (*Solidago*) que comprende saponinas y que no comprende sustancialmente taninos para la higiene bucal, de la piel, de las mucosas, de las uñas y/o del cabello.

15 **[0014]** Asimismo, la invención tiene como objeto una composición que comprende un extracto de una planta solidago (*Solidago*) que comprende saponinas y que no comprende sustancialmente taninos, para su aplicación como medicamento.

20 **[0015]** Asimismo, la invención tiene como objeto una composición que comprende un extracto de una planta solidago (*Solidago*) que comprende saponinas y que no comprende sustancialmente taninos, para su aplicación como medicamento en el tratamiento de la sequedad cutáneas y/o de la sequedad de las mucosas, y en concreto de la sequedad bucal.

25 **[0016]** Asimismo, la invención tiene como objeto una composición que comprende un extracto de una planta solidago (*Solidago*) que comprende saponinas y que no comprende sustancialmente taninos, para su aplicación como medicamento en el tratamiento de las micosis, en concreto de las micosis cutáneas, bucales o anogenitales.

**[0017]** Asimismo, la invención tiene como objeto una composición que comprende un extracto de una planta solidago (*Solidago*) que comprende saponinas y que no comprende sustancialmente taninos, para su aplicación como medicamento en el tratamiento de las infecciones bucodentales, principalmente las caries, la periodontitis, la lengua negra vellosa y la halitosis relacionadas con la sequedad bucal.

30 **[0018]** Asimismo, la invención tiene como objeto un procedimiento de obtención de un extracto de plantas, preferiblemente solidagos (*Solidago*), comprendiendo dicho extracto saponinas y no comprendiendo sustancialmente taninos, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- extracción de saponinas a partir de plantas, preferiblemente solidagos (*Solidago*); después - eliminación dirigida de los taninos.

35 **[0019]** De forma ventajosa, -la etapa de extracción es una extracción acuosa, etanólica, metanólica, una extracción con cloroformo o incluso una extracción con éter de petróleo; - la etapa de extracción, en el caso de una extracción etanólica, metanólica, con cloroformo o con éter de petróleo, viene seguida de una etapa de eliminación del etanol, del metanol, del cloroformo o del éter de petróleo, por ejemplo por evaporación; - la etapa de eliminación dirigida de los taninos se lleva a cabo por precipitación de los taninos en presencia de proteínas, y preferiblemente en presencia de caseína.

40

**[0020]** La invención se entenderá mejor con la lectura de la siguiente descripción no limitante y de los dibujos que la acompañan, en los cuales:

- 45 - La figura 1 muestra una vista en microscopio de la cepa de referencia *C. albicans* 4872 en cultivo en agar; a la derecha, el cultivo ha estado en contacto con un extracto de planta que comprende saponinas según la invención; a la izquierda, el cultivo ha estado en contacto con un medio sin saponinas;
- La figura 2 muestra una vista en microscopio de la cepa silvestre *C. albicans* MG 001 en cultivo en agar; a la derecha, el cultivo ha estado en contacto con un extracto de planta que comprende saponinas según la invención; a la izquierda, el cultivo ha estado en contacto con un medio sin saponinas;
- 50 - La figura 3 muestra una vista en microscopio del efecto de diferentes extractos acuosos de solidagos que comprenden saponinas en la transformación de las levaduras de la cepa *C. albicans* ATCC 10231r (forma rugosa); y
- La figura 4 muestra el efecto de diferentes extractos acuosos de solidagos que comprenden saponinas en el tamaño de las colonias de *C. albicans* ATCC 10231r en cultivo en agar.

**[0021]** La composición según la invención presenta las siguientes ventajas:

- tiene un efecto antifúngico dirigido sobre las *Candida*, en concreto *C. albicans* (*Candida albicans*), al tiempo que conserva las bacterias de la biopelícula sana, principalmente de la boca, la piel y las mucosas anogenitales;
- 5 - crea *in vivo* un entorno desfavorable para el crecimiento de las *Candida*, sin erradicarlas pero manteniéndolas en forma quiescente no virulenta;
- conserva los glucanos, las proteínas y las glicoproteínas, principalmente en la boca y sobre las mucosas, por ejemplo de origen salival y bacteriano. Así, estando conservadas las bacterias y las proteínas y glicoproteínas de la biopelícula, se enfrentan además a la invasión de los tejidos causada por las *Candida* y las bacterias patógenas. Al crear un entorno desfavorable para el crecimiento de las *Candida*, la composición favorece las bacterias endógenas, puesto que existe una competencia en la biopelícula mucosa entre las bacterias endógenas y las *Candida*;
- 10 - al conservar los glucanos y las glicoproteínas, reduce el desarrollo de la sequedad bucal, ya que los glucanos y las glicoproteínas contribuyen igualmente a la hidratación y la viscosidad de la biopelícula, en la boca y sobre las mucosas;
- 15 - asimismo, tiene una acción reequilibrante en la biopelícula sana de la zona de aplicación, principalmente la biopelícula oral, cutánea o urogenital;
- calma e hidrata las pieles sensibles y/o frágiles y no agrede a las pieles y mucosas inflamadas;
- en la boca, permite mantener una biopelícula de poco grosor, de menos de un mm de grosor, limitando de este modo las caries y las periodontitis, y permitiendo que sus principios activos accedan al conjunto de la biopelícula;
- 20 - se puede utilizar de forma regular y prolongada, sin efectos secundarios nocivos, gracias a su acción suave, dirigida y diferida sobre las *Candida*;
- es respetuosa con el medio ambiente puesto que preferiblemente no comprende ni conservantes ni colorantes, ni perfumes de síntesis y es biodegradable;
- 25 - no deja color en la zona tratada, principalmente la lengua, los dientes o las prótesis tras una aplicación bucal, y no altera el gusto del usuario tras una aplicación bucal;
- preferiblemente no comprende terpenos volátiles contenidos en aceites esenciales, que son tóxicos, y por tanto no lleva a riesgo alguno de confusión de ideas o de agitación en los usuarios.

30 **[0022]** Los taninos son responsables de una precipitación de las glicoproteínas de la biopelícula oral, en concreto de las proteínas ricas en prolina. Sorprendentemente, los solicitantes han identificado que los taninos comprendidos en las composiciones del estado de la técnica tienen un efecto agravante en la sensación de boca seca, a consecuencia de su efecto en la biopelícula asociada a la boca seca. Así, según una característica esencial, la composición según la invención está sustancialmente libre de taninos; es decir, no comprende taninos o solamente como trazas. Por ello, los taninos se eliminan de forma dirigida del extracto de planta. Así, la ausencia de taninos parece desempeñar un papel importante en las ventajas de las composiciones según la invención.

40 **[0023]** Según otra característica, la composición según la invención comprende saponinas y, preferiblemente, un extracto de una planta solidago que las comprende.

**[0024]** Las saponinas, también denominadas saponósidos o glucósidos de saponina, constituyen un amplio grupo de heterósidos complejos que pertenecen a los terpenos cíclicos o a los esteroides. Una saponina procede de la combinación química de un azúcar (glúcido) y de un esteroide, de un esteroide alcaloide o de un triterpeno. Determinadas composiciones de la técnica anterior comprenden saponinas esteroideas o triterpénicas. En el marco de la invención, las saponinas son preferiblemente no esteroideas.

50 **[0025]** Dotadas de propiedades tensioactivas, las saponinas forman espuma en sus soluciones y sirven de detergente, por ejemplo de jabones vegetales. Asimismo, están indicadas para tratar la hipercolesterolemia, como anticancerígenos o adyuvantes en las vacunas. Las saponinas son detergentes, hemolíticas, quelantes del hierro, del cinc y del calcio. Las saponinas se fijan sobre los esteroides membranales, el ergosterol de las células fúngicas y el colesterol de las células humanas. Como las bacterias carecen de esteroides membranales, las saponinas no tienen propiedades antibacterianas en dosis farmacológicas. Sin embargo, pueden encontrarse en dosis más elevadas, en forma de detergentes.

55 **[0026]** Las saponinas están presentes en numerosos vegetales. En el marco de la invención, las saponinas se extraen de planta(s) solidago(s). Pueden extraerse de sumidades floridas, hojas y/o de rizomas de planta. Preferiblemente, la planta solidago, también denominada vara de oro, es decir del género *S. (Solidago) L. Asteracea*, puede elegirse entre una de las 120 especies conocidas, entre las cuales *S. virgaurea*, *S. canadensis*, *S. microglossa* y preferiblemente *S. virgaurea L. virgaurea* o *S. virgaurea L. minutalalpestris*.

60

[0027] Los solidagos se cultivan como plantas medicinales. Por ejemplo, *S. virgaurea* se presenta como diurética, analgésica, antiinflamatoria, antitumoral, antiaftas y antiúlceras, antiséptica y antidiarreica. La infusión de solidago se utiliza tradicionalmente contra las inflamaciones, los problemas digestivos y urinarios y las aftas. No obstante, las composiciones conocidas a base de solidagos comprenden taninos, nocivos para la biopelícula.

[0028] Numerosos estudios de la técnica anterior han investigado los efectos antimicrobianos de diversos extractos de solidagos y muestran una eficacia poco concluyente contra las *Candida* y/o una actividad antibacteriana que la composición según la invención busca evitar. En estos estudios se trata de extractos en los que los taninos no se han eliminado.

[0029] Por ejemplo, un extracto acuoso total de *Solidago gigantea* Ait. se ha sometido a prueba contra 13 cepas fúngicas. No se ha observado ninguna inhibición para 3 cepas de *C. albicans* sobre 4 ni para la cepa de *C. parapsilosis* sometida a prueba (Webster J Ethnopharmacol 2008). Por consiguiente, estos datos disuaden de utilizar un extracto acuoso de solidago contra las *Candida*.

[0030] Los extractos procedentes de una extracción metanólica de *S. microglossa* han mostrado una débil actividad antibacteriana así como una actividad antifúngica contra una cepa de *C. albicans* (Morel, Fitoterapia 2006). Asimismo, los extractos de las partes aéreas de *S. virgaurea* L. muestran una actividad inhibidora sobre 9 cepas bacterianas (Thiem, Fitoterapia 2002). Estos estudios disuaden de utilizar un extracto procedente de una extracción metanólica de solidago para conservar las bacterias de la biopelícula sana.

[0031] Los extractos procedentes de una extracción etanólica de *S. gigantea* Ait. y de *S. virgaurea* L. han estado, respectivamente, activos contra una cepa de *C. (Candida) pseudotropicalis* y sin efecto contra 11 cepas de *Candida* sometidas a prueba (Pepeljnjak, Pharmaceutical and Pharmacological Letters 1998). Los extractos de hojas y/o de raíces de *S. chilensis* resultaron ineficaces en todas las concentraciones sometidas a prueba contra una cepa de *C. albicans* (Teixeira Duarte, J Ethnopharmacol 2005). Estos datos disuaden de utilizar un extracto procedente de una extracción etanólica de solidago contra las *Candida*.

[0032] De forma sorprendente, en el marco de la invención, los solicitantes han puesto de manifiesto que las saponinas ejercen su efecto antifúngico no por medio de una acción fúngica o fungistática como las composiciones de la técnica anterior, sino de forma más suave y progresiva al crear un entorno desfavorable para el crecimiento de las *Candida*. Las solicitantes han observado que las saponinas según la invención, sobre un cultivo de *Candida*, tienen de efecto no la disminución del número de colonias (o CFU de «colony forming units»), sino la disminución significativa del diámetro de las colonias y la modificación de la morfología de las *Candida*. Ello se ha observado, en concreto, con una decocción, es decir, una infusión o una extracción acuosa, de solidago (véanse las Tablas 1 a 3 y las Figuras 1 a 4).

[0033] Así, las composiciones según la invención tienen un efecto antifúngico retardado, más suave y que lo tolera mejor la biopelícula de la zona de aplicación. Ello se puede explicar por el hecho de que la saponina, detergente no iónico, limita el aporte de lípidos, cuyas necesidades aumentan en gran medida tras la transformación de las levaduras *Candida* en filamentos. Asimismo, las saponinas son hemolíticas y quelantes del hierro. Privan de hierro a las *Candida* y a las bacterias patógenas hemófilas de la biopelícula, principalmente oral, principalmente los estreptococos cariogénicos, las *Haemophilus* y los bacilos Gram negativos asociados a la periodontitis y la halitosis.

[0034] El extracto de planta que comprende saponinas es preferiblemente un extracto acuoso. Puede provenir de una extracción acuosa, etanólica, metanólica, una extracción con cloroformo o con éter de petróleo.

[0035] El extracto de planta según la invención no es un aceite esencial. En efecto, las saponinas, sustancias no volátiles, no las aportan los aceites esenciales en las composiciones de la invención.

[0036] Los estudios de la técnica anterior se han realizado también con extractos de saponinas purificadas; es decir, extractos de plantas a partir de los cuales se han aislado las saponinas, separadas de otros compuestos de los extractos. Así, una mezcla de saponinas purificadas de *S. virgaurea* obtenida por extracción etanólica se muestra inactiva contra 7 cepas de *C. albicans* sometidas a prueba (Bader, Pharmazie 1987). Únicamente las saponinas que se habían sometido a una lisis alcalina parcial tenían propiedades antifúngicas, con un diámetro de inhibición medible contra varias cepas de *C. albicans* en las pruebas de difusión en agar. Las saponinas lisadas y purificadas estaban generalmente más activas individualmente que la mezcla de saponinas lisadas (Bader Pharmazie 1987, Bader Pharmazie 1990, Bader 210th National Meeting Chicago 1995, Bader Pharmazie 2000). Estas saponinas purificadas eran glucósidos del ácido poligalácico, con un disacárido y un oligosacárido de 4 a 8 residuos ligados en aglicón. La lisis acorta los sacáridos que constituyen las saponinas, y la intensidad del efecto antifúngico de dichas saponinas purificadas parece que aumenta cuando se acorta la longitud del oligosacárido que las constituye (Hiller Pharmazie 1987).

5 **[0037]** Sin embargo, según una característica preferida de la invención, la o las saponinas no se han sometido a lisis alcalina, y en concreto cuando la o las saponinas de la composición según la invención se purifican; es decir, cuando se utilizan en la composición tras haberse separado de otros compuestos del extracto vegetal del que provienen. En efecto, de forma sorprendente, en estas condiciones, las saponinas presentan el efecto antifúngico investigado, por el cual no tienen un efecto inhibidor visible pero se oponen a la conversión de los hongos de un estado quiescente a un estado activo, ralentizando u oponiéndose a la filamentación. Esta observación de las solicitantes va en contra del prejuicio según el cual únicamente las saponinas purificadas que hayan estado sometidas a una lisis alcalina actúan contra las *Candida* y según el cual el efecto antifúngico de la saponina mejora tras una lisis alcalina. Cuando las saponinas de la composición no se purifican, es decir, cuando se utilizan en la composición con los otros compuestos del extracto de plantas salvo los taninos, pueden haber sufrido lisis alcalina o no. Preferiblemente, no han sufrido lisis alcalina.

15 **[0038]** Las composiciones que comprenden un extracto de planta, sustancialmente sin taninos pero con los otros compuestos del extracto, se prefieren porque esos otros compuestos tienen propiedades interesantes. Estos comprenden principalmente aromas y colorantes naturales y no tóxicos.

20 **[0039]** Las composiciones según la invención se presentan preferiblemente en una forma adaptada para una aplicación tópica, en concreto para una aplicación bucodental, cutánea o genital. Preferiblemente, las composiciones se presentan en forma de:

- enjuague bucal, dentífrico, gel, crema y otras formas galénicas adaptadas para una aplicación bucodental;
- sales, solución, pastilla y otras formas galénicas adaptadas para la descontaminación o la limpieza de las prótesis dentales o de otros dispositivos extraíbles utilizados principalmente en odontología, estomatología o cirugía maxilofacial;
- 25 - gel, crema, leche, polvos, loción, pulverizador, jabón y otras formas galénicas adaptadas para una aplicación sobre la piel, las uñas y/o el cabello;
- gel, crema, leche, cápsula, jabón y otras formas galénicas en los medicamentos adaptados para una aplicación anogenital.

30 **[0040]** El extracto puro, también denominado solución madre, corresponde al extracto de planta tras la eliminación de los taninos, eventualmente tras la eliminación de los compuestos tóxicos eventualmente utilizados para la extracción.

35 **[0041]** Las composiciones según la invención, y en concreto los enjuagues bucales, comprenden preferiblemente entre 0,005 y 50 % de extracto (o solución madre), y preferiblemente entre 1 y 15 %, por ejemplo 10 % en volumen del volumen total de la composición.

**[0042]** La invención se refiere también a los usos de las composiciones según la invención.

40 **[0043]** Las composiciones según la invención pueden utilizarse para la higiene bucodental, de forma regular, o bien en el marco de un tratamiento de las candidiasis bucales, sequedad bucal, caries, periodontitis, la lengua negra vellosa y/o la halitosis. Estas son particularmente indicadas en forma de enjuague bucal.

45 **[0044]** Las composiciones según la invención pueden utilizarse del mismo modo, de forma regular, para la higiene de la piel, las uñas y/o el cabello, de las mucosas anogenitales, principalmente en pediatría o en ginecología. Asimismo, pueden utilizarse en el marco de un tratamiento de las micosis o de las candidiasis cutáneas, ungulares, capilares o anogenitales.

50 **[0045]** Las composiciones según la invención se utilizan preferiblemente como medicamento complementario de un medicamento convencional de la afección que se trate.

**[0046]** Las composiciones según la invención pueden estar destinadas además a un uso veterinario en las indicaciones anteriores, salvo en los animales de sangre fría, para los cuales las saponinas son tóxicas.

55 **[0047]** Las saponinas están presentes en la planta en forma de mezclas complejas. La extracción y sobre todo la separación de las saponinas son delicadas a causa de su fuerte polaridad, de su relativa fragilidad y de las diferencias estructurales muy débiles entre los constituyentes.

60 **[0048]** Las solicitantes han dispuesto un procedimiento de obtención de un extracto de plantas, en concreto a partir de plantas solidagos, comprendiendo dicho extracto saponinas. Dicho procedimiento es ventajoso en el sentido de que permite obtener saponinas que no han sido sometidas a lisis alcalina así como un extracto desprovisto de taninos.

65 **[0049]** Dicho procedimiento comprende de manera esencial una etapa de extracción de diferentes compuestos, entre ellos saponinas, a partir de plantas así como una etapa de eliminación dirigida de los taninos.

**[0050]** La etapa de extracción puede comprender una extracción acuosa, etanólica, metanólica, una extracción con cloroformo o incluso una extracción con éter de petróleo.

5 **[0051]** Cuando la extracción se efectúa con etanol, metanol, cloroformo o éter de petróleo, comprende preferiblemente una etapa de eliminación de etanol, metanol, cloroformo o éter de petróleo, por ejemplo por evaporación.

10 **[0052]** La extracción acuosa es ventajosa puesto que no necesita una etapa de eliminación de etanol, metanol, cloroformo o éter de petróleo. Es más rápida, más sencilla y menos costosa.

15 **[0053]** El procedimiento comprende además una etapa de eliminación dirigida de los taninos. Esta etapa se efectúa ventajosamente por precipitación de los taninos en presencia de proteínas, y preferiblemente en presencia de caseína. En efecto, la caseína es ventajosa puesto que presenta homologías de secuencia con las principales proteínas de la biopelícula sana, con las (glico)proteínas protectoras de la biopelícula oral así como con las proteínas salivales. La caseína permite eliminar los taninos que presentan la afinidad más fuerte por las proteínas de la biopelícula sana.

20 **[0054]** Una forma de realización del procedimiento de extracción acuosa a partir de una planta, preferiblemente solidago, según la invención comprende las siguientes etapas:

- preparación de una decocción, etapa según la cual se añade agua destilada estéril a una cantidad de planta (sumidades floridas, hojas y/o rizomas), se lleva la mezcla a ebullición, se deja que la mezcla se enfríe hasta temperatura ambiente y después se filtra;
- 25 - preparación de una decocción isotónica, etapa según la cual se diluye entre dos la decocción obtenida en la etapa anterior con una solución de cloruro de sodio a 1,8 %;
- eliminación de los taninos, etapa según la cual la decocción isotónica se acidifica a pH 4 y después se añade caseína para formar los complejos taninos-caseína. Tras una suave agitación, dichos complejos se eliminan por centrifugación y el sobrenadante se reutiliza.

30

**[0055]** Una forma de realización más concreta de un procedimiento de extracción acuosa a partir de planta, preferiblemente solidago, comprende las siguientes etapas:

- 35 1) Preparación de la decocción:  
Una cantidad de 6g de solidago (*Solidago virgaurea virgaurea L.*), sumidades floridas y hojas secas y trituradas, se coloca en un vaso de precipitados estéril de 250 mL en el que se añade agua destilada estéril a temperatura ambiente (c.s.p. 100 mL). El vaso de precipitados se recubre de un papel de aluminio estéril. Se coloca en un cristizador de agua a temperatura ambiente. El conjunto se recubre de un papel de aluminio y se coloca en una placa calefactora. Tras 10 min de ebullición, el vaso de precipitados se coloca sobre la mesa de trabajo toda la noche. La decocción que se enfría hasta temperatura ambiente presenta un pH de 5,49. Se filtra en un autoclave de Buchner equipado con un papel de filtro para autoclave en un ambiente estéril (en campana de flujo laminar). A continuación, la solución se clarifica por centrifugación en tubos estériles y/o si es necesario por filtración en medio estéril. En esta fase, la decocción puede dividirse en partes alícuotas y congelarse a -20 °C.
- 45 2) Decocción isotónica (fisiológica):  
Se obtiene una decocción isotónica diluyendo por dos la decocción propiamente dicha, obtenida en la etapa anterior, por medio de una solución salina de cloruro de sodio estéril a 1,8 % de forma que haya una decocción final isotónica a 0,9 % de cloruro de sodio.
- 50 3) Eliminación dirigida de los taninos :  
La decocción isotónica se acidifica a pH 4, por ejemplo por medio de ácido cítrico. Tras una acidificación de 750 µL de decocción, el volumen final es de 760 µL. La mezcla decocción-ácido cítrico da un volumen final de 760 µL en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. Se añade caseína a la mezcla, que se somete a una agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. La caseína utilizada puede ser, por ejemplo, caseinato de calcio lecitinado alimentario, con un 87 % de proteínas mínimo (Protilight IP4, Armor Protéines, Saint Brice en Coglès, Francia). Se forma un complejo taninos-caseína, de color marrón, visible macroscópicamente y que precipita. La precipitación máxima de taninos parece estar situada en los 3,5 mg de caseína por 760 µL de decocción. El complejo se elimina por centrifugación durante 10 min a 10000 g a 20 °C. El sobrenadante, denominado «solución madre» en el resto del texto, constituye el extracto, la decocción de solidago tras una eliminación dirigida de los taninos, y presenta una coloración más clara. Puede congelarse a -20 °C para un uso posterior.
- 60 4) Verificación de la presencia de saponinas en la solución madre:  
La presencia de saponinas en la solución madre se verifica por medio de su poder hemolítico, por ejemplo por difusión en pocillos en agar. Un volumen de 50 µL de solución madre se deposita en un pocillo de 5 mm de diámetro en un agar que comprende sangre, por ejemplo un agar sangre de cordero 5 % Columbia®,

BioRad® (Marnes-la-Coquette, Francia). La placa de agar se incuba a 37 °C y el diámetro de hemólisis se mide cada hora. La solución madre utilizada para todas las pruebas microbiológicas da un diámetro de hemólisis de 8 mm después de 1 h, de 9 mm después de 2 h, de 10 mm después de 3 h, de 10,5 mm después de 4 h y de 10,6 mm después de 5 h y 6 h.

- 5 5) Concentración de la decocción:  
Para facilitar las manipulaciones, la solución madre puede concentrarse, preferiblemente utilizando membranas filtrantes, por ejemplo por ultrafiltración.

10 **[0056]** Otro modo de realización más concreto de un procedimiento de extracción acuosa a partir de planta, preferiblemente solidago, comprende las siguientes etapas:

- 1) Preparación de la decocción:  
Una cantidad de 6 g de partes aéreas de solidago (*Solidago virgaurea minuta/alpestris* (Walds. & Kit.)), secadas, se coloca en un vaso de precipitados estéril de 250 mL en el que se añade agua destilada estéril a temperatura ambiente (c.s.p. 100 mL). El vaso de precipitados se recubre de un papel de aluminio estéril. Se coloca en un cristizador de agua a temperatura ambiente. El conjunto se recubre de un papel de aluminio y se coloca en una placa calefactora. Tras 10 min a 100 °C, el vaso de precipitados se coloca sobre la mesa de trabajo toda la noche a temperatura ambiente. La decocción se filtra en un autoclave de Buchner equipado con un papel de filtro para autoclave en un ambiente estéril (en campana de flujo laminar). A continuación, la solución se clarifica por centrifugación a 2000 g mínimo durante 15 minutos a 20 °C. En esta fase, la decocción puede dividirse en partes alícuotas y congelarse a -20 °C.
- 15 2) Eliminación dirigida de los taninos:  
Los taninos se precipitan por adición de caseinato de calcio lecitinado alimentario, (5 mg, Protilight IP4®, Armor Protéines, Saint Brice en Coglès, France) y se acidifica a pH 4 con 25 µL de tampón citrato 1M por mL de decocción. Tras 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, y centrifugación a 2000 g mínimo durante 15 minutos a 20 °C, el sobrenadante, denominado «solución madre» en el resto del texto, constituye el extracto, la decocción de solidago tras una eliminación dirigida de los taninos, se esteriliza en autoclave y puede congelarse a -20 °C para un uso posterior.
- 20 3) Decocción isotónica (fisiológica):  
Puede obtenerse una decocción isotónica por adición de cloruro de sodio de forma que se obtenga 0,9 % final.
- 25 4) Verificación de la presencia de saponinas en la solución madre:  
La presencia de saponinas en la solución madre isotónica se verifica por medio de su poder hemolítico, por ejemplo por difusión en pocillos en agar. Un volumen de 50 µL de solución madre isotónica se deposita en un pocillo de 5 mm de diámetro en un agar que comprende sangre, por ejemplo un agar sangre de cordero 5 % Columbia®, BioRad® (Marnes-la-Coquette, Francia). La placa de agar se incuba a 37 °C y el diámetro de hemólisis se mide tras 24 h.
- 30 35

40 **[0057]** Una forma de realización del procedimiento de extracción etanólica o metanólica a partir de solidago según la invención comprende las siguientes etapas:

- maceración de planta, por ejemplo 1 kg de planta limpia y seca, en etanol o metanol a 50 % en agua, por ejemplo 8 L de etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) a 50 % 24 h a 20 °C ;
- evaporación de la fase etanólica o metanólica, por ejemplo al vacío;
- 45 - enjuague, por ejemplo 2 veces, de la fase acuosa restante con n-butanol, preferiblemente con una relación volumétrica extracto/n-butanol de 2:1;
- evaporación de la fase butanólica; después
- eliminación de los taninos de la fase acuosa, como se ha descrito anteriormente tras una extracción acuosa.

50 **[0058]** En esta forma de realización concreta, el etanol puede reemplazarse por metanol por medio de un procedimiento de extracción metanólica.

Ejemplo 1 – Impacto de las saponinas de *S. virgaurea* L. *virgaurea* sobre las *Candida*

55 **[0059]** Las solicitantes han realizado un estado sobre dos cepas de *C. albicans*, una cepa de referencia CP 4872 (proporcionada por el Instituto Pasteur) y una cepa silvestre MG 001 (extraída de un paciente).

60 **[0060]** Por ello, las dos cepas de *C. albicans* se han cultivado durante 24 h a 35 °C, en 100 µL de medio líquido RPMI («Roswell Park Memorial Institute medium») sin extracto de solidago o bien en 50 µL de solución madre de extracto de solidago obtenido por medio de extracción acuosa, estando diluida dicha solución madre a 1/3 en RPMI. Los cultivos de 24 h a 35 °C en medio líquido se han sembrado en placas de agar (Sabouraud®), incubados a 35 °C durante una noche, después se han dejado a 20 °C (temperatura ambiente) durante 2 días (D1 y D2). Cada condición se ha duplicado 4 veces, correspondientes a las pruebas n.º 1 a 4.

**[0061]** Después de 1 día (D1) a 20 °C, el diámetro medio de las colonias de *C. albicans* se ha medido por morfometría, y el número medio de las colonias de *C. albicans* se ha contado manualmente para cada pocillo a partir de diluciones 10<sup>-4</sup> o 10<sup>-2</sup>.

5 **[0062]** Los resultados de dichas mediciones se encuentran recogidos en las tablas 1 a 3 a continuación. Las columnas A corresponden a los cultivos sin extracto de solidago, las colonias B corresponden a los cultivos en presencia de extracto de solidago diluido a 1/3. La fila «Número» corresponde al número de colonias en cada pocillo, mientras que la fila «Diámetro» corresponde al diámetro medio de las colonias, expresado en mm, en cada pocillo.

10 **[0063]** El diámetro medio se calcula a partir de los diámetros medidos en 100 colonias, excepto para las pruebas n.º 3 y 4 con CP4872, condición A, donde el número total de colonias fue de 68 y 88 respectivamente.

Tabla 1:

15

	<i>C. albicans</i> CP 4872							
	Prueba n.º1		Prueba n.º2		Prueba n.º3		Prueba n.º4	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Número	100	100	100	100	68	100	88	100
Diámetro mm	1,35	0,90	0,62	0,64	2,40	2,07	3,34	2,24
Desviación estándar	0,19	0,14	0,10	0,09	0,07	0,12	0,12	0,18

Tabla 2:

	<i>C. albicans</i> MG 001							
	Prueba n.º1		Prueba n.º2		Prueba n.º3		Prueba n.º4	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Número	100	100	100	100	100	100	100	100
Diámetro mm	1,20	1,05	0,86	0,80	2,58	1,72	2,86	1,74
Desviación estándar	0,13	0,12	0,12	0,11	0,10	0,05	0,20	0,07

20 Tabla 3: valores de relevancia («p-value») asociados a las comparaciones de los valores de diámetro anteriores entre la condición A y la condición B

zip-value	<i>C. albicans</i> CP 4872	<i>C. albicans</i> MG 001
A/B		
Prueba n.º1	0,000000	0,000000
Prueba n.º2	0,12772	0,000034
Prueba n.º3	0,000000	0,000000
Prueba n.º4	0,000000	0,000000

25 **[0064]** Tras una noche a 35 °C, la presencia de colonias en agar muestra que las *Candida* han crecido, incluso las procedentes del medio líquido con solución madre. Por tanto, las saponinas según la invención no tienen un efecto antifúngico ni fungicida, en todo caso no inmediato.

30 **[0065]** El cultivo en medio líquido con numeración de las unidades que forman colonias (o CFU) tampoco ha mostrado un efecto fungicida ni fungistático de la solución madre.

35 **[0066]** Tras un día (D1) de cultivo a 20 °C, no ha habido una disminución significativa del número de colonias procedentes del medio líquido con solución madre (condición B, p > 0,05) con respecto a los cultivos procedentes del medio RPMI solo (condición A) (Tablas 1 y 2). Asimismo, el diámetro de las colonias ha disminuido significativamente para la condición B (p < 0,01). Para la prueba n.º 2 con la cepa CP 4872, solamente se manifiesta una diferencia significativa en el D2 (p=0,007239). Por tanto, la solución madre, y en concreto las saponinas que contiene, no impiden por completo pero ralentizan el crecimiento de los hongos, por un efecto diferido y no inmediato. Esta crea un entorno desfavorable para el crecimiento de las dos cepas de *Candida* sometidas a prueba y disminuye su potencial de crecimiento.

40 **[0067]** Además, en el microscopio, el aspecto de las colonias es diferente. En efecto, después de un día a 20 °C, los cultivos trasplantados en agar se observan en microscopio. Las cepas de *C. albicans* procedentes de las condiciones A han desarrollado numerosos filamentos pseudomiceliales, testigos de un crecimiento activo,

mientras que las cepas procedentes de las condiciones B se encuentran esencialmente en forma de levaduras pequeñas y redondas, de aspecto quiescente, sin o con muy pocos filamentos miceliales, es decir en forma no virulenta.

5 **[0068]** La figura 1 muestra una vista con microscopio de la cepa *C. albicans* 4872 en el D1 (Prueba n.º 3), procedente, en la foto de la izquierda, de un cultivo sin solución madre (condición A) y, en la foto de la derecha, procedente de un cultivo con solución madre (condición B). La figura 2 muestra una vista con microscopio de la cepa *C. albicans* MG 001 en el D1 (Prueba n.º 3), procedente, en la foto de la izquierda, de un cultivo sin solución madre y, en la foto de la derecha, procedente de un cultivo con solución madre. La solución madre diluida a 1/3 parece más activa en la cepa silvestre MG 001 que en la cepa de referencia 4872.

15 **[0069]** Las solicitantes han observado del mismo modo que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans* crecen en contacto con pocillos que contienen un 50 µl de solución madre diluida pura o a 1/3. Ello muestra que la solución madre no ha tenido ningún efecto inhibidor sobre dichas cepas bacterianas. Asimismo, se observa un efecto antifúngico similar en la morfología de las *Candida* tras 3 trasplantes que alternan la incubación en presencia de solución madre diluida a 1/3 (8 h a 35 °C) y la inoculación en agar Sabouraud® (16 h a 35 °C y después 24 h a temperatura ambiente para la última placa). Los trasplantes simulan el uso cotidiano del enjuague bucal *in vivo*.

20 **[0070]** Dichas observaciones muestran que las saponinas según la invención, y en concreto los extractos de solidago que comprenden saponinas y sin taninos según la invención, permiten que las *Candida* se mantengan en forma quiescente, no virulenta, lo que impide su desarrollo y en concreto su transformación en una forma patógena, pero no las erradica. Así, las saponinas según la invención tienen un efecto suave y duradero, no agresivo, creando un entorno que desfavorece el crecimiento de las *Candida*, sin someterlas a lisis y sin los efectos antimicrobianos debidos a los taninos. Ello permite que las composiciones según la invención se utilicen de forma prolongada, regular y sin provocar efectos secundarios nocivos.

#### **Ejemplo 2 – Impacto de diferentes extractos acuosos de solidagos, *Solidago virgaurea virgaurea* y *Solidago virgaurea minutalpestris* que contienen saponinas en *C. albicans* ATCC 10231**

30 **[0071]** Las solicitantes han realizado otro estudio sobre nueve cepas silvestres de *C. albicans* aisladas en el servicio de micología del centro hospitalario de Niza y una cepa de referencia ATCC 10231 (aisladas en el laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de cirugía dental, cultivadas en dos formas, lisa y rugosa), lo que hace un total de diez cepas cultivadas.

35 **[0072]** Se han observado la transformación de las levaduras *Candida* en filamentos (figura 3) y el diámetro de las colonias (figura 4) tras 72 h de crecimiento de los inóculos en placas de agar que contienen Sabouraud® / cloranfenicol y después se han diluido al 0,5 de McFarland con 100 µL de un medio glutamina RPMI («Roswell Park Memorial Institute medium»), enriquecido con glucosa 1M (Invitrogen, Paisley, Reino Unido).

40 **[0073]** Tal y como ilustra la figura 3a por medio de marcado con violeta cristal, la incubación durante 36 h con 50 µL de cloruro de sodio a 0,9 % en el medio provoca la transformación de las levaduras de *Candida* en filamentos miceliales.

**[0074]** El fenómeno es incluso más pronunciado en la figura 3b cuando el medio se acidifica a pH 4.

45 **[0075]** En las figuras 3c, 3d y 3e, el cloruro de sodio se reemplaza respectivamente por 50 µL de saponinas de cortezas de Quillaja a 250 mg/mL, de decocciones de extractos acuosos de *Solidago virgaurea virgaurea* o de *Solidago virgaurea minutalpestris*, obtenidos según la invención y que no contienen taninos.

**[0076]** La figura 3c muestra la erradicación del alargamiento de las levaduras de *Candida* por medio de las saponinas a una concentración elevada de 250 mg/mL induciendo la lisis de las células.

50 **[0077]** El reemplazo de las solución de cortezas de cortezas de Quillaja por las decocciones de extractos de solidagos inhibe del mismo modo la transformación de las levaduras de *Candida* en filamentos miceliales como los ilustrados en las figuras 3d y 3e.

**[0078]** Dicha inhibición guarda relación con la presencia de saponinas en los extractos de solidagos.

**[0079]** Dicha inhibición se ha observado para las diez cepas de *C. albicans* estudiadas e ilustradas en la figura 3 en *C. albicans* ATCC 10231r (forma rugosa).

- 5 **[0080]** Para medir el tamaño de las macrocolonias de *C. albicans*, las colonias obtenidas según las condiciones de la figura 3 se han trasplantado en placas de agar YEP que contienen agar YEP (agar a 22 g/L con extracto de levadura a 11 g/L, peptona a 22 g/L y glucosa a 20 g/L modificadas o no por la adición de medio que provoca la desfilamentación (saponinas o solución de solidagos). Las placas control sin saponina o decocción pueden acidificarse o no por medio de tampón citrato. Para obtener las macrocolonias, las placas de agar YEP anteriores en las que se desarrollan las diferentes cepas de *C. albicans* se pinchan con una pipeta capilar de 25 µm de diámetro y se inoculan en nuevas placas de agar YEP modificadas.
- 10 **[0081]** Se observa la disminución del tamaño de las macrocolonias por las condiciones de las figuras 4c, 4d y 4e correspondientes a una incubación con, respectivamente, las saponinas de cortezas de Quillaja a 250 mg/mL, las decocciones de extractos acuosos de *Solidago virgaurea virgaurea* o de *Solidago virgaurea minutalalpestris*, obtenidas según la invención y que no contienen taninos, con respecto a la condición control de la figura 4b en medio ácido.
- 15 **[0082]** El control en medio no ácido ilustrado en la figura 4a no muestra tal diferencia según este experimento.
- [0083]** Un estudio de este tipo pone de manifiesto la importancia del medio ácido en el tamaño de las macrocolonias y muestra el efecto de las saponinas en la disminución del tamaño de las macrocolonias.
- 20 **[0084]** Una disminución del tamaño de las colonias de este tipo puede guardar relación con el efecto de las saponinas en la inhibición de la transformación de las levaduras en filamentos miceliales de las *C. albicans*.
- 25 **[0085]** Estas observaciones confirman que las saponinas según la invención, y en concreto los extractos de solidagos que comprenden saponinas y sin taninos según la invención, permiten que las *Candida* se mantengan en forma quiescente, no virulenta, lo que impide su desarrollo y en concreto su transformación en una forma patógena, pero no las erradica. Así, las saponinas según la invención tienen un efecto suave y duradero, no agresivo, creando un entorno que desfavorece el crecimiento de las *Candida*, sin someterlas a lisis y sin los efectos antimicrobianos debidos a los taninos. Ello permite que las composiciones según la invención se utilicen de forma prolongada, regular y sin provocar efectos secundarios nocivos.

**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Composición que comprende un extracto de una planta solidago (*Solidago*) que comprende saponinas, **caracterizada por que** está sustancialmente libre de taninos, y **por que** las saponinas no han sido sometidas a lisis alcalina si el extracto de planta consiste en saponinas purificadas.
2. Composición según la reivindicación 1, **caracterizada por que** no comprende taninos.
- 10
3. Composición según la reivindicación 1 o 2, **caracterizada por que** se presenta en forma de enjuague bucal, dentífrico, gel, crema, leche, polvos, loción, pulverizador, jabón o cápsulas, y preferiblemente en forma de enjuague bucal.
- 15
4. Composición que comprende un extracto de una planta solidago (*Solidago*) que comprende saponinas y que no comprende sustancialmente taninos, para su uso cosmético para la higiene bucal, de la piel, de las mucosas, de las uñas o del cabello.
- 20
5. Composición que comprende un extracto de una planta solidago (*Solidago*) que comprende saponinas y que no comprende sustancialmente taninos, para su uso como medicamento.
6. Composición según la reivindicación 5, para su uso como medicamento en el tratamiento de las sequedad cutáneas y/o de la sequedad de las mucosas, y en concreto de la sequedad bucal.
- 25
7. Composición según la reivindicación 5 para su uso como medicamento en el tratamiento de las micosis, en concreto de las micosis cutáneas, bucales o anogenitales.
8. Composición según la reivindicación 5 para su uso como medicamento en el tratamiento de las infecciones bucodentales, principalmente las caries, la periodontitis, la lengua negra vellosa y la halitosis relacionadas con la sequedad bucal.
- 30
9. Procedimiento de obtención de un extracto de plantas, preferiblemente solidagos (*Solidago*), comprendiendo dicho extracto saponinas y no comprendiendo sustancialmente taninos, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:
- 35
- extracción de saponinas a partir de plantas, preferiblemente solidagos (*Solidago*); después
  - eliminación dirigida de los taninos.
- 40
10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado por que:**
- la etapa de extracción es una extracción acuosa, etanólica, metanólica, una extracción con cloroformo o incluso una extracción con éter de petróleo;
  - la etapa de extracción, en el caso de una extracción etanólica, metanólica, con cloroformo o con éter de petróleo, viene seguida de una etapa de eliminación del etanol, del metanol, del cloroformo o del éter de petróleo, por ejemplo por evaporación;
  - la etapa de eliminación dirigida de los taninos se lleva a cabo por precipitación de los taninos en presencia de proteínas, y preferiblemente en presencia de caseína.



Fig. 1

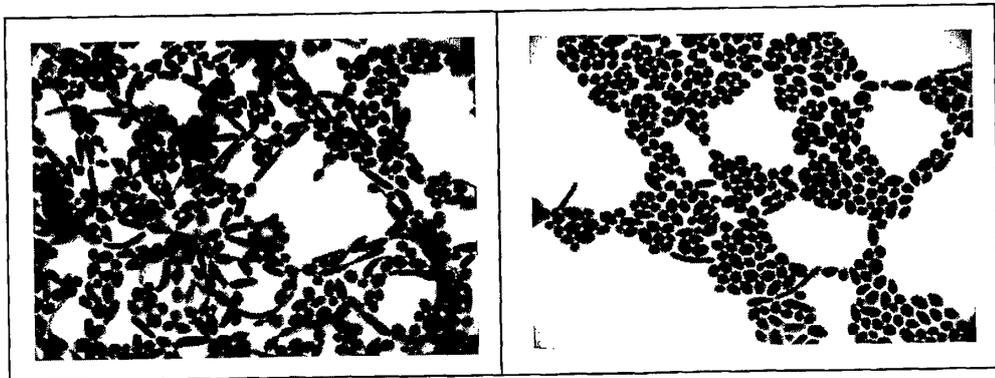
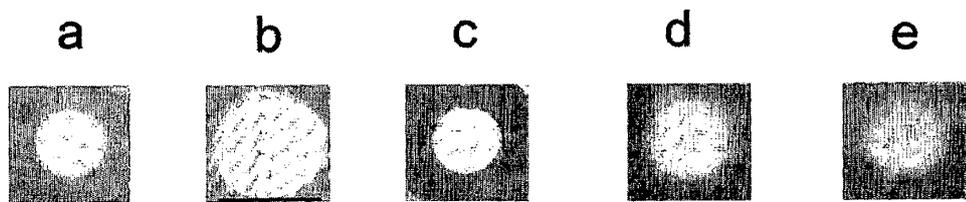


Fig. 2



Fig. 3



10 mm

Fig. 4