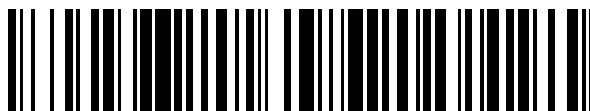


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 862**

51 Int. Cl.:

C09D 5/14 (2006.01)

C09D 5/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2009 PCT/IB2009/051945**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2009 WO09138950**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2009 E 09746245 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2285914**

54 Título: **Nuevos agentes antiadhesión microbiana respetuosos con el medio ambiente para pinturas antiincrustaciones y pinturas antiincrustaciones que los contienen**

30 Prioridad:

12.05.2008 IT TO20080348

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

23.04.2018

73 Titular/es:

**NANTO INC (100.0%)
50 Broad Street, Suite 816
New York, NY 10004, US**

72 Inventor/es:

**CALISTI, CECILIA;
ZANAROLI, GIULIO;
FAVA, FABIO;
BONTEMPI DI ROCCASPADA, ALESSANDRA y
RUZZI, MAURIZIO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 664 862 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

Nuevos agentes antiadhesión microbiana respetuosos con el medio ambiente para pinturas antiincrustaciones y pinturas antiincrustaciones que los contienen

5 La presente invención se refiere a un nuevo agente antiadhesión microbiana ecológicamente compatible basado en sustancias naturales, así como a pinturas antiincrustaciones que contienen tal agente antiadhesión microbiana.

10 Las pinturas antiincrustaciones conocidas contienen agentes antiincrustaciones, es decir, sustancias capaces de prevenir o impedir el fenómeno de las incrustaciones, es decir, la acumulación de microorganismos, plantas, animales o algas sobre las superficies de estructuras sumergidas, en particular cascos de buques. El término antiincrustaciones se desea que signifique la capacidad de una sustancia para retirar o prevenir la acumulación de los organismos y microorganismos anteriormente mencionados, sin tener en cuenta el modo y mecanismo por medio del que se alcanza tal fin.

15 Las sustancias usadas como agentes antiincrustaciones en las pinturas antiincrustaciones existentes para barcos de hecho presentan una actividad biocida de amplio espectro. Entre ellas, se mencionan en particular los compuestos orgánicos de estaño (tales como tributilestaño, TBT), compuestos cuprosos y compuestos que contienen mercurio. Sin embargo, estas sustancias exhiben el enorme inconveniente de ser tóxicas y de este modo perjudiciales para el medio ambiente.

20 La presente invención tiene el objetivo de superar los inconvenientes mencionados anteriormente, en particular los relacionados con la toxicidad de los agentes antiincrustaciones usados en las pinturas antiincrustaciones para barcos.

Tal objetivo se consigue gracias a la presente invención que proporciona una pintura antiincrustaciones ecológicamente compatible, caracterizada por comprender un agente antiadhesión microbiana seleccionado de entre el grupo que consiste en vainillina, benzaldehído sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de entre los grupos -OH (hidroxi) y -OCH₃ (metoxi), y sus mezclas.

25 Los derivados de benzaldehído preferidos son 4-hidroxibenzaldehído, 3,4-dihidroxibenzaldehído, 2,5-dimetoxibenzaldehído, 3,4-dimetoxibenzaldehído.

El agente antiadhesión microbiana como se define anteriormente está también dentro del alcance de la invención.

30 Una ventaja del agente antiadhesión de la invención es que no contiene sustancias tóxicas con poca o ninguna actividad biocida, pero sin embargo exhibe una apropiada actividad antiadhesión microbiana. Tales sustancias, por lo menos en el caso de la vainillina, son derivados naturales y de este modo perfectamente compatibles con el medio ambiente, es decir, biodegradables en hábitats y sedimentos marinos. Sin embargo, los derivados de benzaldehído también son no contaminantes y compatibles con el medio ambiente.

35 Debido a tales características de ecocompatibilidad, el agente antiadhesión microbiana de la invención es ventajosamente apropiado para ser usado en pinturas y en general en revestimientos antiincrustaciones destinados a ser aplicados a cascos de buques o cualquier superficie diseñada para estar en contacto continuo con el medio ambiente acuoso, es decir, agua da mar.

Además el agente antiadhesión microbiana, generalmente una pintura antiincrustaciones comprende disolventes, resinas, pigmentos, cargas y rellenos y otros aditivos opcionales.

40 La pintura antiincrustaciones de la invención comprende el agente antiadhesión microbiana en una cantidad preferentemente de 3 a 30% en peso, incluso más preferentemente de 5 a 20% en peso. Las concentraciones que exceden del 30% podrían cambiar las propiedades químico-físicas y la estabilidad de la pintura.

45 Las resinas que se pueden usar en la pintura antiincrustaciones de la invención son, por ejemplo, resinas vinílicas, resinas acrílicas, resinas epoxi, resinas naturales tales como colofonia y ésteres de colofonia. El contenido de resina en la pintura es preferentemente de 5 a 40% en peso, incluso más preferentemente de 10 a 30% en peso. Las concentraciones por debajo de 5% pueden no garantizar la adhesión y la apropiada formación de la película de pintura.

Los disolventes que se pueden usar en la pintura antiincrustaciones de la invención son, por ejemplo, disolventes hidrocarbonados tales como xilitol y nafta, acetatos tales como acetato de metoxipropilo, alcoholes tales como alcohol etílico y alcohol isobutílico. El contenido de disolvente en la pintura es preferentemente de 10 a 45% en peso. Un contenido de disolvente por debajo de 10% podría determinar viscosidades extremadamente altas.

50 Los pigmentos que se pueden usar en la pintura antiincrustaciones de la invención, son por ejemplo, óxidos metálicos tales como dióxido de titanio, óxidos de hierro y pigmentos orgánicos. El contenido de pigmento en la pintura es preferentemente de 10 a 30% en peso.

Las cargas y rellenos que se pueden usar en la pintura antiincrustaciones de la invención, son por ejemplo, óxido de zinc, carbonato de calcio y talco. El contenido de las cargas de relleno en la pintura es preferentemente de 3 a 30% en peso, usadas solas o mezcladas.

5 Otros aditivos opcionales que se pueden usar en la pintura antiincrustaciones de la invención son agentes humectantes dispersantes, tales como lecitina de soja, agentes inductores del tropismo de los tejidos tales como bentonita, agentes estabilizantes tales como aceite de soja epoxidizado. El contenido de estos aditivos está preferentemente en el intervalo de 0,1 a 3% en peso, usados solos o mezclados.

10 Los experimentos llevados a cabo por los inventores, ilustrados en detalle en la sección experimental siguiente, han indicado también de modo impredecible que se puede obtener un efecto sinérgico por el uso, en una pintura antiincrustaciones del tipo ilustrado previamente, de una combinación de varios agente antiincrustaciones de la invención o una combinación de un agente antiadhesión de la invención y un agente biocida convencional.

A modo de ejemplo no limitante, los agentes biocidas convencionales apropiados para ser usados en combinación con un agente antiadhesión microbiana de la invención son los siguientes:

15 - piritona de zinc (bis(1-hidroxi-2-(1H)-piridinationato-O,S)-(T-4)zinc) (CAS 13463-41-7), comercialmente disponible de Arch con el nombre de Zinc Omadine;

- piritona de cobre (bis(1-hidroxi-1H-piridina-2-tionato-O,S)cobre) (CAS 14915-37-8), disponible comercialmente de Arch con el nombre de Copper Omadine;

- etilen-bisditiocarbamato de zinc ([[2-[(ditiocarboxi)amino]etil]carbomoditioato]](2)-kS,kS']zinc) (CAS 12122-67-7), disponible comercialmente con el nombre de Zineb;

20 - toliifluanida (N-diclorofluorometiltio-N,N'-dimetil-N-p-tolil-sulfamida) (CAS 731-27-1), disponible, por ejemplo, de Bayer con el nombre de Preventol A5;

- diclofluanida (N-diclorofluorometiltio-N,N'-dimetil-N-fenilsulfamida) (CAS 1085-98-9), disponible, por ejemplo, de Bayer con el nombre de Preventol A4S;

25 - 4,5-dicloro-2-N-octil-4-isotiazolin-3-ona (CAS 64359-81-5), disolución al 30% de la sustancia activa disponible, por ejemplo, de Rohm and Haas con el nombre de Sea-Nine 211;

- N'-terc-butil-N-ciclopropil-6-(metiltio)-1,3,5-triazina-2,4-diamina (CAS 028159-98-0), disponible, por ejemplo, de Ciba con el nombre de IRGAROL 1051.

30 La sección experimental a continuación, proporcionada meramente a modo de ilustración y no de limitación, demuestra las propiedades de inhibición de la formación de biopelícula de los agentes antiadhesión microbiana de la invención y de las pinturas antiincrustaciones que contienen tales agentes antiadhesión microbiana.

Sección experimental

El efecto del agente antiadhesión microbiana de la invención sobre la adhesión y el crecimiento microbiano se ha estimado usando poblaciones mixtas de bacterias marinas biofilmógenas aisladas del mar Tirreno (M1), del mar Adriático (T1-T5) y de un filtro de acuario usado (F1).

35 Los ensayos se realizaron con eugenol (no según la invención), vainillina y derivados de benzaldehído en la forma libre (ejemplo 1) y con eugenol (no según la invención) y vainillina formulados en pinturas antiincrustaciones desprovistas de agentes antiincrustaciones habituales. (ejemplo 2).

La información dada en las leyendas de las figuras de arriba a abajo se debe trasladar de izquierda a derecha en las figuras respectivas.

40 Ejemplo 1: Ensayos con los compuestos en forma libre

Los ensayos con los compuestos en forma libre se llevaron a cabo usando:

- eugenol en una concentración en el intervalo de 0,5 a 4 g/l, solubilizado en un disolvente orgánico (metanol) (no según la invención);

- vainillina en una concentración en el intervalo de 0,1 a 5 g/l;

45 - derivados de benzaldehído en una concentración de 2 g/l.

La formación de la biopelícula se evaluó, de un modo indirecto, midiendo la cantidad de violeta cristal retenida por las células cultivadas de forma adherente.

Los ensayos se realizaron en microplacas de 24 pocillos inoculadas con bacterias marinas de biopelículas de cultivos cultivados en condiciones estáticas durante 2 semanas. El efecto de los compuestos se determinó cultivando los microorganismos (inicio $OD_{600} = 0,5$) en agua de mar sintética (Tropic Marin Sea Salt; 33 g/l) complementado con extracto de levadura (3 g/l) y peptona fúngica (5 g/l). Después de la inoculación, las placas se incubaron a 20°C durante 5 días antes de evaluar la formación de una biopelícula (OD_{570}) y el crecimiento de plancton (OD_{600}). La biopelícula se estimó después de teñir con violeta cristal.

Eugenol (no según la invención)

La inhibición de los experimentos de adhesión se llevó a cabo en microplacas de 24 pocillos usando concentraciones de eugenol comprendidas entre 0,5 y 4 g/l. La disolución patrón de eugenol se obtuvo por disolución de 2 ml del compuesto en 3 ml de metanol y 5 ml de una disolución de NaOH 10M. Las placas de control se prepararon añadiendo el mismo volumen de disolución hidroalcohólica sin eugenol. Los resultados mostrados en la Figura 1 se obtuvieron usando la población M1. Los ensayos se repitieron posteriormente con las 7 poblaciones, usando una concentración de eugenol de 0,5 g/l. Los resultados (Figura 2) muestran que el eugenol produce una reducción de alrededor del 50% en la formación de biopelículas con todas las poblaciones, excepto para T3, en la que el eugenol tiene un efecto leve (inhibición de alrededor del 15%) y para F1, cuya inhibición es de alrededor del 60%.

Vainillina

Con el fin de estimar la efectividad de la vainillina como inhibidor de la formación de una biopelícula, se prepararon varios ensayos en microplacas con concentraciones crecientes de vainillina, comprendidas entre 0,1 y 5 g/l. Los ensayos, que se realizaron usando células biofilmógenas de las poblaciones T1 (Figura 3a), M1 y T2 (Figura 3b), M1 (Figura 4), M1, T1-T5 y F1 (Figura 5), muestran que la vainillina, en concentraciones por encima de 1 g/l, inhibe la adhesión de microorganismos a superficies sólidas. Este efecto de inhibición persiste incluso después de 10 días de incubación (Figura 4). Los ensayos de inhibición se repitieron en todas las 7 poblaciones disponibles, usando concentraciones de vainillina de 2 y 3 g/l. Los resultados obtenidos (Figura 5) muestran que la vainillina, a las concentraciones usadas, provoca una reducción en la adhesión microbiana comprendida entre 50 y 70%.

Derivados de benzaldehído

Se realizaron varios ensayos con los compuestos benzoicos sustituidos de forma diferente indicados en la Figura 6. Tales ensayos demostraron que los compuestos ensayados inhiben la adhesión microbiana con una efectividad comparable a la de la vainillina.

30 Ejemplo 2: Ensayos con pinturas antiincrustaciones

Se evaluó la efectividad de las pinturas complementadas con los agentes antiadhesión microbiana de la invención para inhibir el crecimiento adherente de las bacterias marinas usadas en los ensayos anteriores. La formación de una biopelícula (OD_{570}) se estimó mediante el ensayo espectrofotométrico de microplacas (24 pocillos) descrito anteriormente.

35 Se añadieron vainillina y eugenol a una pintura desprovista de cualquier compuesto antiincrustaciones a 3 concentraciones diferentes: 5 g, 100 g, y 200 g por kg de pintura.

Se llevaron a cabo ensayos paralelos usando microplacas pintadas con un producto comercial antiincrustaciones (Veneziani Raffaello bianca racing) y microplacas no pintadas. La pintura de control Veneziani Raffaello es una pintura antiincrustaciones hidrófila caracterizada por un alto contenido de sulfocianuro de cobre $CuSCN$ y por la presencia de diclofluanida y partículas de "carbono puro".

40 Las pinturas a ensayar se aplicaron solo sobre la superficie lateral (que corresponde a alrededor de $8,8 \text{ cm}^2$), evitando pintar el fondo de los pocillos. Las placas, después de ser pintadas, se mantuvieron durante 2 días a 20°C, en un medio seco y ventilado, antes de ser usadas para el ensayo de adhesión. Las placas se inocularon con una suspensión de células con una densidad óptica (medida a 600 nm) de 0,5 unidades de absorbancia, se mantuvieron en incubación estática, en la oscuridad, durante 5 días a 20°C. Cinco días después, las microplacas se drenaron y se determinó el crecimiento de la población de plancton mediante una evaluación espectrofotométrica del incremento en la absorbancia del medio de incubación. La detección y cuantificación de una formación de biopelícula microbiana se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico. La velocidad de liberación de biocida en condiciones estáticas se calculó midiendo, por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), los incrementos en el tiempo de la concentración de biocida en el medio líquido. Para cada biocida, se prepararon 5 microplacas:

- 1 microplaca no tratada;

- 1 microplaca tratada con una pintura antiincrustaciones comercial;

- 1 microplaca tratada con una pintura complementada con 50 g de agente antiadhesión microbiana por kg de pintura;

- 1 microplaca tratada con una pintura complementada con 100 g de agente antiadhesión microbiana por kg de pintura;

5 - 1 microplaca tratada con una pintura complementada con 200 g de agente antiadhesión microbiana por kg de pintura.

Pinturas complementadas con eugenol

(ejemplo no según la invención)

10 El tratamiento de protección de las superficies contra las incrustaciones microbianas se realizó usando tres fórmulas que contienen 50 g (E50), 100 g (E100) y 200 g (E200), respectivamente, de eugenol por kg de pintura. Se realizaron pruebas preliminares para evaluar la efectividad del eugenol como agente antiadhesión microbiana con la pintura complementada con 100 g de eugenol/kg de pintura usando las 7 poblaciones mixtas de microorganismos marinos biofilmógenos M1, T1-T5 y F1.

15 Los resultados obtenidos muestran que las pinturas complementadas con eugenol impiden más efectivamente la formación de biopelícula microbiana en comparación con el producto comercial. Este resultado es independiente del tipo de población microbiana usada para el ensayo biológico (Figura 7) y también se puede ver a la concentración más baja considerada. En las Figuras 7 y 8, las actividades relativas se refieren a la pintura de control (Veneziani Raffaello). Las actividades relativas más altas corresponden a pinturas que son más eficientes.

20 Los resultados obtenidos muestran que el eugenol se puede usar como un agente antiadhesión microbiana en pinturas marinas, por el hecho de que previene, de un modo sustancial, la adhesión de células bacterianas a las superficies tratadas (Figura 7). Al usar 50 g de eugenol por kg de pintura, se consigue un crecimiento adherente reducido de 1,2-3,2 veces de las bacterias marinas en comparación con el producto comercial (Figura 8).

Pinturas complementadas con vainillina

25 El tratamiento de protección de las superficies contra las incrustaciones microbianas se realizó usando tres fórmulas que contienen 50 g (V50), 100 g (V100) y 200 g (V200), respectivamente, de vainillina por kg de pintura.

30 Los resultados obtenidos (Figura 9) muestran que las pinturas complementadas con vainillina impiden más efectivamente la formación de biopelículas microbianas en comparación con el producto comercial. La actividad de antiadhesión microbiana es detectable en las 3 poblaciones microbianas consideradas. En esta figura, las actividades relativas se refieren a la pintura de control (Veneziani Raffaello). Las actividades relativas más altas corresponden a pinturas que son más eficientes.

Los resultados obtenidos muestran que la vainillina se puede usar como un agente antiadhesión microbiana en pinturas marinas por el hecho de que previene, de un modo sustancial, la adhesión de células bacterianas a las superficies tratadas. Al usar 50 g de vainillina por kg de pintura, se consigue un crecimiento adherente reducido de 1,5-15,8 veces de las bacterias marinas en comparación con el producto comercial (Figura 9).

35 La liberación de vainillina tiene un efecto reducido sobre el crecimiento del plancton de las tres poblaciones usadas en los ensayos biológicos (Figura 10). Este resultado indica que el efecto de la vainillina sobre el crecimiento adherente de los microorganismos no es provocado por la inhibición del crecimiento del plancton. En la Figura 10, los incrementos de absorbancia (OD_{600}) se expresan como valores relativos en comparación con las muestras no tratadas (no pintadas).

40 Ensayos adicionales llevados a cabo con pinturas complementadas con vainillina que liberan el agente antiadhesión microbiana a diferentes velocidades evidenciaban que una liberación lenta de vainillina en la fase acuosa permite obtener una pintura antiincrustaciones que es más estable en el tiempo (Figura 11). En la figura, la actividad antiadhesión microbiana se refiere a la actividad más alta determinada para cada fórmula, expresada como 100%.

Pinturas complementadas con mezclas de agentes antiadhesión microbiana

45 Al agregar 52,5 g de 3,4-dimetoxibenzaldehído a 1 kg de pintura que contiene 52,5 g de vainillina, se consigue un crecimiento adherente reducido del 50-60% de bacterias marinas en comparación con el producto que contiene solo vainillina (Mezcla; Figura 12).

50 La adición de vainillina (52,5 g) y 3,4-dimetoxibenzaldehído (52,5 g) a 1 kg de pintura artificial que contiene 52,5 g de piritona de zinc (Z52,5 + Mezcla) permite obtener una pintura antiincrustaciones que previene de manera más efectiva, en 4-8 veces, la adhesión de células bacterianas a las superficies tratadas, en comparación con el producto que contiene solo piritona de zinc (Z52,5; Figura 12). En esta figura, la formación de biopelícula se expresa como un porcentaje de la cantidad de biopelícula detectada en la superficie tratada con la pintura que contiene 52,5 g de vainillina por kg de producto (100%). Una formación reducida de biopelícula (porcentajes más bajos) es indicativa de

una mayor efectividad de la pintura.

Pinturas complementadas con combinaciones de los agentes antiadhesión microbiana de la invención y biocidas convencionales

5 Se preparó una pintura antiincrustaciones mezclando los componentes indicados en el ejemplo 2, que incluyen vainillina, con piritiona de zinc (CAS N°. 13463-41-7). Se usaron piritiona de zinc (Z) y vainillina (V) en la pintura con una relación de peso de 1:1, en dos concentraciones diferentes: 40 g (Z40 + V40) y 52,5 g (Z52,5 + V52,5) por kg de pintura. Se usó como control una pintura antiincrustaciones desprovista de vainillina y que contiene solo piritiona de zinc (Z52,5; 52,5 g de biocida por kg de pintura).

10 Los resultados obtenidos (Figura 13) muestran que las pinturas complementadas con vainillina, a las dos concentraciones examinadas (40 y 52,5 de vainillina por kg de producto), impiden la formación de una biopelícula de modo más efectivo que la que contiene solo piritiona de zinc (Z52,5).

15 La mejora de la actividad antiincrustaciones de la pintura por la vainillina es detectable con las dos poblaciones microbianas ensayadas (M1 y T1), incluso reduciendo la concentración de piritiona de zinc de 52,5 a 40 g por kg de pintura (Figura 13). En esta figura, la formación de biopelícula se expresa como un porcentaje de la cantidad de biopelícula detectada sobre la superficie tratada con la pintura que contiene piritiona de zinc (100%). Una formación reducida de biopelícula (porcentajes más bajos) es indicativa de una mayor efectividad de la pintura.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una pintura antiincrustaciones que comprende un agente antiadhesión microbiana ecológicamente compatible que comprende un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en vainillina, benzaldehído sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados de entre los grupos -OH (hidroxi) y -OCH₃ (metoxi), y cualquiera de sus combinaciones, en combinación con por lo menos un componente adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en biocidas, disolventes, resinas, pigmentos, cargas, rellenos convencionales y cualquiera de sus combinaciones.
- 10 2. La pintura antiincrustaciones según la reivindicación 1, en la que el agente antiadherente microbiano comprende un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en vainillina, 4-hidroxibenzaldehído, 3,4-dihidroxibenzaldehído, 2,5-dimetoxibenzaldehído, 3,4-dimetoxibenzaldehído y cualquiera de sus combinaciones.
- 15 3. La pintura antiincrustaciones según la reivindicación 1 o 2, en la que los biocidas convencionales se seleccionan de entre el grupo que consiste en piritiona de zinc, piritiona de cobre, etilen-bisditiocarbamato de zinc, toliilfluánida, diclofluánida, 4,5-dicloro-2-N-octil-4-isotiazolin-3-ona, N'-terc-butil-N-ciclopropil-6-(metiltio)-1,3,5-triazin-2,4-diamina y cualquiera de sus combinaciones.
4. La pintura antiincrustaciones según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende entre 3 y 30% en peso de agente antiadhesión microbiana.
5. La pintura antiincrustaciones según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende entre 5 y 40% en peso de resina.
- 20 6. La pintura antiincrustaciones según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende entre 10 y 45% en peso de disolvente.
7. La pintura antiincrustaciones según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende entre 10 y 30% en peso de pigmento.
- 25 8. La pintura antiincrustaciones según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende entre 3 y 30% en peso de cargas de relleno.
9. El uso de una pintura antiincrustaciones según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para pintar un barco.

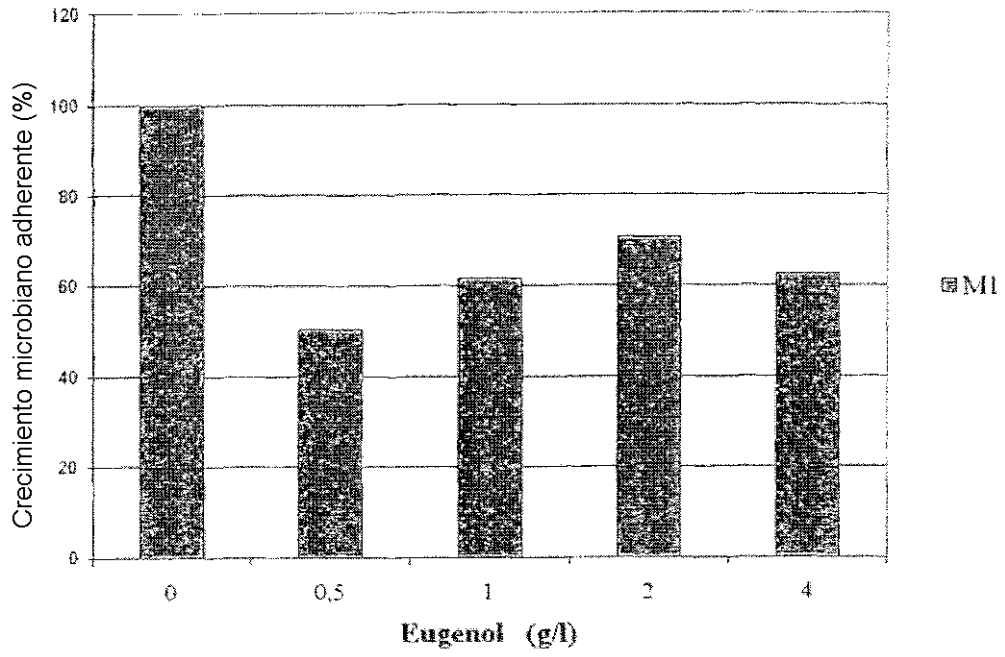


Figura 1

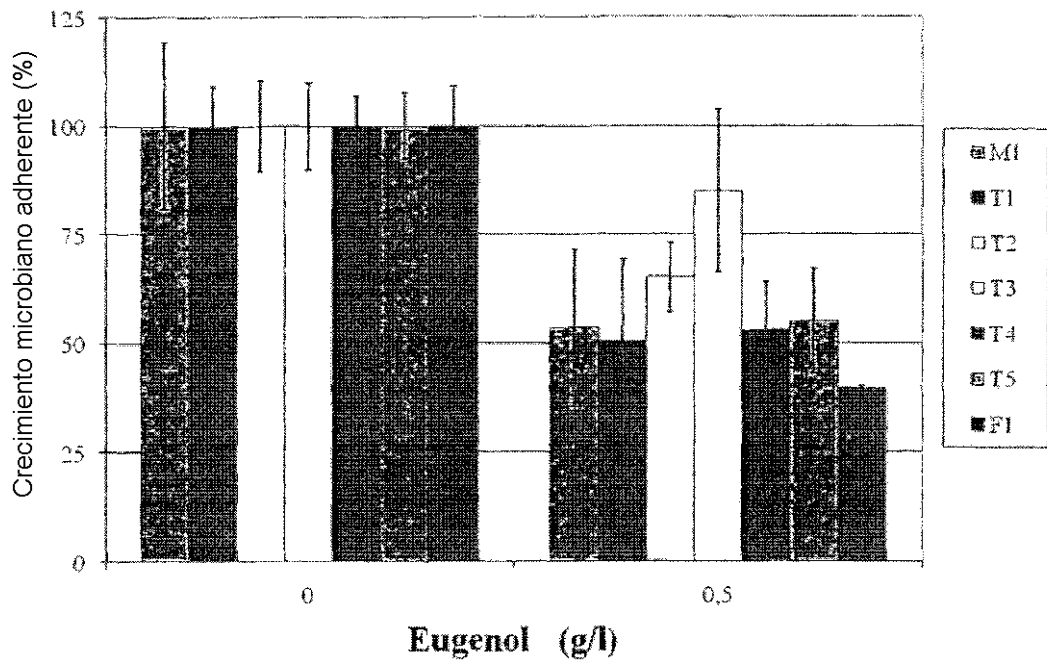


Figura 2

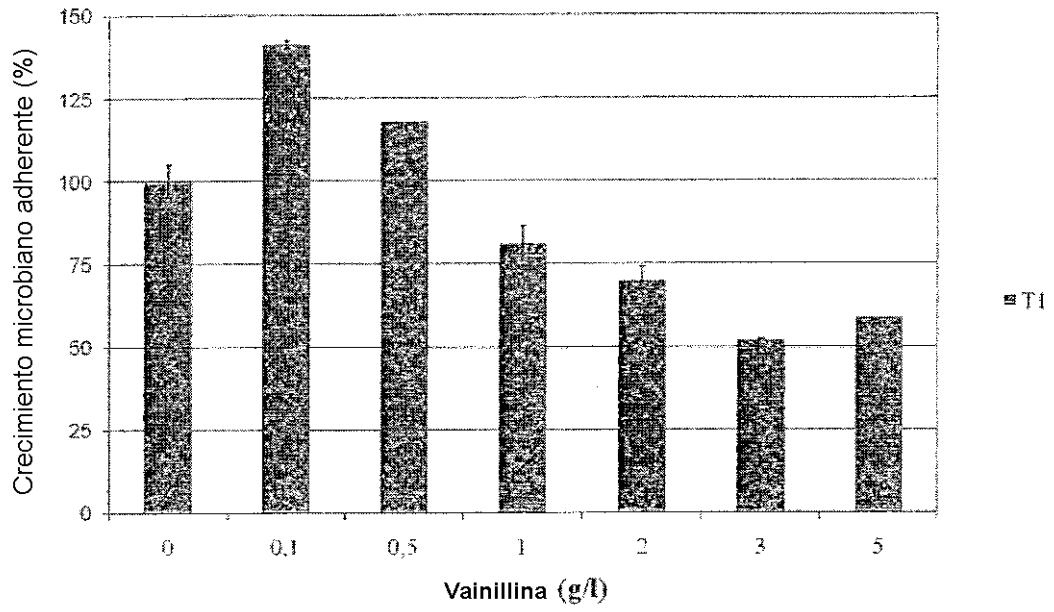


Figura 3a

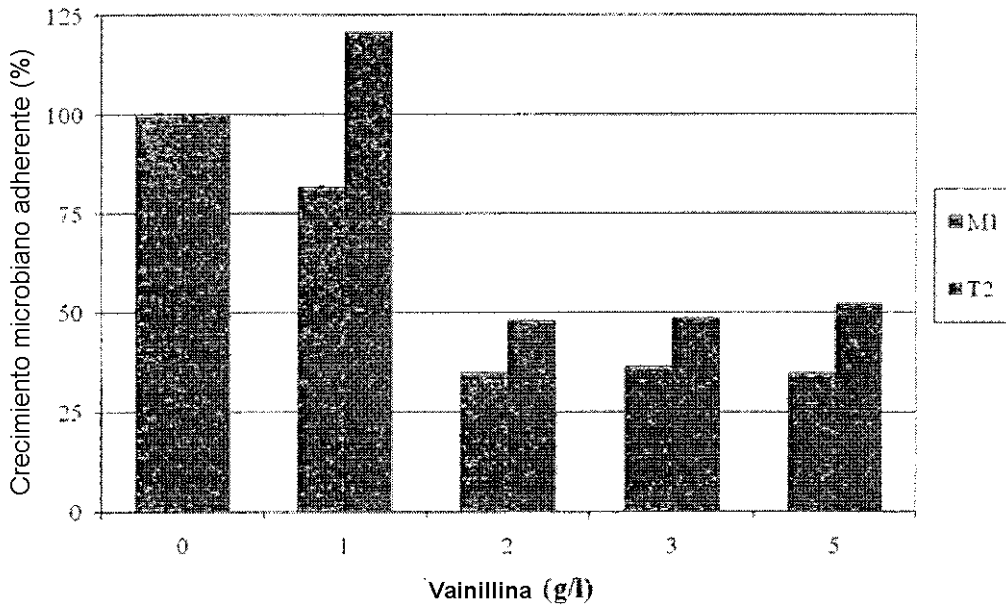


Figura 3b

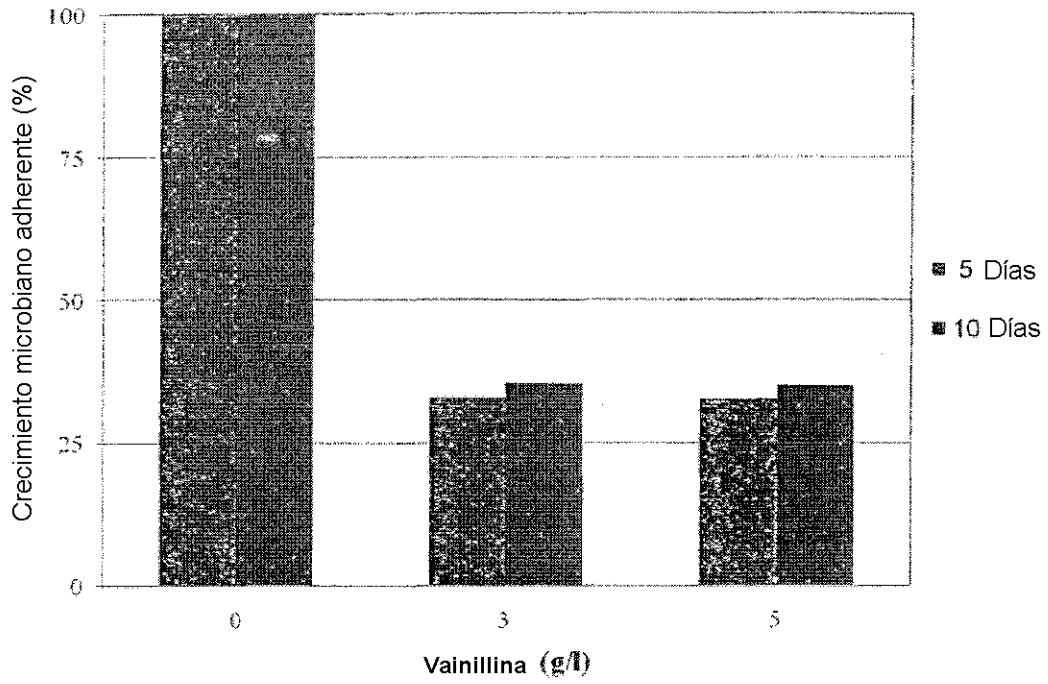


Figura 4

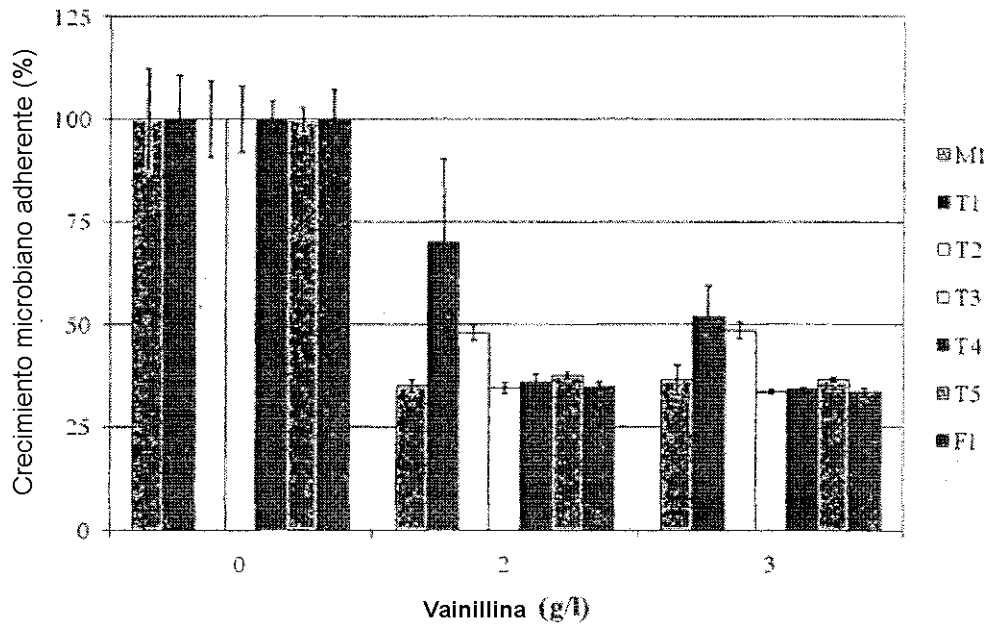


Figura 5

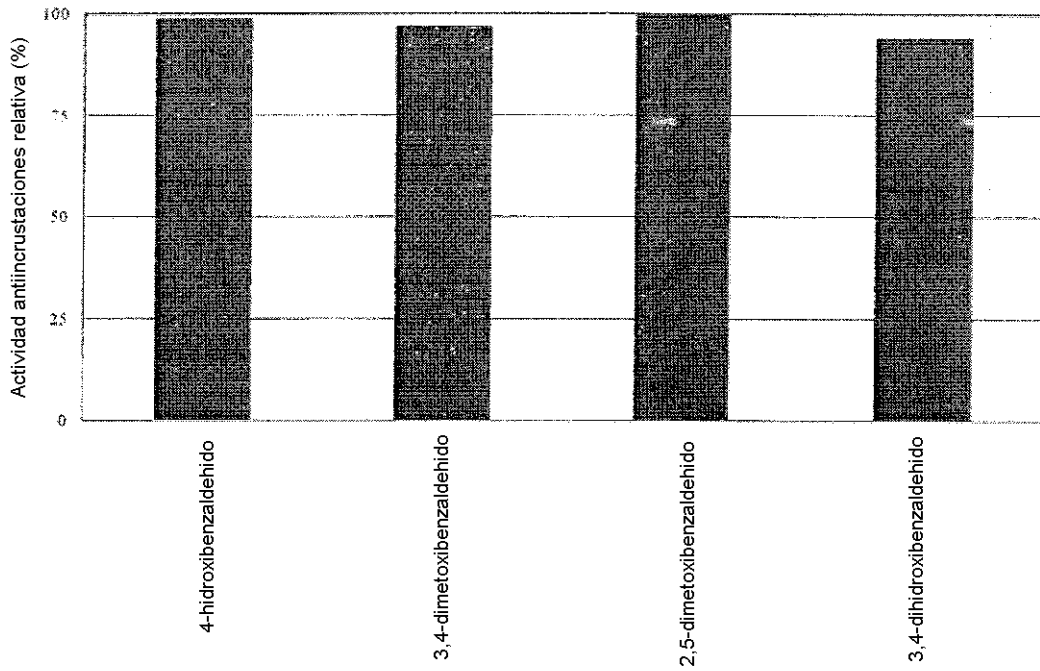


Figura 6

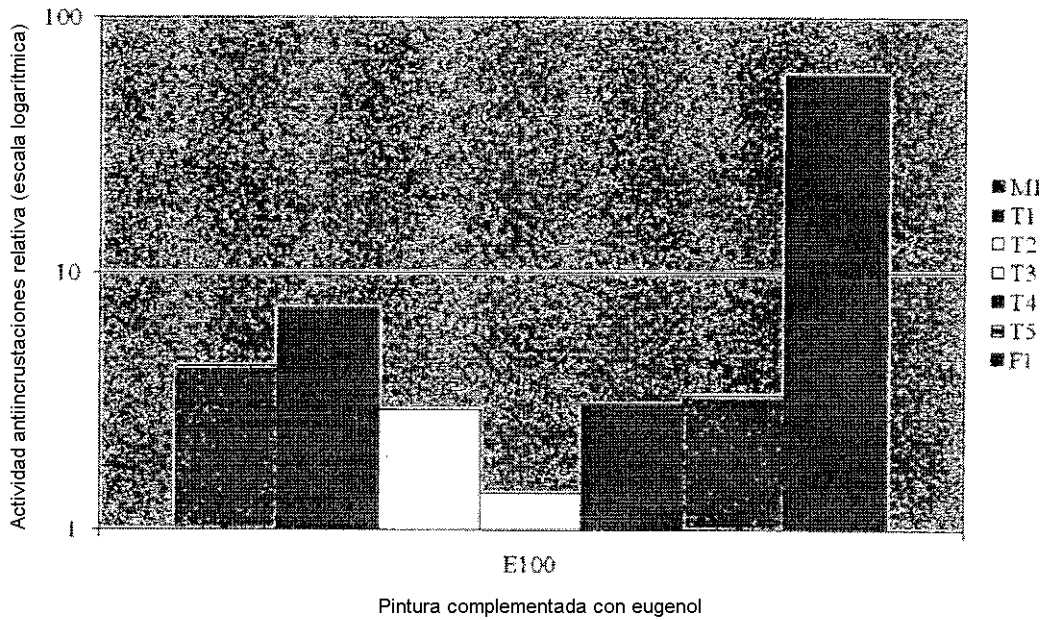
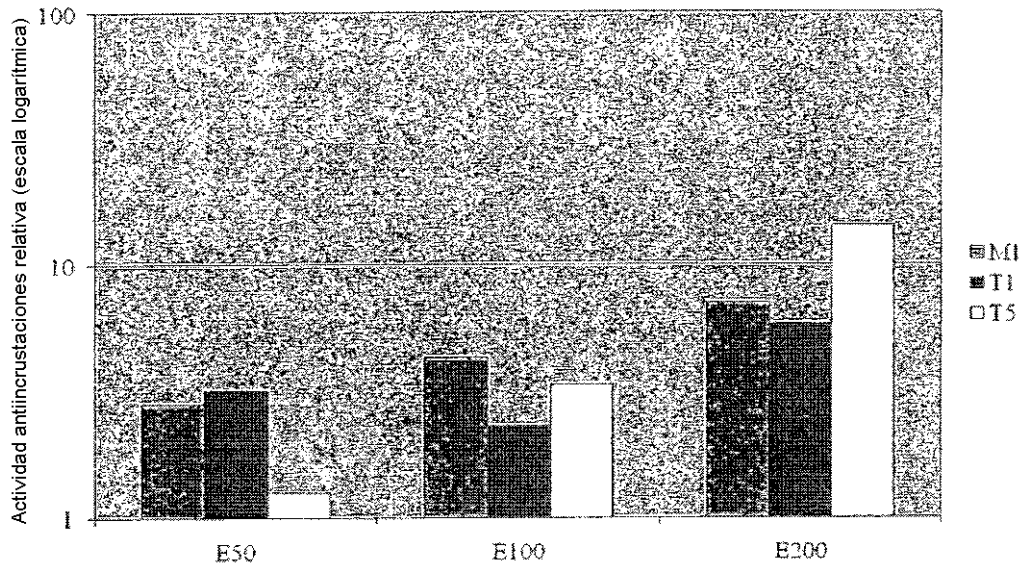
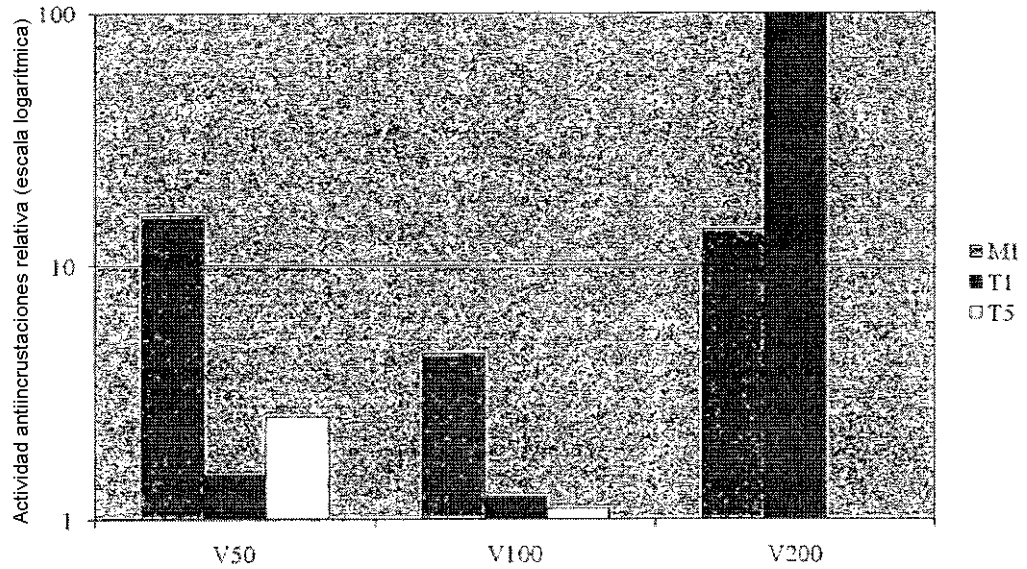


Figura 7



Pintura complementada con eugenol

Figura 8



Pintura complementada con vainillina

Figura 9

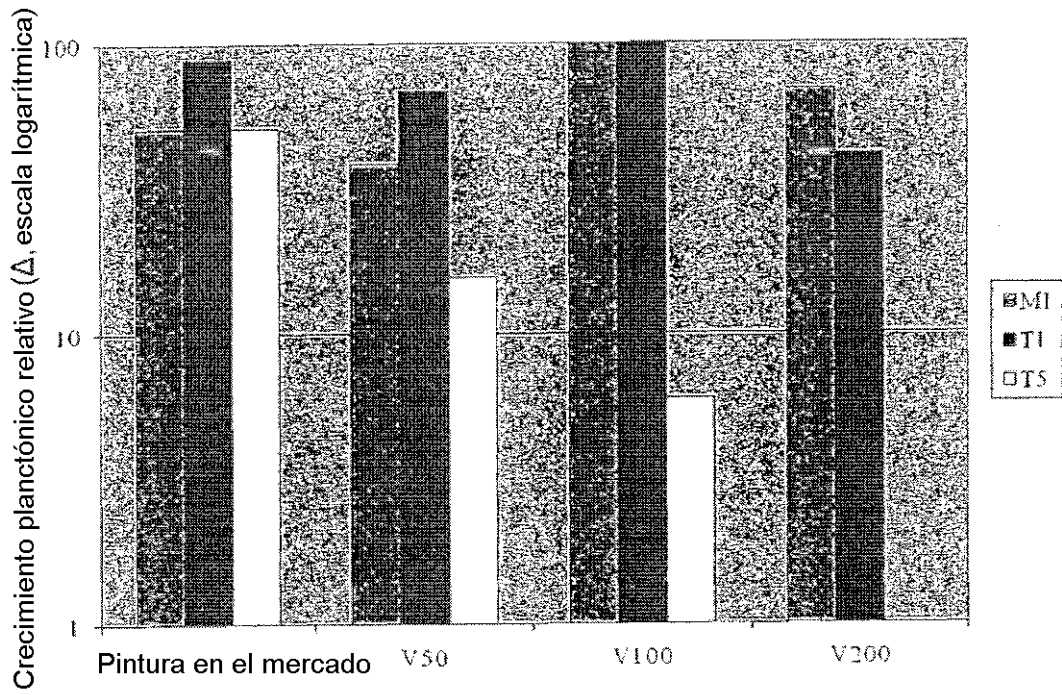


Figura 10

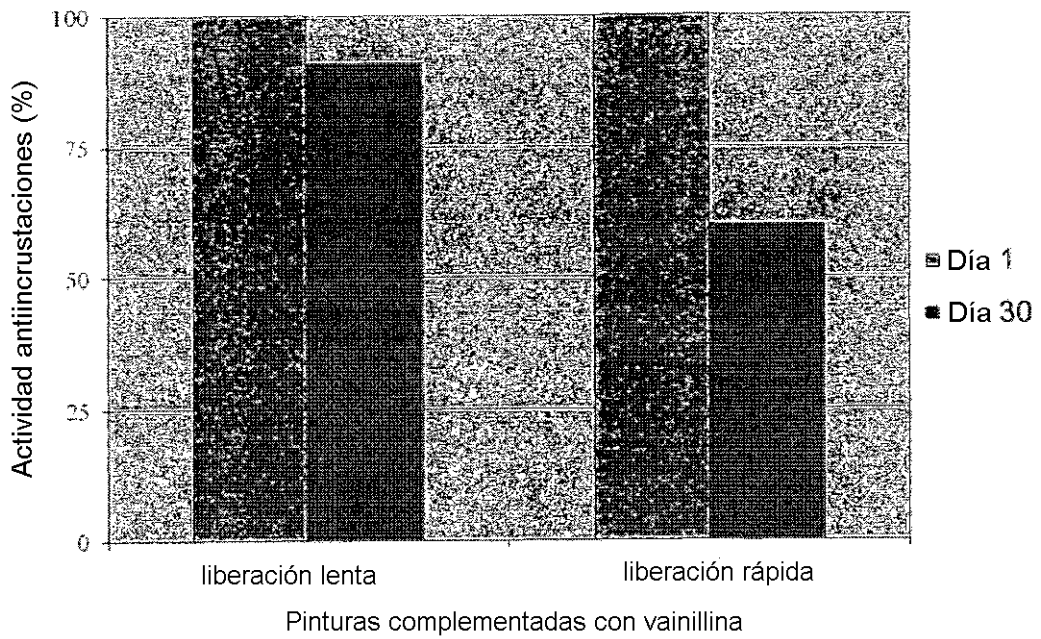


Figura 11

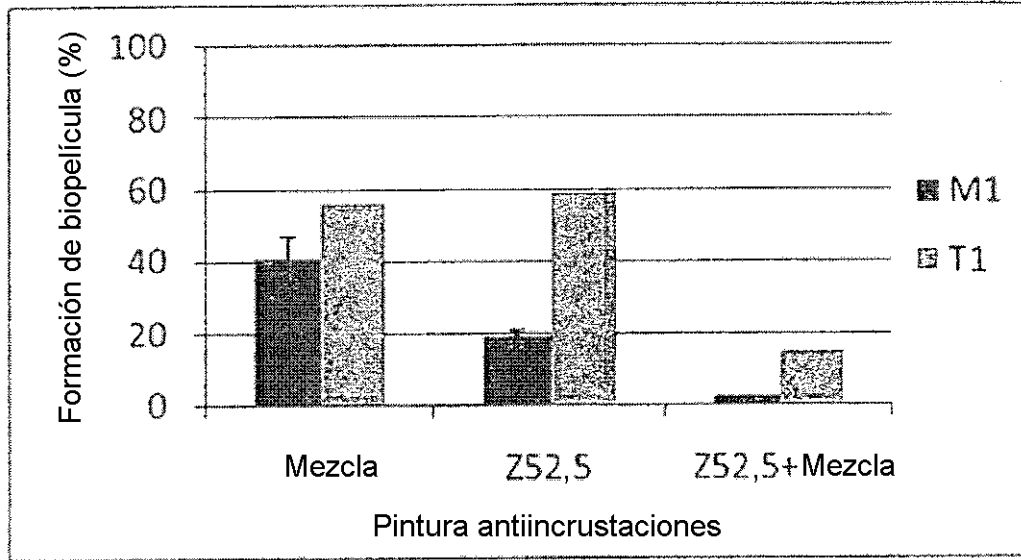


Figura 12

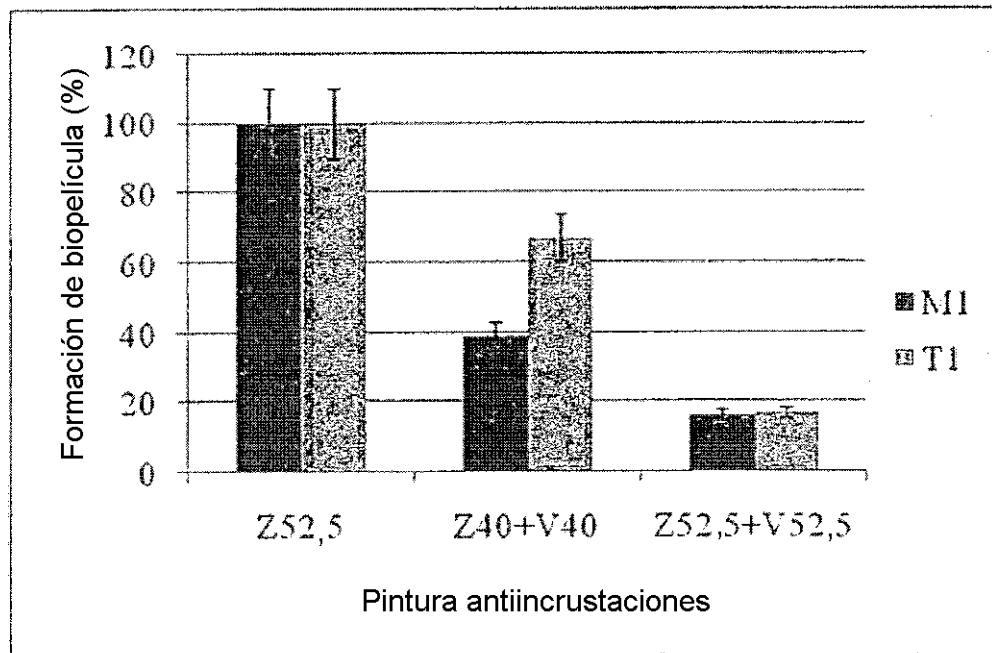


Figura 13