

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 223**

51 Int. Cl.:

A61K 33/08 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61P 15/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2016 E 16455004 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 3167891**

54 Título: **Tratamiento de la vaginitis**

30 Prioridad:

12.11.2015 EP 15194288

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

09.07.2019

73 Titular/es:

**GLOCK HEALTH, SCIENCE AND RESEARCH
GMBH (100.0%)
Hausfeldstraße 17
2232 Deutsch Wagram, AT**

72 Inventor/es:

GLOCK, GASTON

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 719 223 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

Tratamiento de la vaginitis

La invención se refiere al tratamiento de micosis vaginales, vaginosis bacteriana y otras formas de la vaginitis (inflamación de la vagina) de manera correspondiente a la reivindicación 1.

5 A partir del documento WO 00/64586 se conoce un dispositivo y un procedimiento relacionado con el mismo para el desmenuzamiento de material mineral, del cual en lo que sigue se enumeran de manera superficial en qué enfermedades puede ser empleado con éxito, no quedando excluida casi ninguna enfermedad. Se dieron algunas referencias en cuanto a ensayos correspondientes a enfermedades carcinógenas, enfermedades hepáticas, diabetes, esclerosis múltiple, sin indicación alguna sobre la organización a llevar a cabo o cualesquiera otros
10 detalles. Otros sectores de aplicación mencionados son la preparación de alimentos, de cosméticos, de agentes fitoprotectores, de cigarrillos y materias primas en la industria de la construcción. El dispositivo descrito consigue desmenuzar más del 98% de todas las partículas a un tamaño menor que 4,3 μm , siendo más del 28% de todas las partículas menores que 0,5 μm . Estos datos no tienen relación alguna con los de la aplicación.

15 Del mismo autor de la invención procede el documento WO 2007/054085, el cual da a conocer que por debajo de 100 nanómetros, correspondientes a 0,1 μm , emplear clinoptilolita desmenuzada con própolis y/o calostro como agente antivírico, entre otros para el tratamiento de la gripe, resfriado, catarro, sarampión, paperas, rubeola, eritema infeccioso, fiebre de tres días, varicela, fiebre ganglionar de Pfeiffer, SARS, citomegalia, diarrea, hepatitis, poliomielitis, herpes labial, verrugas, rabia, fiebre de Lassa, ébola, fiebre de Marburg, fiebre del virus Hanta, FSME, RSSE, encefalomielitis ovina, encefalitis de Powassan, fiebre del bosque Kyasanur, fiebre hemorrágica de Omsk,
20 fiebre por garrapata del Colorado, fiebre amarilla, fiebre del dengue, encefalitis japonesa, fiebre del oeste del Nilo, fiebre de Chikungunya, fiebre de Q'nyong-nyong, fiebre del valle del Rif, fiebre de Sandbacken, fiebre de río Ross, fiebre por sindbis, fiebre Mayaro, encefalitis del valle Murray, encefalitis de St. Louis, encefalitis de Rocio, encefalitis de California, fiebre de Bunyamwera, fiebre de Oropouche, SIDA, herpes genital y/o herpes simplex. En el transcurso del "tratamiento" del SIDA se menciona, como cuadro clínico que se manifiesta, entre muchos otros,
25 también la candidiosis vaginal. No se mencionan ensayos clínicos, todo esto es un puro sueño.

El documento WO 2008/003101 del autor de la presente solicitud da a conocer un procedimiento para la purificación de clinoptilolita de metales pesados.

30 El documento WO 2010/057849 describe la mejora de la cicatrización mediante la aplicación de clinoptilolita desmenuzada, la cual reduce la concentración de aminos. Sin una referencia más detallada con respecto a las distintas aplicaciones, se mencionan tamaños de partículas de 2 a 16 μm , que también han de disponer de un potencial zeta predeterminado y de una superficie específica predeterminada, no se indican métodos de medición. Como ejemplos se indican exclusivamente ensayos in vitro con soluciones acuosas con contenido en amina preparadas de forma artificial.

35 A partir del documento EP 956 858 es conocido que las bacterias probióticas son útiles en el tratamiento de infecciones vaginales.

En general, se ha de detallar lo siguiente:

40 En un caso (sano) típico el microbioma vaginal de la mujer que ha alcanzado la madurez sexual se compone en su mayor parte de diferentes lactobacilos (en función del origen étnico *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii*), los cuales procuran, entre otros, un valor del pH óptimo y suprimen el crecimiento de agentes patógenos. Bajo la influencia de diferentes factores medioambientales, la flora vaginal natural es atacada y puede producirse, como consecuencia de un desequilibrio (disbiosis), un aumento excesivo de gérmenes patógenos.

Es objetivo y misión de la invención indicar un tratamiento que, por una parte, combata de manera lo más eficaz posible los gérmenes patógenos y que, por otra parte, proteja en lo posible a los lactobacilos útiles.

45 Este problema de acuerdo con la invención se resuelve mediante las características indicadas en la reivindicación 1; con otras palabras, se emplea una clinoptilolita que presenta un tamaño de partículas entre 0,2 y 10 μm de forma local (externa) para el tratamiento de enfermedades vaginales, tales como la vaginosis bacteriana, la candidiasis vulvovaginal y tricomoniasis de mamíferos y seres humanos, así como para la regeneración del microbioma vaginal sano. Para jurisdicciones en las que esto es posible o es requerido, la invención estriba en utilizar clinoptilolita, que presente un tamaño de partícula entre 0,2 y 10 μm , para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la
50 o las enfermedades mencionadas al comienzo.

Preferiblemente, la clinoptilolita está libre de metales pesados, de manera particularmente preferida mediante un procedimiento correspondiente al procedimiento indicado en el documento EP 2 040 837 o bien el correspondiente documento US 8.173.101. Para jurisdicciones en las que esto es posible, el contenido de divulgación de estos documentos se incluye mediante referencia al contenido de la presente solicitud.

La eficacia de la sustancia de acuerdo con la invención se desprende de los ensayos y experimentos expuestos más adelante en varias cepas de microorganismos diferentes. Se confirma que la sustancia presenta un efecto inhibitor del crecimiento de representantes del género *Candida*, así como de patógenos bacterianos seleccionados de la flora vaginal, mientras que representantes de una flora vaginal sana son incluso fomentados en su crecimiento.

- 5 Con el fin de explicar la relación entre el tamaño de partícula y la eficacia, al final de los ensayos que confirman la eficacia se adjuntan correspondientes ensayos comparativos.

Las indicaciones entre corchetes [n] se refieren a la bibliografía indicada al final de la memoria descriptiva. Los resultados están representados en diferentes Tablas y gráficos en forma de Figuras, en este caso muestra o bien muestran:

- 10 La Fig. 1, el crecimiento de *Candida albicans* con/sin zeolita en caldo de Sab,
 la Fig. 2, la influencia de zeolita sobre el crecimiento de *Candida albicans* en caldo de Sabouraud,
 la Fig. 3, la influencia de zeolita sobre el número de gérmenes de cultivos de *Candida albicans* después de incubación durante 300 min,
 15 la Fig. 4, la influencia de zeolita sobre el crecimiento de *Candida albicans* en caldo de Sabouraud (ensayo Vialight),
 la Fig. 5, la influencia de zeolita sobre el crecimiento de *Candida parapsilosis* en caldo de Sabouraud,
 la Fig. 6, el efecto de zeolita sobre el crecimiento de *Candida parapsilosis* en caldo de Sabouraud,
 la Fig. 7, la influencia de zeolita sobre el crecimiento de *Gardnerella vaginalis*, medición de la viabilidad mediante el ensayo Vialight después de incubación durante 15 horas,
 20 la Fig. 8, la influencia de zeolita sobre el crecimiento de *G. vaginalis*, medición de la viabilidad mediante el ensayo Vialight después de incubación durante 15 horas,
 la Fig. 9, la influencia de zeolita sobre el crecimiento de *L. crispatus* – medición ATP después de incubación durante 6 o bien 24 horas,
 25 la Fig. 10, el número de células de los cultivos de *L. crispatus* después de incubación durante 24 horas, determinado mediante recuento de colonias.
 la Fig. 11, los valores del pH de los medios y cultivos de *L. crispatus* después de incubación durante 24 horas,
 la Fig. 12, la influencia de zeolita sobre el crecimiento de *L. jensenii* en caldo MRS en el espacio de 3 horas,
 30 la Fig. 13, la influencia de zeolita sobre el crecimiento de *L. jensenii* en caldo MRS en el espacio de 4 y 7 horas,
 la Fig. 14, la influencia de zeolita sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei* en caldo MRS – ensayo de resazurina,
 la Fig. 15, la influencia de zeolita sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei* en caldo MRS – ensayo Vialight,
 35 la Fig. 16, los contenidos en lactato de diferentes cultivos y co-cultivos después de incubación durante 6 horas,
 la Fig. 17, los contenidos en lactato de diferentes cultivos y co-cultivos de 24 horas de edad,
 las Figs. 18-20 placas de agar con diferentes cultivos,
 las Figs. 21-23 distribuciones del tamaño de partícula que se utilizaron en los ensayos comparativos,
 40 las Figs. 24 y 25, el crecimiento dependiente de la distribución del tamaño de partículas de la medición con resazurina de *C. albicans*.
 las Figs. 26-28 lo mismo para *C. glabrata* y
 la Fig. 29, el crecimiento dependiente de la distribución del tamaño de partículas del ensayo Vialight de *C. glabrata*.

Con relación a las enfermedades y su tratamiento:

Micosis vaginal:

La micosis vaginal representa, después de la vaginosis bacteriana, la causa más frecuente en segundo lugar de una infección de la vagina.

- 5 Los causantes principales de infecciones confirmadas son levaduras del género *Candida*, siendo *Candida albicans* responsable del 85-90 % de todas las infecciones por levaduras de la vagina. Factores de riesgo que favorecen una micosis vaginal son:

embarazo

toma de antibióticos

- 10 diabetes mellitus

inmunosupresores

medicamentos de una terapia contra el cáncer

medicamentos con contenido en cortisona

estrés o carga psíquica

- 15 Las terapias aconsejadas en el estado de la técnica consisten en la aplicación tópica de diferentes antimicóticos, tales como polienos (nistatina), imidazoles (butoconazol, clotrimazol, etc.) ciclopiroxolamina. Estos son administrados en un gran número de diferentes preparados, tales como comprimidos vaginales, óvulos o cremas vaginales. El tiempo de tratamiento puede ascender a 1 hasta 7 días. Otra posibilidad consiste en la aplicación de una sola vez de un principio activo de triazol (fluconazol, itraconazol). Paralelamente a la terapia con antimicóticos, la administración local de probióticos (p. ej., gynoflor, Muti-Gyn Flora plus y muchos otros) puede sustentar a reconstituir de nuevo la flora vaginal sana y reducir el valor del pH del medio. Estos productos (comprimidos vaginales, óvulos, geles, cremas, etc.) pueden contener, entre otros, lactobacilos viables (los denominados "palillos de Döderlein") o lisados de los mismos, así como estriol, el cual, en calidad de derivado de estrógeno, fomenta la constitución de un medio de la mucosa "sano", y lactosa (azúcar de la leche) como sustancia nutricia para los lactobacilos.
- 20
- 25

- En los casos de una debilidad inmunológica, ya poco después de finalizar la terapia aparece una recaída. Contra esta vulvovaginitis por *Candida albicans* crónica recidiva se aconsejan, a falta de alternativas, terapias de mantenimiento locales, u orales, con el fin de evitar recaídas. Aquí, como terapia inicial se aplica durante 7-14 días un producto típico tal como se ha descrito precedentemente y, paralelamente a ello, en la primera semana se administran por vía oral 3 x 200 mg de fluconazol. La terapia de mantenimiento consiste, a continuación de ello, en una administración semanal de 150 mg de fluconazol.
- 30

Todos los datos de concentraciones en la memoria descriptiva, las reivindicaciones y las Figuras se han de considerar, si no se indica de otro modo, como mg/ml o bien como % M/V [kg/litro].

- De acuerdo con la invención, clinoptilolita, que presenta un tamaño de partícula entre 0,2 y 10 µm, se aplica localmente en una concentración de 1 mg/ml a 10 mg/ml {correspondiente a 0,1% M/V hasta 1% M/V, cuando M se indica en kg y V en litros}, con el siguiente efecto sobre *Candida albicans*:
- 35

1^{er} Ensayo:

- Candida albicans* (DSM N° 1386) [4] se cultivó conforme a métodos utilizados a menudo de forma rutinaria en agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (YGC, por sus siglas en inglés) y después se trasladó a un medio líquido (caldo de Sabouraud). Después de determinar el número de células mediante la cámara de recuento de Thoma, se prepararon 12 tandas de ensayo (cultivos) con en cada caso 1 x 10⁵ células/ml, no añadiéndose a 4 cultivos polvo de zeolita (control) alguno, añadiéndose a 4 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 1 mg/ml y añadiéndose a otros 4 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 10 mg/ml. Los cultivos de ensayo se incubaron a 37°C en condiciones aerobias bajo agitación. Para la determinación de los valores ciegos, todos los medios se condujeron también sin gérmenes en el ensayo.
- 40
- 45

A lo largo de un espacio de tiempo de 6 horas, se tomaron cada hora partes alícuotas de los cultivos para la determinación de la actividad metabólica mediante el ensayo de viabilidad (ensayo de resazurina) [7].

Los resultados de los que se desprende directamente la elevada eficacia se representan gráficamente en la Fig. 1, curvas de arriba hacia abajo: 0%, 0,1% y 1% de zeolita.

50

2º Ensayo:

El experimento precedentemente descrito se repitió con las siguientes dos modificaciones:

- la duración del ensayo se extendió a 7 horas
- partes alícuotas de los cultivos se diluyeron después de incubación durante 5 horas para la determinación del número real de células, se extendieron en agar de Sabouraud y se evaluaron mediante el recuento de colonias después de la incubación.

La Fig. 2 muestra los resultados del ensayo de resazurina, curvas como en la Fig. 1. Pudo confirmarse el resultado del experimento de crecimiento precedente. En la Fig. 3 se representan gráficamente los números de gérmenes determinados empíricamente de los grupos de ensayo (desde la izquierda: 0%, 0,1% y 1% de zeolita).

3º Ensayo:

En una repetición adicional del experimento se eligió una medición alternativa de la actividad metabólica (ensayo Vialight) [8], con el fin de corroborar los resultados de los ensayos. La Fig. 4 (columnas, en cada caso desde la izquierda: 0, 0,1% y 1% de zeolita) muestra los grupos de ensayo después de incubación durante 3, 4 y 5 horas. Como se puede observar, de nuevo con la sustancia de acuerdo con la invención pudo alcanzarse una disminución de la actividad metabólica de *Candida albicans* en cultivo de caldo.

Posteriormente se sometió a ensayo el efecto de la sustancia de acuerdo con la invención en concentraciones de 10 mg/ml y 50 mg/ml de *Candida parapsilosis* (aislado propio; S 0811-01) [9]:

Candida parapsilosis se cultivó conforme a métodos utilizados a menudo de forma rutinaria primeramente en agar YGC y, a continuación de ello, se transfirió a medio líquido (caldo de Sabouraud) y se incubó.

Después de la determinación del número de células mediante cámara de recuento se prepararon 9 tandas de ensayo (cultivos de levadura) con en cada caso 1×10^6 células de levadura/ml, no añadiéndose a 3 cultivos polvo de zeolita alguno (control), añadiéndose a 3 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 10 mg/ml (1% M/V) y añadiéndose a otros 3 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 50 mg/ml (5% M/V). Los cultivos de ensayo se incubaron con agitación a 30 °C:

- 3 x 12 ml de caldo de Sabouraud
- 3 x 12 ml de caldo de Sabouraud y 1% de zeolita
- 3 x 12 ml de caldo de Sabouraud y 5% de zeolita

Para la determinación de los valores ciegos, pares alícuotas de todos los medios se incubaron también sin germen y se condujeron en el ensayo.

Después de 60 min, 120 min y después de otros 30 min se determinaron las actividades metabólicas de cada uno de los cultivos de ensayo indirectamente mediante el ensayo de viabilidad habitual (ensayo de resazurina). Se tomó la media de los valores de medición de las 3 tandas de la misma condición y se representan, incluida la desviación estándar, en la Fig. 5 (curvas, desde arriba: 0 mg/ml, 10 mg/ml y 50 mg/ml).

Como se puede observar, las dos dosis empleadas de la sustancia de acuerdo con la invención condujeron a una inhibición clara del crecimiento del germen de ensayo.

4º Ensayo:

Efecto de la sustancia de acuerdo con la invención en concentraciones de 1 mg/ml y 0,2 mg/ml sobre *Candida parapsilosis*:

Candida parapsilosis se cultivó conforme a métodos utilizados a menudo de forma rutinaria primeramente en agar YGC y, a continuación de ello, se transfirió a medio líquido (caldo de Sabouraud) y se incubó.

Después de la determinación del número de células mediante cámara de recuento de Neubauer se prepararon 9 tandas de ensayo (cultivos de levadura) con en cada caso 1×10^6 células de levadura/ml, no añadiéndose a tres cultivos polvo de zeolita alguno (control), añadiéndose a 3 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 1 mg/ml (0,1% M/V) y añadiéndose a otros 3 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 0,2 mg/ml (0,02% M/V). Los cultivos de ensayo se incubaron con agitación a 30 °C:

- 3 x 12 ml de caldo de Sabouraud
- 3 x 12 ml de caldo de Sabouraud y 0,1% de zeolita
- 3 x 12 ml de caldo de Sabouraud y 0,02% de zeolita

Para la determinación de los valores ciegos, pares alícuotas de todos los medios se incubaron también sin germen y se condujeron en el ensayo.

5 Después de 60 min, 120 min y después de otros 30 min se determinaron las actividades metabólicas de cada uno de los cultivos de ensayo indirectamente mediante el ensayo de viabilidad habitual (ensayo de resazurina). Se tomó la media de los valores de medición de las 3 tandas de la misma condición y se representan, incluida la desviación estándar, en la Fig. 6 (curvas, desde arriba: 0%, 0,02% y 0,1%).

Incluso en la concentración menor empleada (0,02%), línea central en la Fig. 6, la sustancia de acuerdo con la invención actúa de forma claramente retardadora del crecimiento sobre *Candida parapsilosis*.

Vaginosis bacteriana

10 La vaginosis bacteriana representa la forma más frecuente de la vaginitis.

Se manifiesta cuando la flora vaginal productora de H₂O₂ sana (principalmente, diversos representantes de los lactobacilos) es reemplazada en el marco de una disbiosis por bacterias predominantemente anaerobias. A estas pertenecen predominantemente *Gardnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae*, pero también representantes de los géneros *Megasphaera*, *Dialister*, *Mobiluncus*, *Prevotella* y otros. Factores de riesgo que favorecen una vaginosis bacteriana son, entre otros:

- 15 estado socio-económico bajo (→ estrés)
- frecuentes lavados vaginales
- fumar
- relaciones sexuales sin preservativos con compañeros que cambian a menudo
- 20 contraceptivos en el útero
- uso frecuente de dosis elevadas del espermicida nonoxinol-9

Consejos terapéuticos:

25 Fuera del embarazo, se realiza una terapia durante 7 días con metronidazol (2 x 500 mg/día). Otras posibilidades consisten en la administración local de metronidazol o clindamicina en forma de una crema vaginal al 2% (espacio de tiempo 7 días). También es posible el empleo de comprimidos vaginales para la administración local durante dos veces de 500 mg de metronidazol al día durante un espacio de tiempo de 7 días. Además de ello, existen óvulos para la aplicación intravaginal de clindamicina (100 mg diarios durante 3 días).

30 La biopelícula bacteriana adherente no se elimina sin embargo en el caso de las terapias descritas, por lo tanto la cuota de curación al cabo de 3 meses se encuentra en solo el 60-70% y al cabo de 6 meses aún más por debajo. Mediante el empleo de probióticos que reducen, entre otros, el valor del pH vaginal y fomentan la flora vaginal sana puede reducirse aproximadamente en la mitad la cuota de recidiva de la BV (siglas de vaginosis bacteriana) (véase [2]: Terapia S1 de la micosis vaginal).

La eficacia de la sustancia de acuerdo con la invención se desprende de los ensayos y experimentos expuestos seguidamente en *Gardnerella vaginalis*:

35 5° Ensayo:

Efecto de la sustancia de acuerdo con la invención en una concentración de 1 mg/ml (0,1% M/V) y 10 mg/ml (1% M/V) sobre *Gardnerella vaginalis*:

Gardnerella vaginalis (DSM N° 4944) [5] se cultivó de acuerdo con los métodos utilizados frecuentemente de manera rutinaria en agar de Casman y después se transfirió a medio líquido (TSB + suero de caballo al 5%).

40 Después de la determinación del número de células mediante la cámara de recuento de Thoma se prepararon 12 tandas de ensayo (cultivos) con en cada caso 1 x 10⁵ células/ml, no añadiéndose a 4 cultivos polvo de zeolita alguno (controles), añadiéndose a 4 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 1 mg/ml y a otros 4 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 10 mg/ml. Los cultivos de ensayo se incubaron bajo agitación a 37°C bajo condiciones anaerobias a lo largo de 15 h.

45 Para la determinación de los valores ciegos, todos los medios se ensayaron también sin gérmenes.

Después se tomaron partes alícuotas de los cultivos para la determinación de la actividad metabólica mediante el ensayo de viabilidad (ensayo Vialight).

En la Fig. 7 (barras, desde la izquierda: 0%, 0,1% y 1% de zeolita) se representan gráficamente los resultados.

6° Ensayo:

El ensayo de crecimiento se repitió con un número de células de inicio todavía menor (5×10^5 células/ml) y proporcionó un resultado equiparable, véase la Fig. 8 (barras, desde la izquierda: 0%, 0,1% y 1% de zeolita).

- 5 El fomento de la sustancia de acuerdo con la invención sobre el crecimiento de la flora vaginal sana se desprende de los ensayos y experimentos expuestos más adelante, que se realizaron en bacterias del género *Lactobacillus*.

7° Ensayo:

Lactobacillus crispatus (DSM N° 20584) [6] se cultivó en condiciones anaerobias de acuerdo con los métodos utilizados frecuentemente de manera rutinaria en agar de Man Rogosa Sharp (MRS) y después se transfirió a medio líquido (caldo de MRS).

- 10 Después de la determinación del número de células mediante la cámara de recuento de Thoma se prepararon 12 tandas de ensayo (cultivos) con en cada caso 1×10^6 células/ml, no añadiéndose a 4 cultivos polvo de zeolita alguno (controles), añadiéndose a 4 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 1 mg/ml (0,1% M/V) y a otros 4 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 10 mg/ml (1% M/V). Los cultivos de ensayo se incubaron bajo agitación a 37°C bajo condiciones anaerobias.

- 15 Para la determinación de los valores ciegos, todos los medios se ensayaron también sin gérmenes.

- 20 Al cabo de 6 y 24 horas se tomaron partes alícuotas de los cultivos para la determinación de la actividad metabólica mediante el ensayo de viabilidad (ensayo Vialight), véase la Fig. 9 (barras, desde la izquierda, en cada caso: 0%, 0,1% y 1% de zeolita). Al cabo de 24 h se diluyeron, además de ello, partes alícuotas de los cultivos y se extendieron en placas de agar MRS, véase la Fig. 10 (barras, desde la izquierda: 0%, 0,1% y 1% de zeolita); y los valores del pH de las tandas de ensayo se midieron al final del ensayo mediante el electrodo de pH, véase la Fig. 11 (barras, en cada caso: medios a la izquierda, cultivos a la derecha, en cada caso desde la izquierda: 0%, 0,1% y 1% de zeolita).

- 25 Los resultados del recuento de colonias (Fig. 10) confirman las mediciones de viabilidad; la Fig. 11 muestra los valores del pH de los cultivos después de incubación durante 24 h. Independientemente de si se añadió la sustancia de acuerdo con la invención o no, en todos los casos el germen disminuyó el valor del pH del medio a menos de 3,8.

8° Ensayo:

Lactobacillus jensenii (DSM N° 20557) [12] se cultivó en condiciones anaerobias de acuerdo con los métodos utilizados frecuentemente de manera rutinaria en agar de Man Rogosa Sharp (MRS) y después se transfirió a medio líquido (caldo de MRS).

- 30 Después de la determinación del número de células mediante la cámara de recuento de Thoma se prepararon 12 tandas de ensayo (cultivos) con en cada caso 1×10^5 células/ml, no añadiéndose a 4 cultivos polvo de zeolita alguno (controles), añadiéndose a 4 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 1 mg/ml (0,1% M/V) y a otros 4 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 10 mg/ml (1% M/V). Los cultivos de ensayo se incubaron bajo agitación a 37°C bajo condiciones anaerobias.

- 35 Para la determinación de los valores ciegos, todos los medios se ensayaron también sin gérmenes.

Al cabo de 3 horas se tomaron partes alícuotas de los cultivos para la determinación de la actividad metabólica mediante el ensayo de viabilidad (ensayo Vialight). La Fig. 12 muestra gráficamente el resultado del experimento. Se manifiesta un aumento del rendimiento metabólico mediante incubación con la sustancia de acuerdo con la invención.

- 40 9° Ensayo:

El experimento de crecimiento se repitió prolongando el tiempo de incubación. La medición de la actividad metabólica (ensayo Vialight) tuvo lugar al cabo de 4 y 7 horas del mismo modo al que se ha descrito arriba. La Fig. 13 muestra la evaluación gráfica de los resultados de medición. El efecto fomentador del crecimiento de la sustancia de acuerdo con la invención sobre *L. jensenii* se puede ver todavía más claramente al cabo de 7 horas que al cabo de 3 horas en el Ensayo 8.

- 45

10° Ensayo:

Lactobacillus casei (DSM N° 20011) [11] se cultivó en condiciones aerobias de acuerdo con los métodos utilizados frecuentemente de manera rutinaria en agar de Man Rogosa Sharp (MRS) y después se transfirió a medio líquido (caldo de MRS).

- 50 Después de la determinación del número de células mediante la cámara de recuento de Thoma se prepararon 12 tandas de ensayo (cultivos) con en cada caso 5×10^5 células/ml, no añadiéndose a 4 cultivos polvo de zeolita alguno

(controles), añadiéndose a 4 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 1 mg/ml (0,1% M/V) y a otros 4 cultivos polvo de zeolita en una cantidad de 10 mg/ml (1% M/V). Los cultivos de ensayo se incubaron bajo agitación a 37°C bajo condiciones aerobias.

Para la determinación de los valores ciegos, todos los medios se ensayaron también sin gérmenes.

- 5 Al cabo de 1, 3 y 5 horas se tomaron partes alícuotas de los cultivos para la determinación de la actividad metabólica mediante el ensayo de viabilidad (ensayo Vialight) (véanse las Fig. 14 y Fig. 15; ambas barras, desde la izquierda: 0%, 0,1% y 1% de zeolita).

10 Los resultados en las Figuras 14 y 15 no muestran, sorprendentemente, efecto alguno de la sustancia de acuerdo con la invención sobre la actividad metabólica del germen de ensayo dentro del tiempo de ensayo. Ni con el ensayo con resazurina ni con el ensayo de ATP pudieron medirse a lo largo de amplios tramos del ensayo, diferencias significativas entre las distintas condiciones.

15 Es sorprendente que la sustancia de acuerdo con la invención fomente evidentemente de manera muy específica ciertamente el crecimiento de las especies *L. crispatus* y *L. jensenii* relevantes para una flora vaginal sana, pero al mismo tiempo no ejerza influencia alguna sobre el crecimiento de la especie *L. casei* no relevante para la flora vaginal.

Los siguientes ensayos y experimentos confirman que la sustancia de acuerdo con la invención fomenta, en combinación con una cepa de *Lactobacillus vaginalis*, la regeneración del medio vaginal sano o bien actúa de forma inhibitoria del crecimiento sobre *Gardnerella vaginalis*, uno de los patógenos principales de la vaginosis.

11° Ensayo:

- 20 *Lactobacillus crispatus* (DSM N° 20584) [6] y *Gardnerella vaginalis* (DSM No. 4944) [5] se cultivaron primeramente en un cultivo puro de acuerdo con métodos utilizados frecuentemente de manera rutinaria.

Después de la determinación del número de células de los cultivos previos mediante la cámara de recuento de Thoma se prepararon 12 tandas de ensayo (cultivos o bien co-cultivos) con en cada caso 5×10^5 células/ml en un medio mixto (TSB + HS y MRS en la relación 7 + 3):

- 25 1 x 10 ml de medio (7 ml de TSB + suero de caballo al 5% y 3 ml de caldo MRS)

1x *G. vaginalis*

1x *G. vaginalis* + 0,5% de zeolita

1x *L. crispatus*

1x *L. crispatus* + 0,5% de zeolita

- 30 1x *L. crispatus* + *G. vaginalis* (5:1) A

1x *L. crispatus* + *G. vaginalis* + 0,5% de zeolita (5:1) A

1x *L. crispatus* + *G. vaginalis* (5:1) B

1x *L. crispatus* + *G. vaginalis* + 0,5% de zeolita (5:1) B

1x *L. crispatus* + *G. vaginalis* (10:1) A

- 35 1x *L. crispatus* + *G. vaginalis* + 0,5% de zeolita (10:1) A

1x *L. crispatus* + *G. vaginalis* (10:1) B

1x *L. crispatus* + *G. vaginalis* + 0,5% de zeolita (10:1) B

40 Las tandas de ensayo se incubaron en el agitador orbital a 37 °C en condiciones anaerobias. Al cabo de 6 y 24 h se separaron por centrifugación partes alícuotas de los cultivos (5 min, 15000 g) y los sobrenadantes se desactivaron durante 15 min a 80°C en un baño de agua y se aportaron a una cuantificación enzimática con ácido láctico [13]. El ácido láctico producido por los lactobacilos vaginales representa uno de los factores principales del medio vaginal sano.

Los resultados de la medición después de incubación durante 6 h se representan gráficamente en la Fig. 16. Los valores de las tandas de co-cultivo se promediaron en cada caso para la gráfica.

- 45 Con ayuda de la Fig. 16 resulta claro que la adición de la sustancia de acuerdo con la invención a los co-cultivos fomenta la producción de ácido láctico de *L. crispatus*.

En los cultivos saturados después de un tiempo de incubación de 24 h, todos los co-cultivos tenían aproximadamente contenidos en lactato iguales de altos que los cultivos puros de *L. crispatus* (véase la Fig. 17), lo que apunta a que este germen fue determinante del medio.

12º Ensayo:

5 *Lactobacillus crispatus* (DSM Nº 20584) [6] y *L. jensenii* (DSM Nº 20557) [12] se cultivaron en condiciones anaerobias en medio líquido conforme a métodos utilizados frecuentemente de manera rutinaria. Como medio nutricional se recurrió a caldo de MRS sin y con adición de la sustancia de acuerdo con la invención (10 mg/ml), la cual fue pre-acondicionada antes del experimento en el mismo medio. Partes alícuotas de los cultivos saturados se separaron por centrifugación y los sobrenadantes se sometieron a ensayo tal como se describe en lo que sigue en cuanto a su efecto inhibitorio del crecimiento de *Gardnerella vaginalis*.

15 *G. vaginalis* se cultivó durante la noche en TSB + suero de caballo al 5% y se sembró de forma densa en placas de agar de BHI + suero de caballo al 5%. A continuación, con una punta de pipeta estéril se practicaron en cada caso 3 agujeros en las placas. En estos huecos de las placas de agar se pipetearon los sobrenadantes de los cultivos de *Lactobacillus*. Como control positivo servía una mezcla a base de antibióticos (penicilina/estreptomicina), como control negativo se recurrió a medio (caldo de MRS centrifugado). Las placas se cultivaron en condiciones anaerobias a 37°C, hasta que se podía reconocer el crecimiento del césped de *G. vaginalis*. Con el fin de aumentar la humedad del aire, se añadieron a los recipientes de incubación paños húmedos.

20 En el caso de la evaluación se manifestó una inhibición del crecimiento de *Gardnerella vaginalis* en forma de halos de inhibición que fueron visibles alrededor de los huecos con los sobrenadantes del cultivo. Este efecto se puede comprobar en el caso de las dos cepas de *Lactobacillus* sometidas a ensayo, tanto en el caso de los sobrenadantes como sin la adición de la sustancia de acuerdo con la invención, no obstante, en el caso de *L. crispatus* más fuertemente acusada que en el caso de *L. jensenii*. Las siguientes Figuras (Figs. 18, 19 y 20) muestran a modo de ejemplo las placas de agar en el momento de la evaluación del ensayo. El denso césped de bacterias de *Gardnerella vaginalis* está vaciado en torno a los sobrenadantes de los cultivos de *Lactobacillus* (y de los antibióticos realizados como control positivo).

25 En resumen, se puede establecer que, por una parte, se pudo demostrar una inhibición o bien la influencia negativa del crecimiento de gérmenes vaginales potencialmente patógenos mediante la sustancia de acuerdo con la invención. Por otra parte, se pudo documentar que gérmenes relevantes del microbioma vaginal sano no solo no son perjudicados en su crecimiento, sino que incluso son fomentados en el mismo. Este efecto inhibitorio del crecimiento de la sustancia de acuerdo con la invención sobre gérmenes vaginales patógenos con un fomento tendencial y específico simultáneo del microbioma vaginal sano puede ser considerado sorprendente y nuevo.

30 Al efecto de la granulometría del polvo de zeolita de acuerdo con la invención se prepararon tres tandas diferentes para los ensayos comparativos descritos en lo que sigue. En este caso, la distribución correspondiente a la Fig. 21 se designa como “polvo de zeolita finísimo”, la distribución correspondiente a la Fig. 22 como “polvo de zeolita estándar” y la distribución correspondiente a la Fig. 23 como “polvo de zeolita toscó”. Los datos en las Tablas son en este caso los siguientes:

“Polvo de zeolita finísimo”

	d (0,1) [µm]	d (0,5) [µm]	d (0,9) [µm]	Residual
PM	0,19	0,38	1,06	5,36
s	0,00	0,00	0,01	0,14
DER	0,54	1,13	1,37	2,69

“Polvo de zeolita estándar” (tal como se utiliza también en los Ensayos 1-12)

008-02-08-4-0-0	d (0,1) [µm]	d (0,5) [µm]	d (0,9) [µm]	Residual
PM	1,35	3,09	5,85	0,98
S	0,01	0,01	0,01	0,05
DER	0,54	0,25	0,14	5,04

"Polvo de zeolita tosco"

	d (0,1) [µm]	d (0,5) [µm]	d (0,9) [µm]	Residual
PM	1,63	9,51	35,66	0,56
s	0,00	0,05	0,24	0,02
RSD	0,15	0,56	0,66	2,93

5 Por consiguiente, el "polvo de zeolita finísimo" corresponde a la zona inferior de acuerdo con la invención, el "polvo de zeolita estándar" corresponde a la zona superior de acuerdo con la invención y el "polvo de zeolita tosco" se encuentra con aproximadamente el 50% de su masa por fuera (por encima) del intervalo de acuerdo con la invención.

La realización del ensayo era la siguiente:

10 *Candida albicans* se cultivó en cultivo líquido (caldo de Sabouraud) conforme a métodos utilizados con frecuencia de manera rutinaria. Después de la determinación del número de células mediante la cámara de recuento de Thoma, se prepararon 12 tandas de ensayo (cultivos) con en cada caso 1×10^5 células/ml, no añadiéndose a 3 cultivos polvo de zeolita alguno (controles), añadiéndose a 3 cultivos polvo de zeolita de la distribución por tamaño estándar en una cantidad de 10 mg/ml, a otros 3 cultivos polvo de zeolita finísimo en una cantidad de 10 mg/ml y de nuevo a 3 cultivos polvo de zeolita tosco en una cantidad de 10 mg/ml. Los cultivos de ensayo se incubaron a 37°C bajo condiciones aerobias con agitación.

15 Para la determinación de los valores ciegos, todos los medios se realizaron también en el ensayo sin gérmenes.

20 A lo largo de un espacio de tiempo de 7 horas se tomaron cada hora partes alícuotas de los cultivos para la determinación de la actividad metabólica mediante el ensayo de viabilidad (ensayo de resazurina). En el caso del ensayo de resazurina se trata de un ensayo empleado a menudo en la investigación biomédica para la medición de la citotoxicidad de sustancias. A las muestras de cultivo se las añade el indicador redox resazurina, el cual es reducido por el NADH generado en el metabolismo de las células en resorufina fluorescente, cuya concentración se determina fluorométricamente [7].

25 En la Fig. 24 se representan gráficamente los resultados. Se puede reconocer claramente que el efecto del polvo de zeolita sobre el crecimiento del germen de ensayo depende fuertemente del tamaño de las partículas. Así, las tandas de ensayo con polvo de zeolita finísimo (curva de puntos, en la zona derecha del diagrama la curva más inferior) y el polvo de zeolita estándar (curva de trazos cortos, la siguiente por encima de la curva de zeolita finísima) muestran una inhibición significativamente más intensa del rendimiento metabólico que la fracción del tamaño de partículas tosca (curva de trazos más largos, que de nuevo es la siguiente por encima). La curva superior, correspondiente al grupo de control, alcanza en este caso de manera considerablemente más temprana la fase del crecimiento exponencial (también más intensamente acusado).

30 La Fig. 25 muestra los valores de medición después de incubación durante 5, 6 y 7 h en forma de diagramas de barras. En este caso, respectivamente de izquierda a derecha está dispuesto el polvo de zeolita tosco, el polvo de zeolita estándar, el polvo de zeolita finísimo y el grupo de control. Como se puede ver claramente, los valores de la fracción del tamaño de partículas tosca (muy a la izquierda) se aproximan a los de los controles sin zeolita (muy a la derecha).

35 Con el fin de verificar si el efecto diferente de los tamaños de las partículas de zeolita empleados puede ser mostrado también para otros patógenos vaginales del género *Candida*, se llevaron a cabo los siguientes experimentos en *Candida glabrata* [ATCC 2001], un germen adicional de la candidiasis vulvovaginal:

La realización del ensayo era la siguiente:

40 *Candida glabrata* se cultivó en cultivo líquido (caldo de Sabouraud) conforme a métodos utilizados con frecuencia de manera rutinaria. Después de la determinación del número de células mediante la cámara de recuento de Thoma, se prepararon 12 tandas de ensayo (cultivos) con en cada caso 6×10^5 células/ml, no añadiéndose a 3 cultivos polvo de zeolita alguno (controles), añadiéndose a 3 cultivos polvo de zeolita de la distribución por tamaño estándar en una cantidad de 10 mg/ml, a otros 3 cultivos polvo de zeolita finísimo en una cantidad de 10 mg/ml y de nuevo a 3 cultivos polvo de zeolita tosco en una cantidad de 10 mg/ml. Los cultivos de ensayo se incubaron a 37°C bajo condiciones aerobias con agitación (110 rpm).

Para la determinación de los valores ciegos, todos los medios se realizaron también en el ensayo sin gérmenes.

A lo largo de un espacio de tiempo de 7 horas se tomaron cada hora partes alícuotas de los cultivos para la determinación de la actividad metabólica mediante el ensayo de viabilidad (ensayo de resazurina) tal como se describe arriba.

5 En la Fig. 26 se representan gráficamente los resultados. También para *C. glabrata* se puede reconocer claramente que el efecto inhibitor del crecimiento de polvo de zeolita se ve fuertemente influenciado por el tamaño de las partículas. De nuevo, las tandas de ensayo con polvo de zeolita finísimo (curva de puntos, en el borde de la derecha la segunda desde abajo) y el polvo de zeolita estándar (curva de trazos cortos, en el borde de la derecha muy abajo) muestran una inhibición claramente más intensa del rendimiento metabólico que la fracción de tamaños de partículas tosca (curva de trazos largos, segunda curva desde arriba).

10 La Fig. 27 muestra para la mejor explicación de los resultados los valores de medición después de incubación durante 5 y 6 h en forma de diagramas de barras. Los valores de la fracción del tamaño de partículas tosca (barra muy a la derecha en el diagrama) se asemejan a las de los controles sin zeolita (barras muy a la izquierda en el diagrama). Los grupos de zeolita estándares están representados en el interior a la izquierda, los grupos de zeolita finísimos en el interior a la derecha.

15 Con el fin de garantizar los resultados del ensayo previamente expuestos, se llevó a cabo un ensayo de crecimiento como el precedentemente descrito, en este caso reduciendo el número de las células sembradas, sin embargo, a aproximadamente 1×10^4 células/ml, pero para ello ampliando el tiempo de incubación a 16 h. Tal como se puede observar de la Fig. 28, se alcanzaron resultados que coinciden muy bien con los que les preceden.

20 Para garantizar todavía más los datos determinados experimentalmente, se llevó a cabo un ensayo de crecimiento como el descrito previamente, esta vez la concentración activa de los polvos de zeolita empleados se aumentaron, sin embargo, a 50 mg/ml y con el ensayo de Vialight se recurrió a un segundo método para la determinación de la actividad metabólica. Este ensayo se basa en la cuantificación del adenosina trifosfato (ATP) generado en el metabolismo de células mediante medición de la bioluminiscencia, que es emitida en el caso de la disociación del ATP por parte de la enzima luciferasa [8].

25 Tal como se puede observar por las curvas de crecimiento en la Fig. 29, también bajo estas condiciones de ensayo con el producto estándar (curva más inferior de trazos cortos) se consigue un efecto inhibitor del crecimiento claramente más intenso que con el polvo de zeolita tosco (segunda curva de trazos largos desde arriba).

30 Si se tiene en cuenta de forma recopilatoria que el “polvo de zeolita tosco” utilizado ha presentado también porciones notorias del intervalo de tamaños de acuerdo con la invención, entonces resulta un límite muy bueno de la eficacia en el borde superior de acuerdo con la invención. La actividad del “polvo de zeolita finísimo” permite reconocer el límite en el borde inferior, en donde, como consecuencia del pequeño tamaño de las partículas, presumiblemente está dañada o parcialmente dañada la estructura de la zeolita.

35 La determinación del tamaño de granos no es crítica, pero tiene lugar preferiblemente con ayuda de un aparato Mastersizer 2000 de Malvern Instruments GmbH. Este aparato trabaja sobre una base óptica según el principio de la difracción de un rayo láser. En este caso, se mide la intensidad de la luz dispersada de un rayo láser que penetra a través de una muestra de partículas dispersada y en movimiento continuo. Comparaciones han determinado que tamaños de granos medidos de esta manera corresponden a los que realmente se presentan.

Partículas que están presentes en una composición a evaluar, pero que no se encuentran en el intervalo de tamaños de granos mencionado y reivindicado se consideran como no presentes y no se tienen en cuenta.

40 La aplicación de la sustancia de acuerdo con la invención puede tener lugar en cualquier composición farmacéuticamente inocua, así pueden utilizarse, en particular, uno o varios de los siguientes aditivos: materiales de soporte farmacéuticamente inocuos; microorganismos viables y/o extractos de los mismos; sustancias nutritivas para el microbioma vaginal sano (p. ej., lactosa, etc.); sustancias que influyen favorablemente en el medio vaginal para el microbioma vaginal sano, p. ej., estradiol, ácidos orgánicos, etc.

45 La aplicación puede tener lugar, en particular, en forma de cremas, pomadas, geles, supositorios, comprimidos vaginales, óvulos, supositorios, espumas, aerosoles, polvos, lavados, baños íntimos, suspensiones, etc.

En ambas ejecuciones, los materiales y los procedimientos aplicables son conocidos del estado de la técnica y pueden elegirse y llevarse a cabo sin problemas por el farmacéutico conociendo la enfermedad (aplicación) a tratar y la invención.

50 Referencias:

[1] Hainer, B.,L. (2011) Vaginitis: Diagnosis and Treatment; American Academy of Family Physicians; <http://www.sonoma.edu/users/w/wilkosz/n540a-07/VaginitisDX and TX.pdf>

[2] AWMF online: S1-Leitlinie: Bakterielle Vaginose (BV) in Gynäkologie und Geburtshilfe; AWMF – Registro de Directrices N° 015/28; estado actual: 07/2013.

[3] AWMF online: S2k-Leitlinie: Vulvovaginalkandidose; Registro AWMF N° 015/072; estado 12/2013.

[4] *Candida albicans* DSM N° 1386 https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-1386.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304

5 [5] *Gardnerella vaginalis* DSM N° 4944 https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-4944.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304

[6] *Lactobacillus crispatus* DSM N° 20584 https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-20584.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304

10 [7] Rampersad, S., N. (2012) Multiple Applications of Alarm Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays; Review, Sensors 2012, 12, 12347-12360.

[8] Vialight™ MDA plus - High sensitivity microbial detection kit with extended signal stability; Lonza LT07-122.

[9] Protocolo para el Ensayo Microbiológico S0811-01

[10] Protocolo para el Ensayo Microbiológico S0903-19

15 [11] *Lactobacillus casei* DSM Nr. 20011 https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-20011.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304

[12] *Lactobacillus jensenii* DSM Nr. 20557 https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-20557.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304

[13] Enzytec™ D/L Milchsäure Art.N° E1255 – Instrucciones de uso; r-Biopharm.

[14] *Candida glabrata* ATCC N° 2001 <https://www.atcc.org/~ps/2001.ashx>

20

REIVINDICACIONES

1. Clinoptilolita que presenta un tamaño de partículas entre 0,2 y 10 μm , para uso en el tratamiento de enfermedades vaginales tales como vaginosis bacteriana, candidiasis vulvovaginal y tricomoniasis de mamíferos y seres humanos, así como para el restablecimiento del microbioma vaginal sano.
- 5 2. Clinoptilolita para uso según la reivindicación 1, caracterizada por que está exenta de metales pesados.
3. Clinoptilolita para uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que se utiliza con uno o varios de los siguientes adyuvantes:
 - materiales de soporte farmacéuticamente inocuos,
 - microorganismos viables y/o extractos de los mismos,
 - 10 - sustancias nutricias para el microbioma vaginal sano (p. ej., lactosa, etc.),
 - sustancias que influyen favorablemente en el medio vaginal para el microbioma vaginal sano (p. ej., estradiol, ácidos orgánicos, etc.).
4. Clinoptilolita para uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que se aplica localmente en una de las siguientes formas de administración: espuma, supositorio, comprimido vaginal, óvulo, gel, aerosol, polvo, lavado, baño íntimo, crema/pomada, suspensión.
- 15

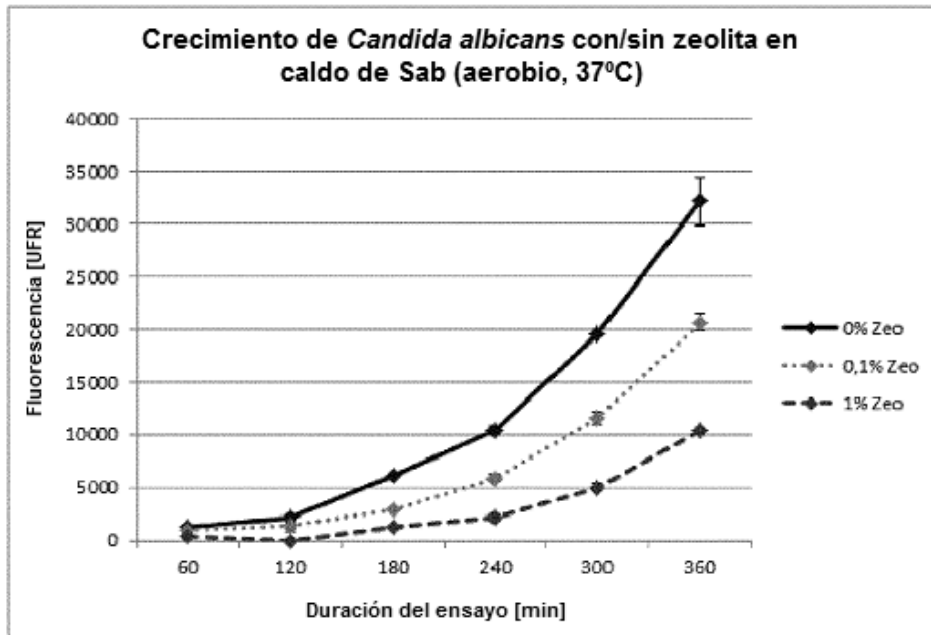


Fig. 1

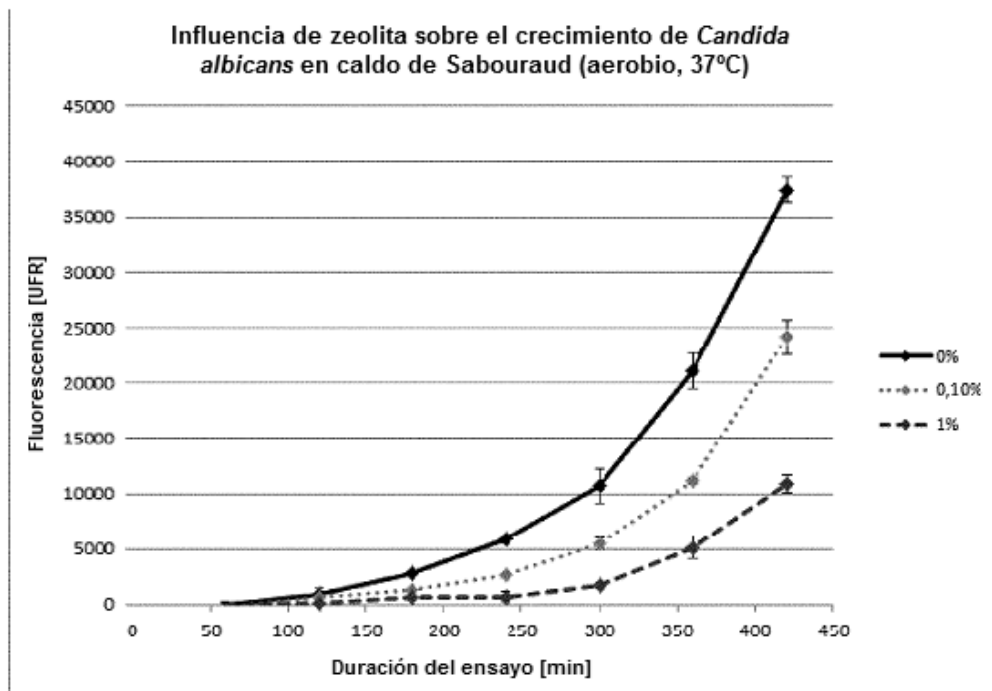


Fig. 2

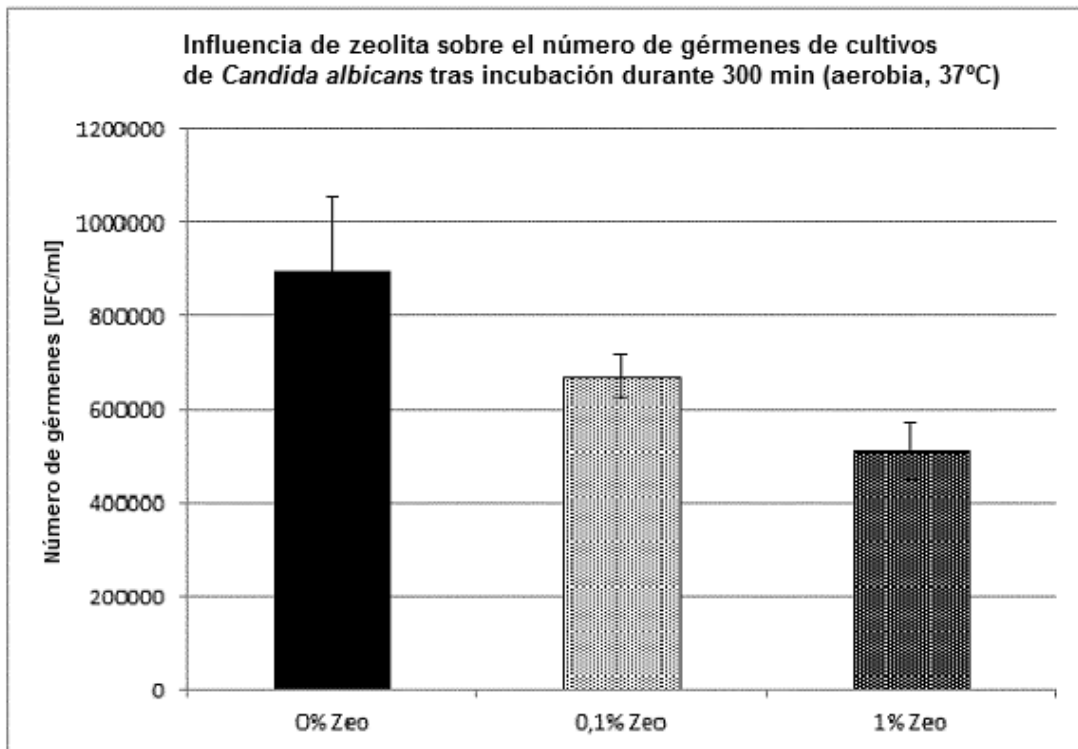


Fig. 3

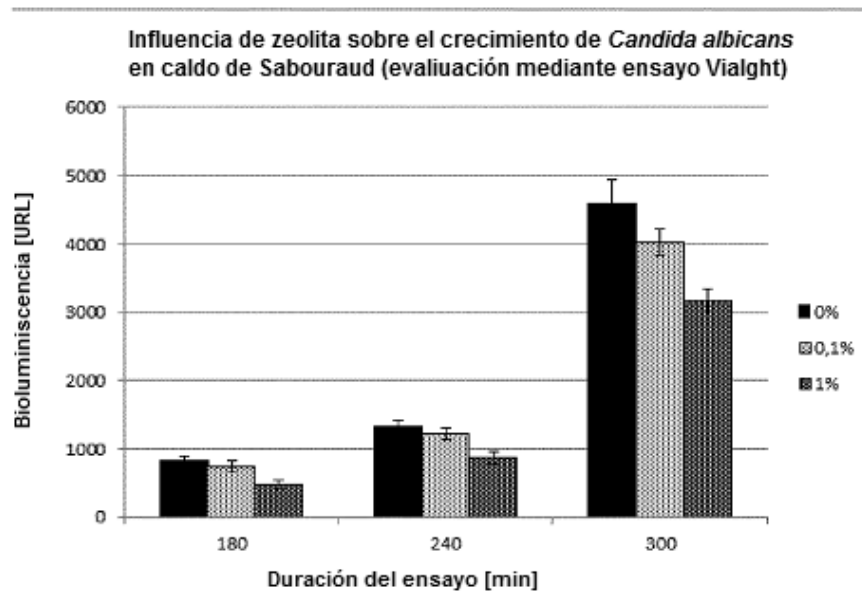


Fig. 4

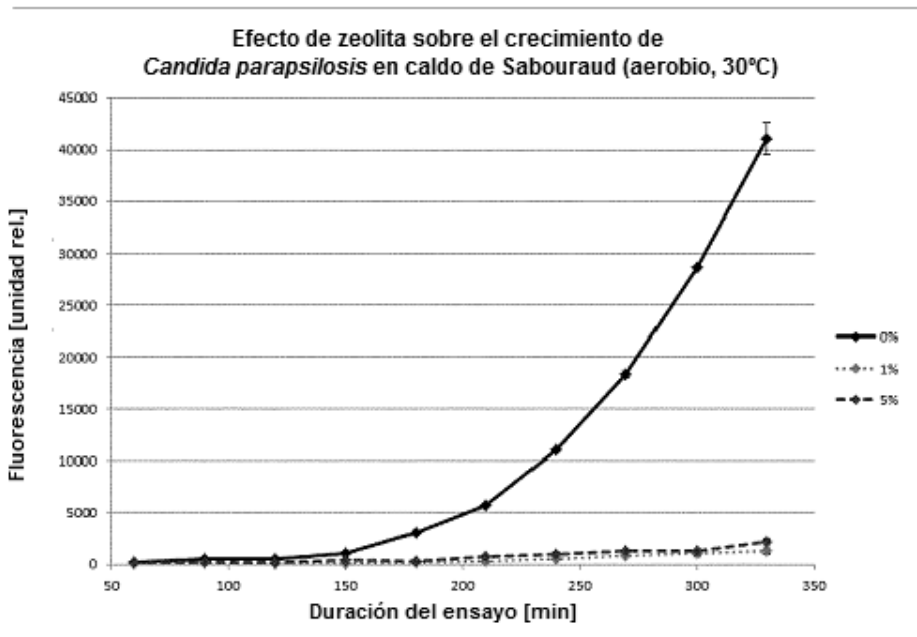


Fig. 5

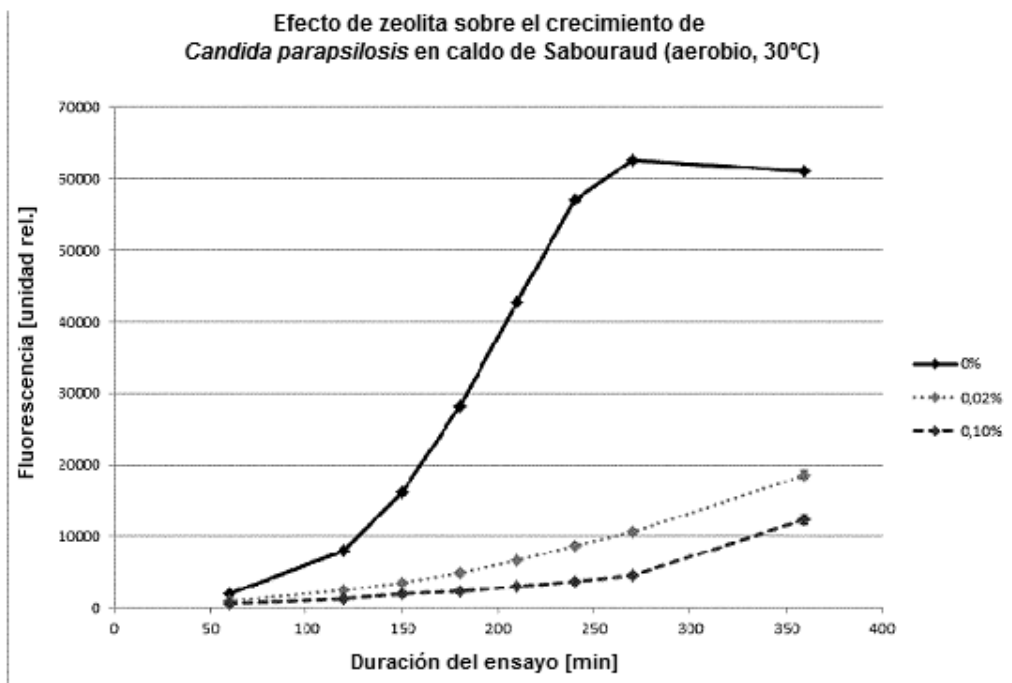


Fig. 6

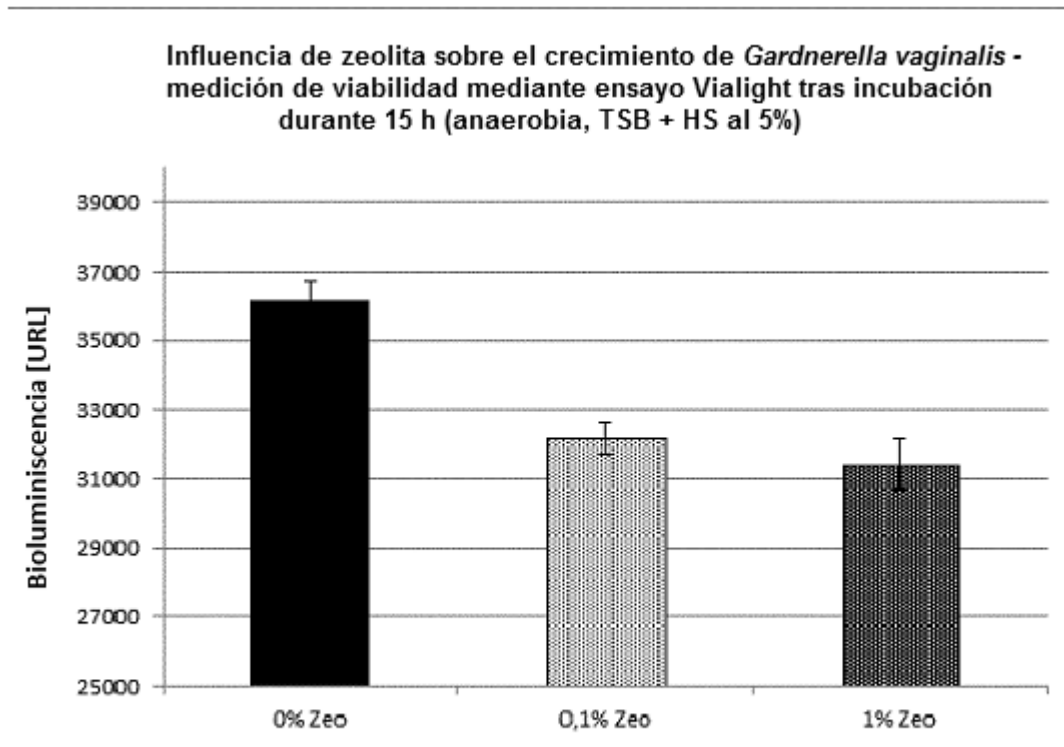


Fig. 7

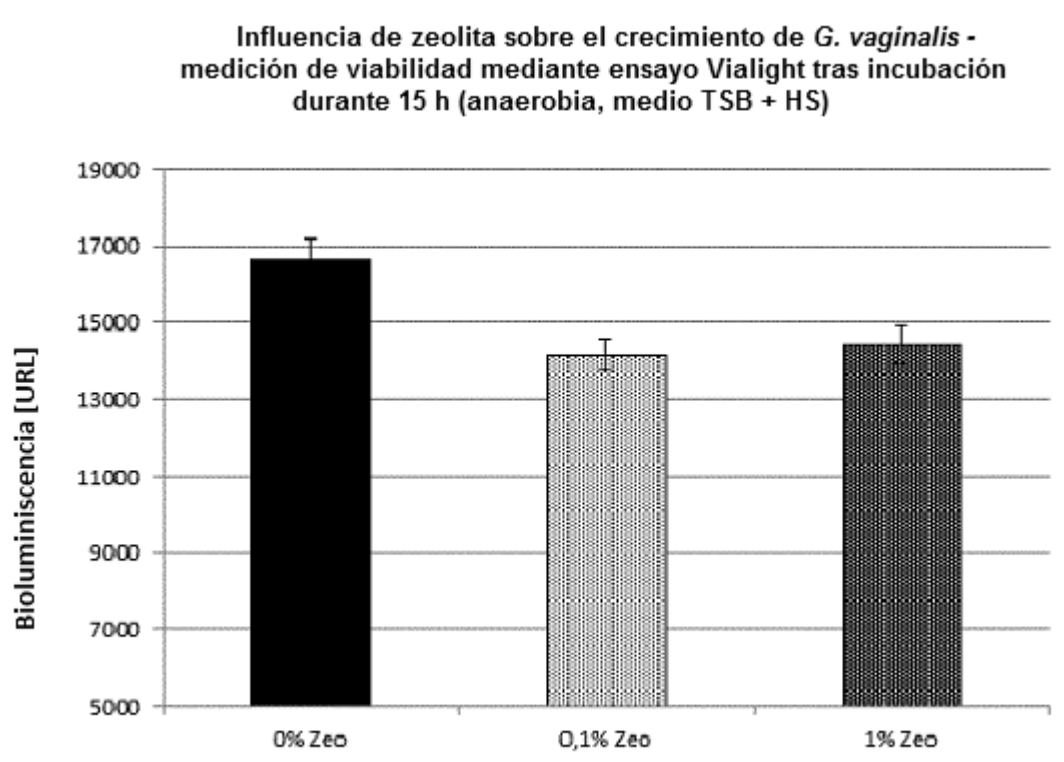


Fig. 8

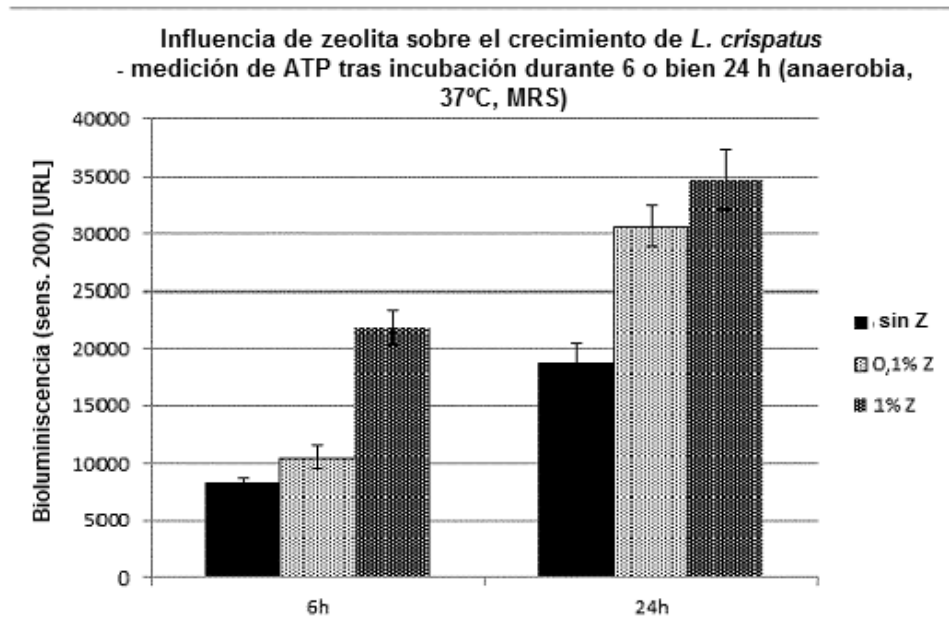


Fig. 9

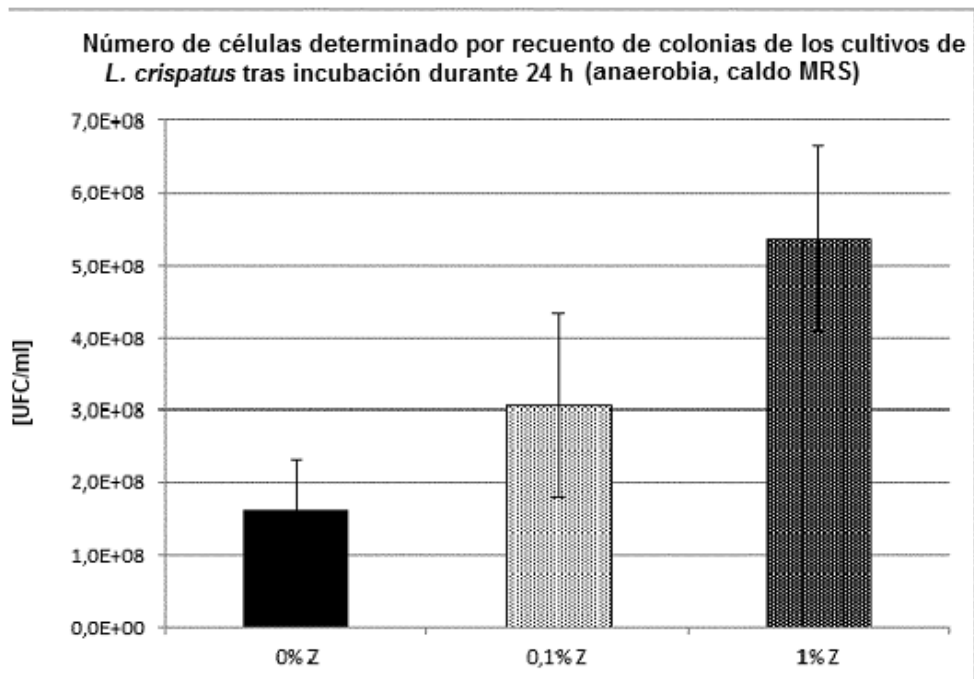


Fig. 10

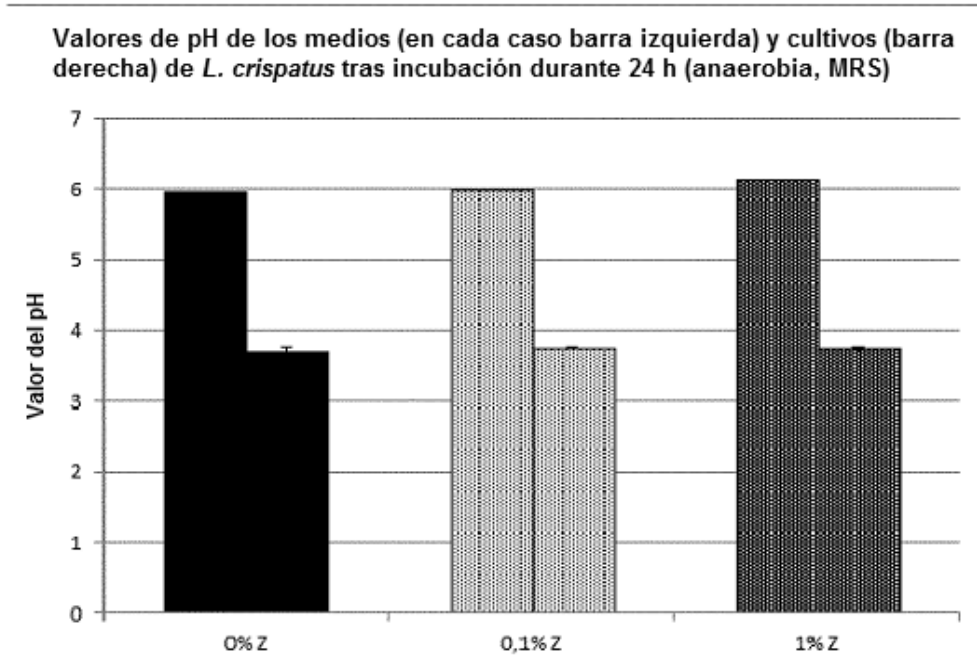


Fig. 11

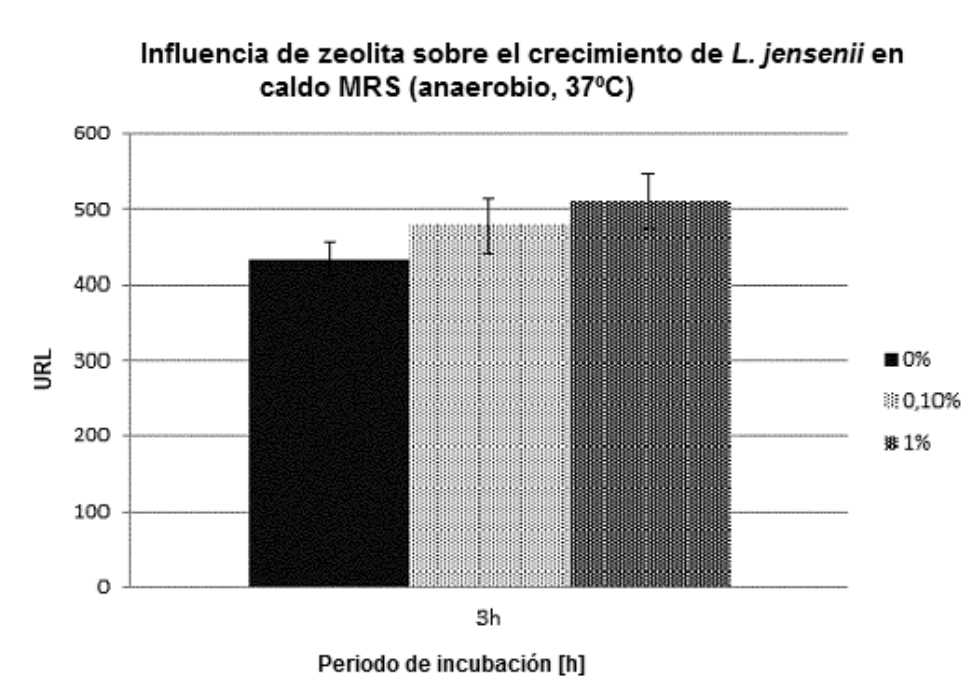


Fig. 12

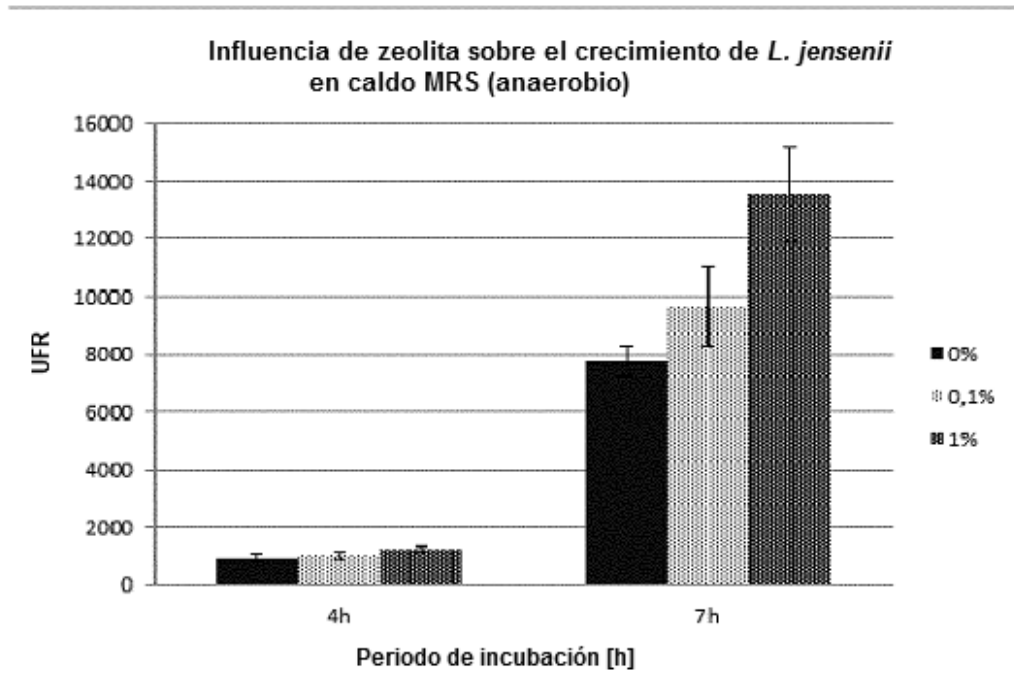


Fig. 13

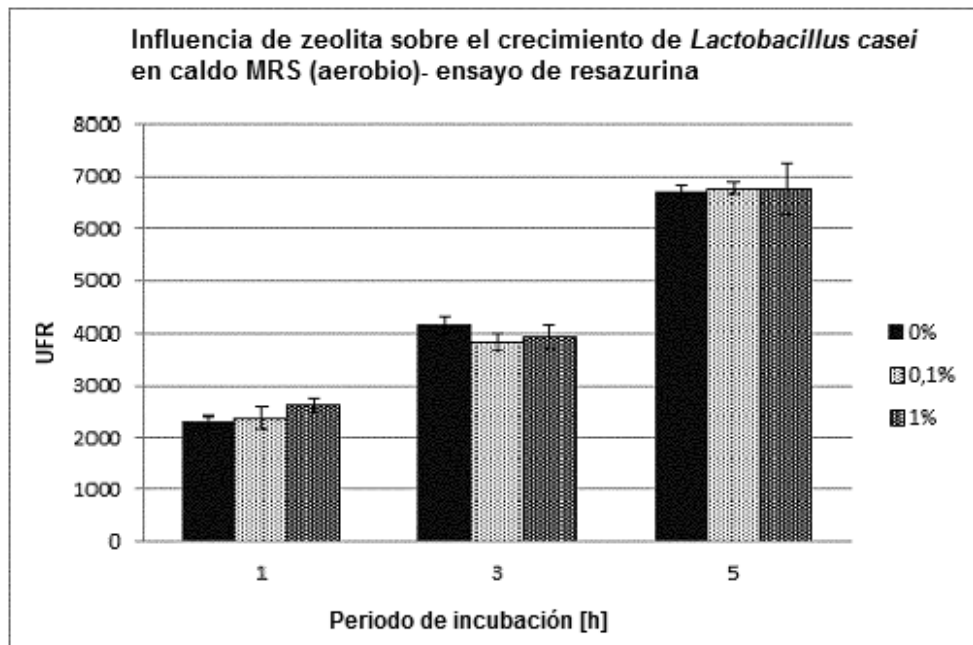


Fig. 14

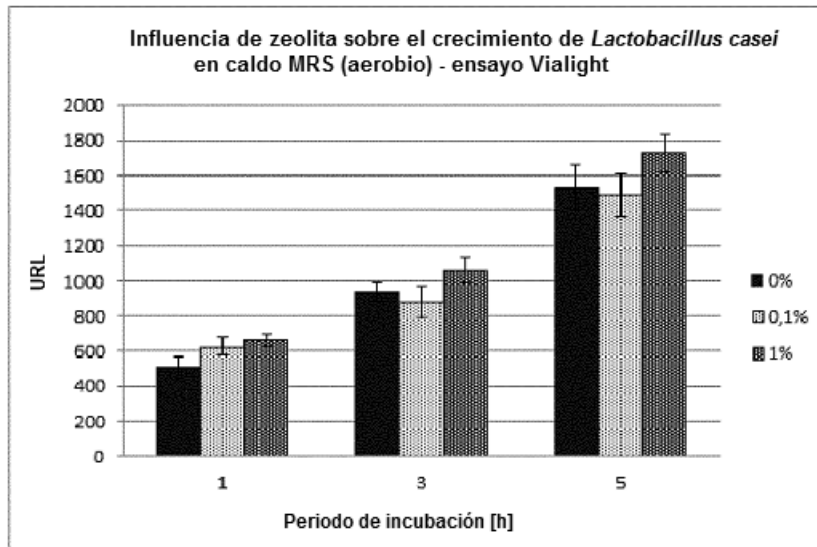


Fig. 15

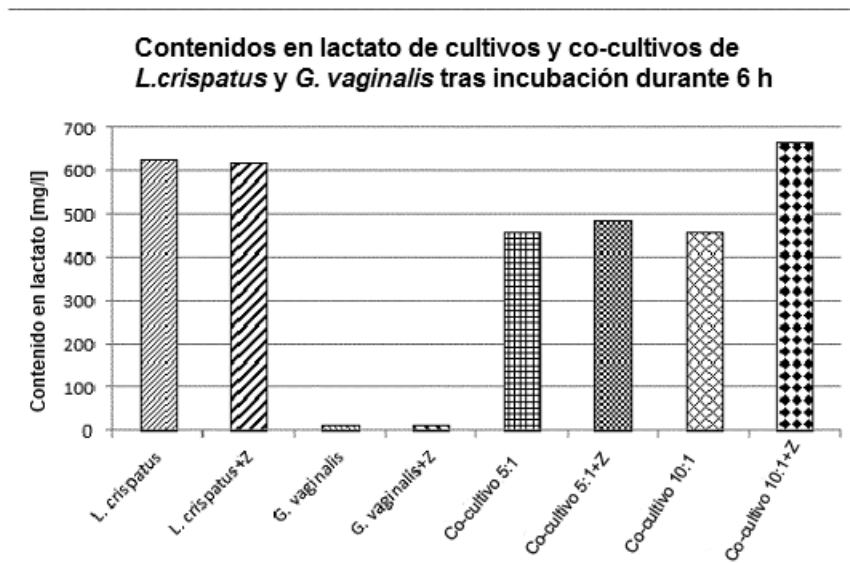


Fig. 16

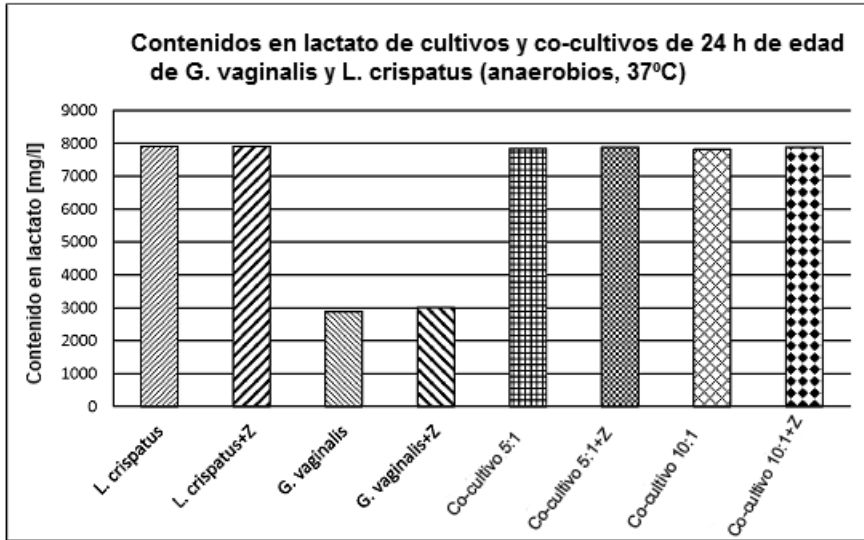


Fig. 17

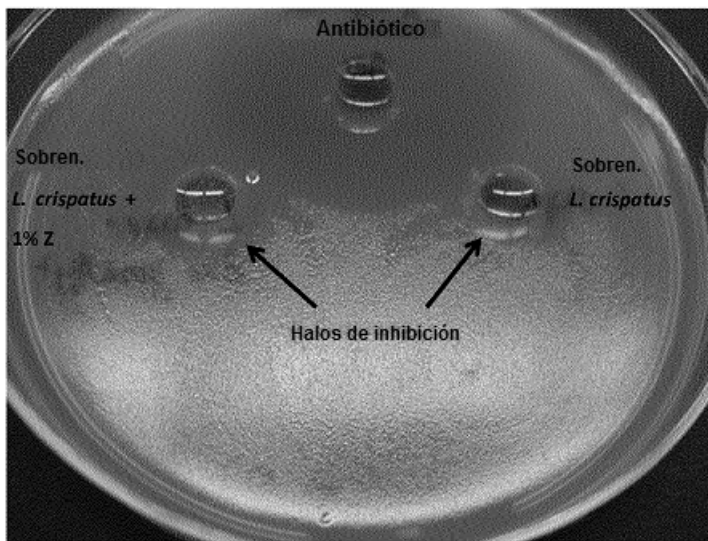


Fig. 18

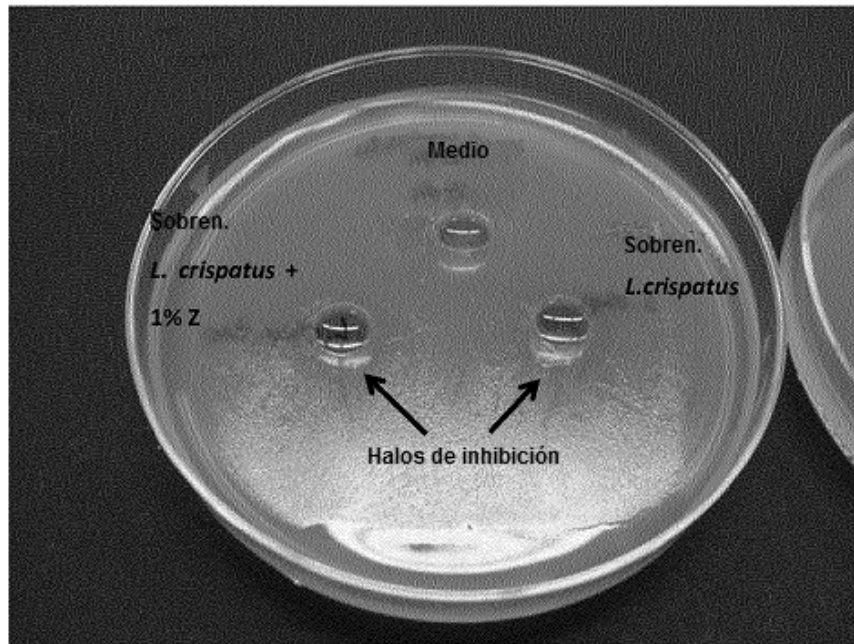


Fig. 19

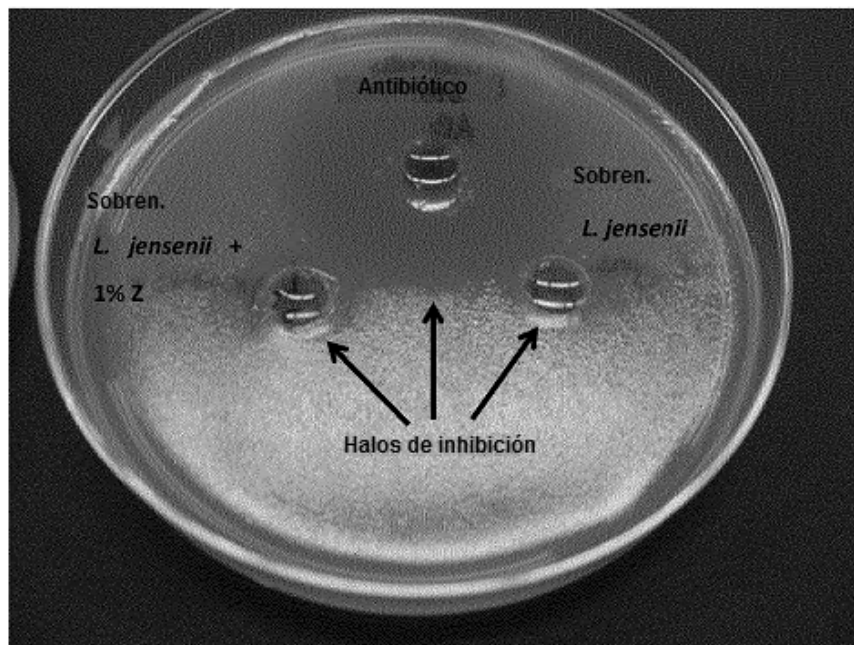


Fig. 20

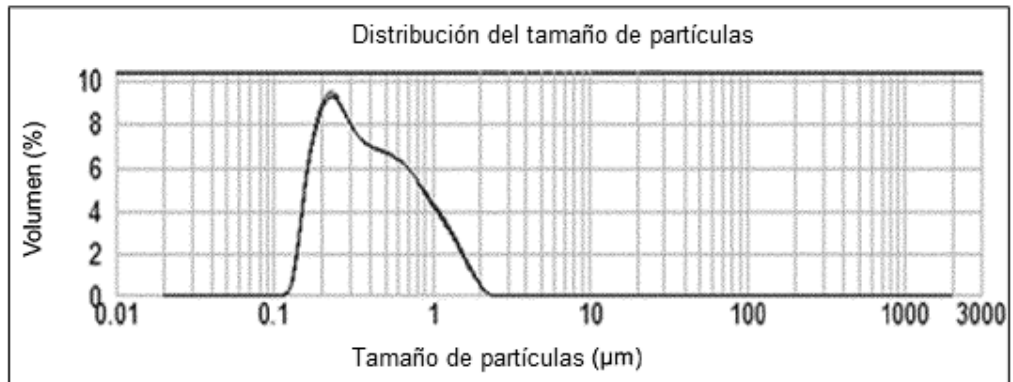


Fig. 21 Polvo de zeolita finísimo
% en volumen por encima del tamaño de partículas

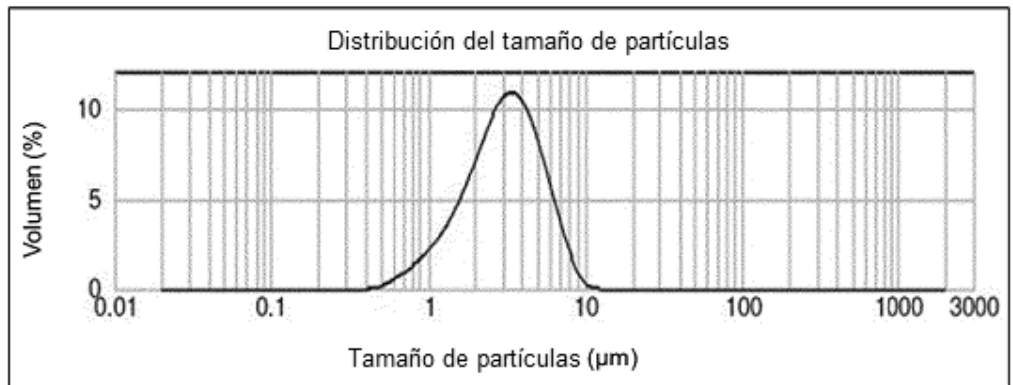


Fig. 22 Polvo de zeolita estándar
% en volumen por encima del tamaño de partículas

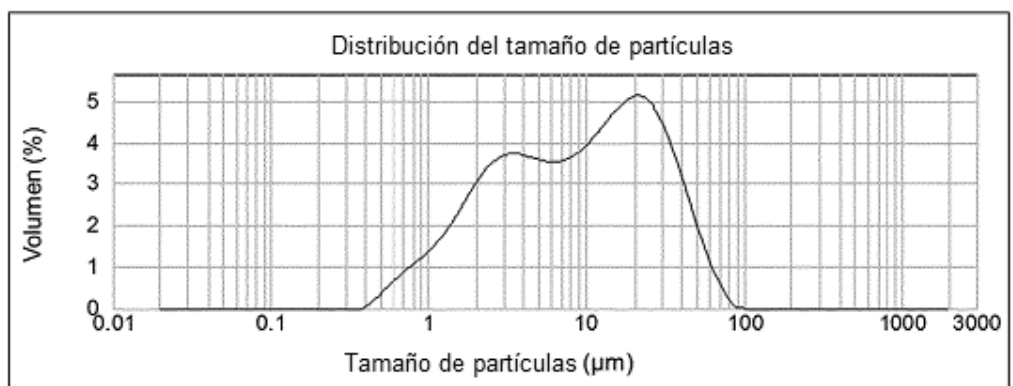


Fig. 23 Polvo de zeolita tosco
% en volumen por encima del tamaño de partículas

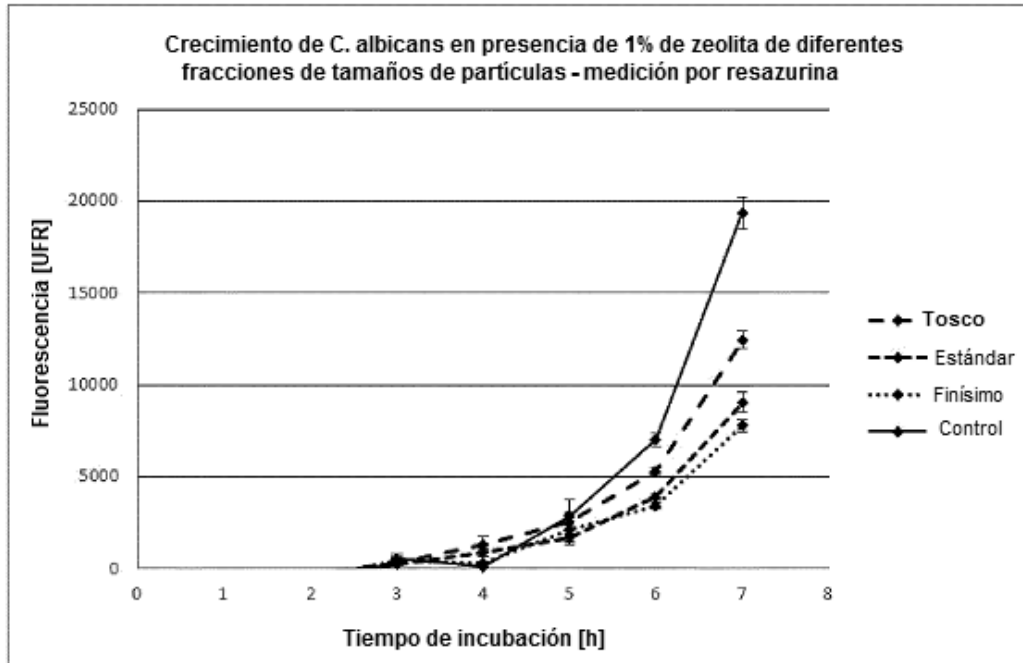


Fig. 24

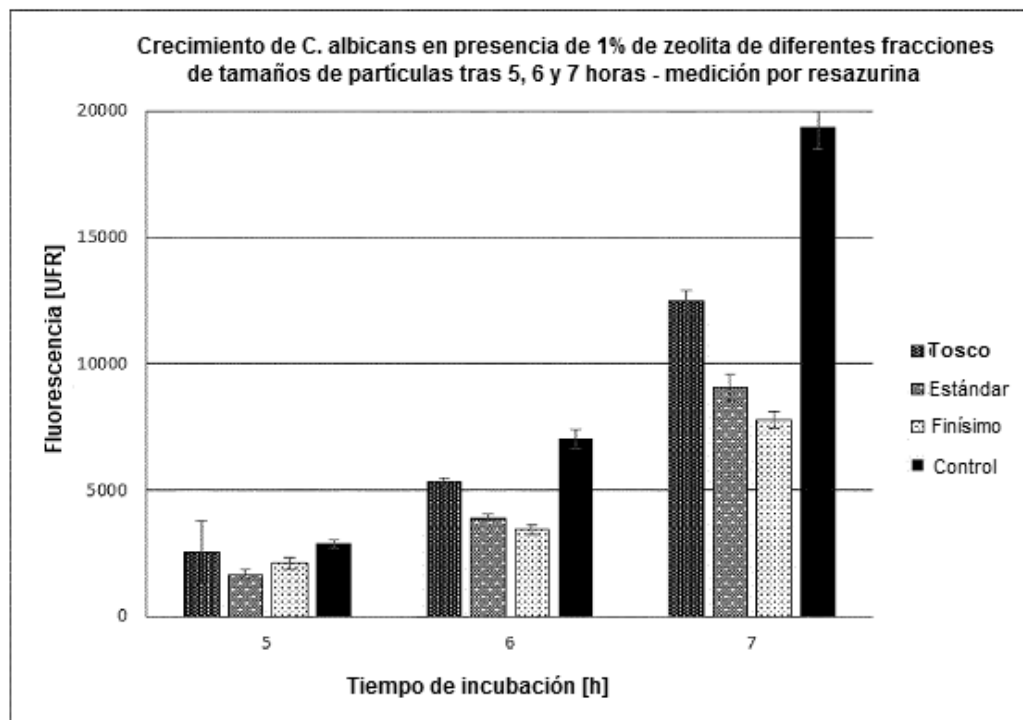


Fig. 25

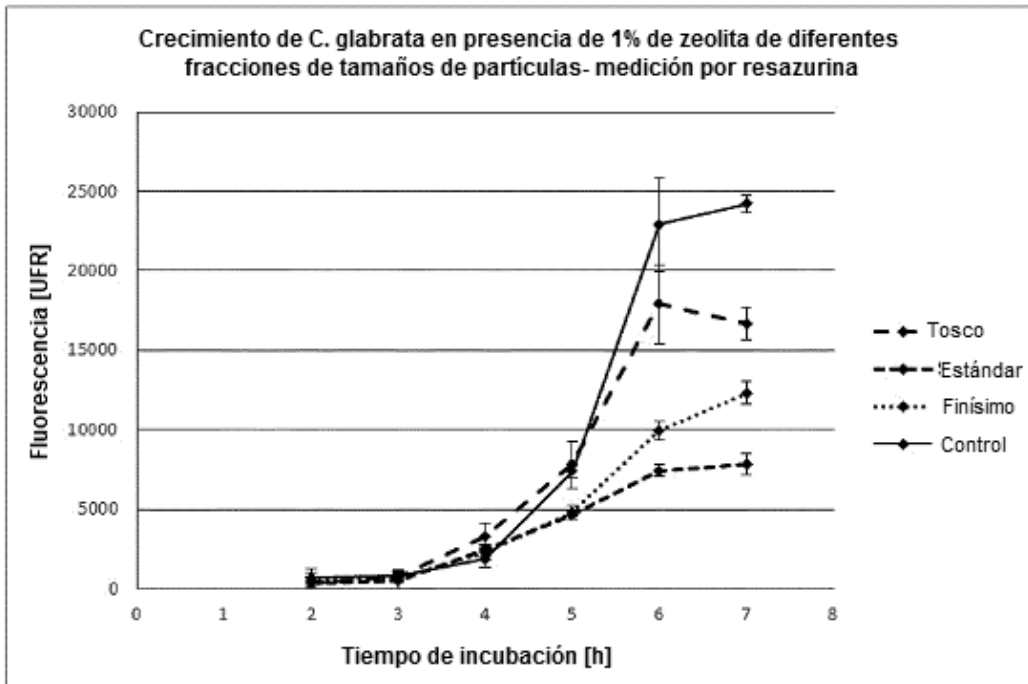


Fig. 26

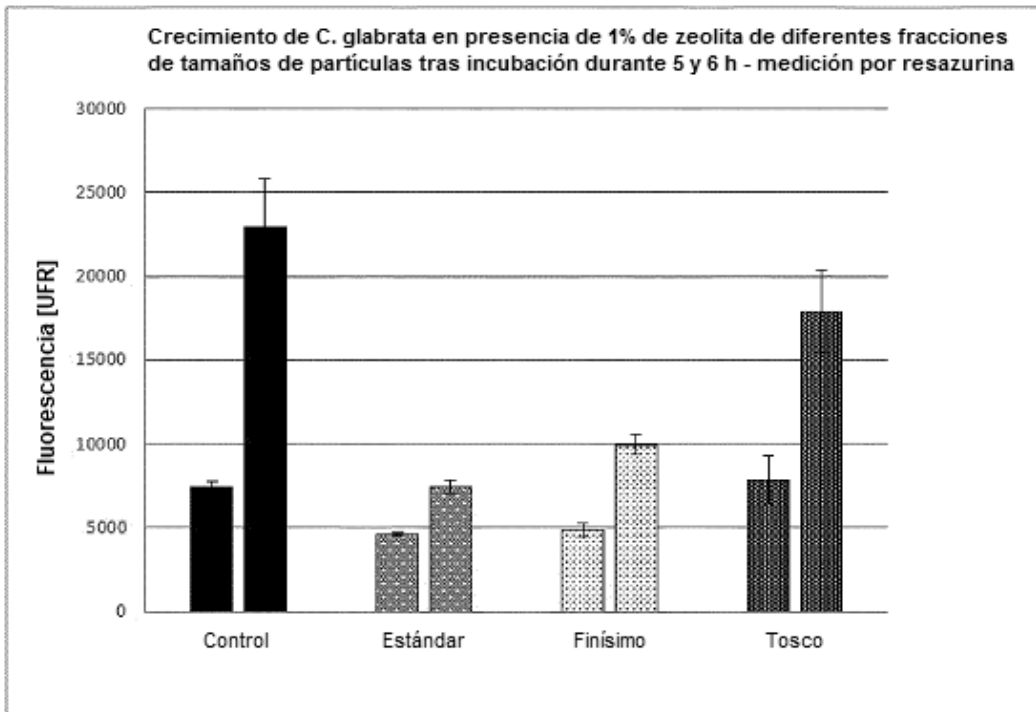


Fig. 27

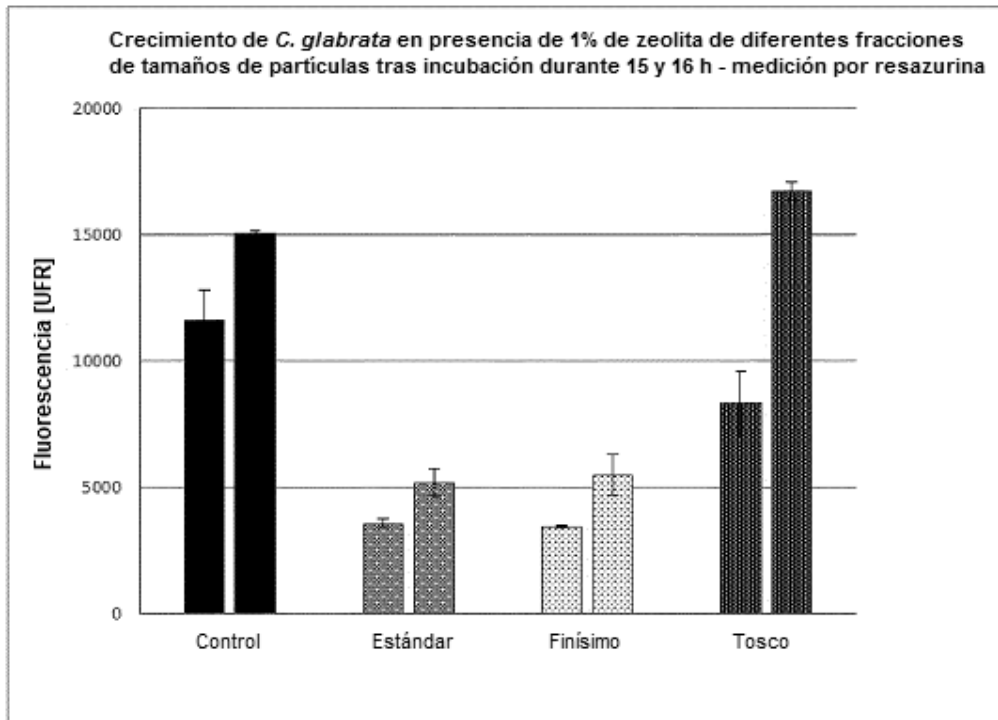


Fig. 28

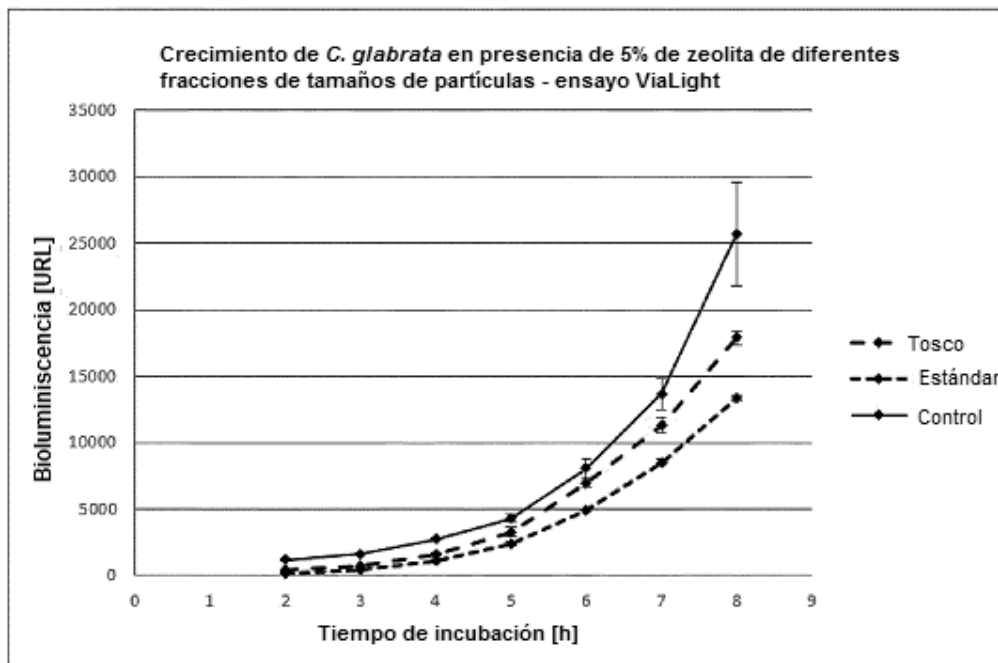


Fig. 29